

Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Die Bedeutung von P-Glykoprotein (Pgp) assoziierten Mechanismen der Resistenz
gegenüber makrozyklischen Laktonen (ML) beim Pferdespulwurm *Parascaris equorum***

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
PhD of Biomedical Sciences
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Isa Jana Irina Janssen
Tierärztin aus Hannover

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3691

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Richard Lucius

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horses, helminthoses, *Parascaris equorum*, *Caenorhabditis elegans*, resistance, anthelmintics, ivermectin, verapamil, single nucleotide polymorphism, expressivity, real time PCR, assays, p-glycoproteins (MeSH)

Tag der Promotion: 30.04.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-517-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

“Parasitologists come and parasitologists go, but parasites persist despite the eradication efforts; hence unnecessary handicaps are not helpful and should not be imposed on the research and development of new control agents.”

Drudge & Lyons, 1977

INHALT

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Nematoda.....	3
2.1.1	<i>Parascaris</i>	4
2.1.1.1	Taxonomie	4
2.1.1.2	Morphologie.....	4
2.1.1.3	Arten und Chromatindiminution.....	5
2.1.1.4	Vorkommen, Prävalenz und Bedeutung	6
2.1.1.5	Entwicklungszyklus	7
2.1.1.6	Pathologische und klinische Befunde	8
2.1.1.7	Immunologie	9
2.1.1.8	Diagnose	9
2.1.1.9	Therapie und Bekämpfung.....	9
2.1.1.9.1	Anthelminthische Therapie.....	9
2.1.1.9.2	Bekämpfungsmaßnahmen	10
2.1.2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	11
2.1.2.1	Taxonomie	11
2.1.2.2	Morphologie.....	11
2.1.2.3	Entwicklungszyklus	11
2.1.2.4	Die Verwendung von <i>Caenorhabditis elegans</i>	12
2.1.2.4.1	Allgemeines	12
2.1.2.4.2	<i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus für parasitische Nematoden.....	13
2.1.2.4.3	<i>Caenorhabditis elegans</i> Stämme	14
2.2	Anthelminthika.....	16
2.2.1	Makrozyklische Laktone	16
2.2.1.1	Allgemeines	16
2.2.1.2	Chemische Eigenschaften	17
2.2.1.3	Pharmakodynamik	18
2.2.1.4	Pharmakokinetik	19
2.2.1.5	Toxikologie und ökologische Bedeutung	20
2.2.1.6	Antiparasitäre Aktivität.....	21
2.2.2	Andere Anthelminthikaklassen	22

2.3	Anthelminthikaresistenz	23
2.3.1	Definition und Formen	23
2.3.2	Molekulare und genetische Hintergründe	24
2.3.3	Resistenzen gegenüber makrozyklischen Laktonen.....	25
2.3.3.1	Resistenzen gegenüber makrozyklischen Laktonen bei <i>P. equorum</i>	25
2.3.3.2	Resistenzmechanismen	27
2.3.3.2.1	P-Glykoproteine.....	28
2.3.3.2.2	Glutamat-gesteuerte Chloridionenkanäle	31
2.3.3.2.3	β -Tubuline	32
2.3.4	Resistenzen gegenüber anderen Wirkstoffklassen	32
2.3.5	Resistenzdiagnostik.....	33
2.3.5.1	<i>In vivo</i> -Testverfahren	33
2.3.5.2	<i>In vitro</i> -Testverfahren	34
2.3.5.3	Molekulare Testverfahren.....	36
2.3.6	Resistenz: Retardierung und Reversion	36
3	VERÖFFENTLICHUNGEN	39
3.1	Genetic Variants and Increased Expression of <i>Parascaris equorum</i> P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility.....	39
3.2	<i>Caenorhabditis elegans</i> : Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains	61
4	DISKUSSION	79
4.1	Identifizierung und Charakterisierung von P-Glykoproteinen des Pferdespulwurms <i>P. equorum</i>	80
4.1.1	Identifizierung zweier <i>P. equorum</i> Pgps	80
4.1.2	Charakterisierung von <i>PeqPgp-11</i> und <i>PeqPgp-16</i>	81
4.2	Expressionsorte von <i>Peqpgp-11</i> und <i>Peqpgp-16</i> bei adulten Würmern	83
4.3	Qualitativer und quantitativer Vergleich zwischen Pgps von <i>P. equorum</i> Populationen unterschiedlicher ML-Suszeptibilität und unterschiedlichen Entwicklungsstadiums.....	84
4.3.1	Qualitative Untersuchung der <i>Peqpgp-11</i> und <i>Peqpgp-16</i> -Transkripte: Pgp- Sequenzvergleich und Identifizierung von SNPs mittels SeqDoC-Analyse.....	84
4.3.2	Quantifizierung der SNPs mittels Pyrosequenzierung.....	89
4.3.3	Quantitative Untersuchung der <i>Peqpgp-11</i> und <i>Peqpgp-16</i> Transkription bei Populationen unterschiedlicher ML-Suszeptibilität.....	90
4.4	Untersuchung von <i>C. elegans</i> <i>Loss-of-function</i> -Mutanten hinsichtlich ihrer IVM- Suszeptibilität	93
4.5	Funktionale Expression von <i>PeqPgp-11</i> in einem <i>C. elegans</i> -Stamm mit <i>pgp-11</i> <i>Loss-of-function</i> -Mutation (tm-0333).....	98

4.6	Schlussfolgerung und mögliche Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen.....	100
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	103
6	SUMMARY AND OUTLOOK.....	105
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	107
8	ANHANG.....	129
8.1	Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen mittels Pyrosequenzierung.....	129
8.2	Funktionale Expression von <i>PeqPgp-11</i> in tm0333.....	133
8.3	Avermectin Derivate.....	136
8.4	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	137
8.5	Liste der Aminosäuren.....	139
8.6	Veröffentlichungen.....	140
8.6.1	Publikationen.....	140
8.6.2	Präsentationen.....	140
8.6.3	Poster.....	141
8.6.4	Weitere Veröffentlichungen.....	141
9	DANKSAGUNG.....	143
10	ERKLÄRUNG.....	145

1 EINLEITUNG

Das Zusammenleben unterschiedlicher Spezies hat im Laufe der Evolution zu verschiedenen, sich gegenseitig beeinflussenden Lebensformen geführt. Zu diesen ist auch der Parasitismus zu zählen, der sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich weit verbreitet ist und z. T. schwerwiegende Konsequenzen für den Wirt hat. Von den 107 in der Liste A und B der Weltorganisation für Tiergesundheit (World Organisation for Animal Health; OIE) aufgeführten übertragbaren Krankheiten, die mit einem sozioökonomischen Einfluss oder einer Gefährdung der öffentlichen Gesundheit einhergehen bzw. die für den internationalen Handel mit Tieren oder deren Produkten von Bedeutung sind, handelt es sich bei 44 um Krankheiten parasitären Ursprungs und/oder um solche, bei denen eine Übertragung durch parasitäre Vektoren nachgewiesen wurde (www.oie.int). Häufig besteht zusätzlich ein nicht zu unterschätzendes Zoonoserisiko für den Menschen. Humanpathogene Parasiten spielen entweder als direkte Erreger und/oder als Überträger infektiöser Krankheiten insbesondere in den tropischen und subtropischen Regionen eine bedeutende Rolle (www.who.int/whosis/whostat/2007).

Die Behandlung einer parasitären Erkrankung gestaltet sich aufgrund des zunehmenden Wirksamkeitsverlustes von Antiparasitika als immer schwieriger (Sangster et al., 2002). Zu den Beschwerden, die mit einer Infektion einhergehen, kommt in der Tierhaltung auch der ökonomische Verlust, dessen Ausmaß sich nur schwer einschätzen lässt. Vergleichende Untersuchungen bei Schafen ergaben, dass selbst subklinische Helmintheninfektionen, die in Folge von Anthelminthikaresistenz auftreten, mit deutlichen Produktionseinbußen einhergehen (Miller et al., 2012). Welche Bedeutung der Resistenzproblematik beigemessen wird, wird auch durch die aktuelle Diskussion über die Einschränkung des tierärztlichen Dispensierrechts deutlich. Gegenstand einer Resolution des EU-Parlaments ist derzeit noch die Verschreibung und Abgabe von Antibiotika, da zwischen der Abgabemenge von Antiinfektiva und der Entwicklung von Resistenzen ein Zusammenhang gesehen wird. Die in den letzten Jahren zu beobachtende Entwicklung in einigen europäischen Staaten lässt aber auch die Bemühungen erkennen, den Einsatz anthelminthischer Wirkstoffe zu begrenzen, um der weiteren Ausbreitung von Resistenzen vorzubeugen. Dies soll durch die verschreibungspflichtige Abgabe, die entsprechende diagnostische Maßnahmen voraussetzt, erreicht werden (Nielsen, 2012).

Um das weitere Voranschreiten der Ausbreitung von Resistenzen zu verlangsamen und die Wirksamkeit der Breitspektrumanthelminthika auch in Zukunft zu erhalten, ist die frühzeitige Erkennung einer aufkommenden Resistenzproblematik in Parasitenpopulationen entscheidend. Auf diese Weise kann die weitere Selektion durch das Ausweichen auf eine andere Wirkstoffgruppe verhindert und/oder durch ein verlängertes Behandlungsintervall die Wirksamkeit des Anthelminthikums erhalten werden (von Samson-Himmelstjerna, 2012). Für die Detektion der Anthelminthikaresistenz stehen verschiedene Methoden zur Auswahl. Während für die Diagnostik der Benzimidazol (BZ)-Resistenz bereits auf Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierende Methoden zur Verfügung stehen, beschränken sich die Möglichkeiten bei den makrozyklischen Laktonen (MLs) auf *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen, die i. d. R. mit einem hohen Arbeits- und Zeitaufwand sowie häufig einer niedrigen Sensitivität verbunden sind (Martin et al., 1989). Aus diesem Grund ist es wichtig, schnelle, einfache und zuverlässige Methoden zu entwickeln, die für die Identifizierung resistenter Populationen geeignet sind, bevor genetische Veränderungen der Parasiten einen Punkt erreicht haben, an dem eine weitere Behandlung nicht mehr möglich ist (Gilleard &

1 EINLEITUNG

Beech, 2007). Von nicht minderer Wichtigkeit ist die Aufklärung der für das Resistenzgeschehen verantwortlichen molekularen Hintergründe. Neben der Evaluierung möglicher Resistenzmarker leistet dies einen wertvollen Beitrag für die Entwicklung und Anwendung neuer Wirkstoffe (Shilling et al., 2006). Eine zunehmende Bedeutung wird bei der Ausbildung von Resistenzen den Veränderungen von Genen zugeschrieben, die nicht für das unmittelbare Ziel des Wirkstoffes kodieren. Es handelt sich vielmehr um unspezifische Resistenzmechanismen wie z. B. Veränderungen im Metabolismus sowie im Transport (Cvilink et al., 2009). Letztere gehen häufig auf die Aktivität verschiedener Mitglieder der *ATP-Binding-Cassette* (ABC)-Transporter Familie, insbesondere der P-Glykoproteine (Pgps), zurück (Blackhall et al., 1998a; Xu et al., 1998). Trotz vermehrter Bemühungen in den letzten Jahren sind die biochemischen Zusammenhänge zwischen Pgps und der Anthelminthikaresistenz in Nematoden noch immer nicht eindeutig geklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen (Jones & George, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wird der Beitrag der Pgps an der verminderten Wirksamkeit der MLs bei der Bekämpfung von *Parascaris equorum* Infektionen des Pferdes untersucht und potentielle Resistenzmarker innerhalb dieser Gene vorgestellt. Des Weiteren wird der Einfluss des Verlustes einzelner Pgps auf die Suszeptibilität im Modellorganismus analysiert.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Nematoda

Bei den Mitgliedern des Stammes der Nematoda (Rundwürmer) handelt es sich meist um freilebende Arten, zu einem geringeren Teil auch um solche, die auf Parasitismus angewiesen sind. Sie sind sowohl terrestrisch vorkommend als auch unter aquatischen Bedingungen zu finden. Parasitäre Nematoden zeigen entweder eine direkte oder indirekte Entwicklung und gelangen auf unterschiedlichen Übertragungswegen (oral, perkutan, pränatal, galaktogen, vektoriiell) in ihren Wirt (Deplazes et al., 2012c).

Morphologisch unterscheiden sich die einzelnen Nematodenarten insbesondere hinsichtlich ihrer Länge, die bei adulten Stadien von < 1 mm bis zu > 6 m variieren kann (Blaxter, 2011). Ihr Körperbau weist mit seiner meist langgestreckten und bilateral-symmetrischen Form dagegen vergleichsweise einheitliche Merkmale auf. Die primäre, flüssigkeitsgefüllte Leibeshöhle wird nach außen durch eine mehrschichtige, für die Stabilität und Motilität wichtige Kutikula begrenzt, die der Hypodermis aufliegt und gemeinsam mit dieser und der nach innen folgenden einschichtigen, schräggestreiften Längsmuskulatur den Hautmuskelschlauch bildet (Mehlhorn & Piekarski, 2002; Deplazes et al., 2012c). Die Kutikula ist für kleinere lipophile Moleküle durchlässig (Mehlhorn & Piekarski, 2002).

Die inneren Organe werden hauptsächlich durch den Verdauungstrakt sowie die Reproduktionsorgane repräsentiert. Der Verdauungstrakt beginnt mit der Mundhöhle, an die sich der Pharynx anschließt (Deplazes et al., 2012c). Beide Strukturen sind ektodermalen Ursprungs und mit Kutikula überzogen. Auf den Vorderdarm folgt der den Körper gerade durchziehende entodermale Mitteldarm, der in den ektodermalen Enddarm übergeht (Lucius & Loos-Frank, 1997). Bei dem Reproduktionssystem der meist zweigeschlechtlichen Nematoden, im Fall der Rhabditoidea auch protandrischen Hermaphroditen, dominieren bei den weiblichen Tieren die Uteri, die mit Eiern unterschiedlicher Entwicklungsstadien gefüllt sind. Bei den männlichen Tieren sind insbesondere die sekundären Begattungsorgane hervorzuheben, zu denen die *Spicula* und die *Bursa copulatrix* zu zählen sind. Diese Strukturen können ebenso wie der Größenunterschied zwischen Weibchen und Männchen sowie dem häufig eingerollten Hinterende der Männchen zur Geschlechtsdifferenzierung aber auch zur Gattungs-/Artdiagnose herangezogen werden. Eine weitere Besonderheit der Nematoden stellt das Exkretionssystem dar: Dieses wird durch die sogenannte H-Zelle verkörpert, deren Längsachsen in lateralen Vorstülpungen der Hypodermis in die Leibeshöhle eingebettet sind und den Körper auf diese Weise in seiner gesamten Länge durchziehen (Deplazes et al., 2012c). Diese Vorstülpungen finden sich auch im dorsalen und ventralen Bereich der Körperhöhle, in die hier jedoch jeweils ein Nervenstrang eingebettet ist, der für die Innervation der Längsmuskulatur verantwortlich ist. Der Kontakt zwischen Muskelzelle und dorsalem bzw. ventralem Nervenstrang wird bei den Nematoden durch einen Ausläufer der Muskelzelle hergestellt, der von deren zytoplasmatischen Anteil ausgeht (Lucius & Loos-Frank, 1997). Den Ursprung der Nervenstränge stellt ein Nervenring dar, der um den Pharynx gelegt ist und außerdem die Innervation des Kopfes und des Schwanzes sowie der vorwiegend hier anzutreffenden Sinnesorgane gewährleistet (Deplazes et al., 2012c). Die Fortbewegung ist lediglich durch schlängelnde Bewegungen möglich; die den hydrostatischen Druck aufrechterhaltende Kutikula dient hierbei der Längsmuskulatur als Widerlager (Hydroskelett) (Mehlhorn & Piekarski, 2002).

Die Entwicklung erfolgt von dem nicht embryonierten oder bereits das erste Larvenstadium (L1) enthaltenden Ei (selten sind Nematoden auch vivipar) über insgesamt vier Larvenstadien,

deren Stadien durch Häutungen (Ecdysis) voneinander abgegrenzt werden. Die vierte und letzte Häutung endet mit der Entwicklung zum präadulten Stadium, das ohne eine weitere Häutung in das Stadium des adulten Wurmes übergeht (Lucius & Loos-Frank, 1997). Der Häutung unterliegen sämtliche Oberflächen ektodermalen Ursprungs, also neben dem Hautmuskelschlauch auch der Vorder- und Enddarm sowie der distale Anteil der Vagina und der Exkretionsporus (Deplazes et al., 2012c).

2.1.1 *Parascaris*

2.1.1.1 Taxonomie

Erstmals beschrieben wurde der Pferdespulwurm *P. equorum* 1782 von Goeze. Blaxter et al. (1998) ordnen *Parascaris* der Klade III (Spirurina) von insgesamt fünf Kladen zu, während die alternative Einteilung nach Helder et al. (2006; 2009) die Zugehörigkeit zur Klade 8 von insgesamt zwölf Kladen vorsieht. Die systematische Einteilung nach dem National Center for Biotechnology Information (NCBI) gestaltet sich folgendermaßen (Taxonomie-ID: 6256):

Eukaryota (Superregnum)
Opisthokonta
Metazoa (Regnum)
Eumetazoa
Bilateria
Protostomia
Ecdysozoa
Nematoda (Phylum)
Chromadorea (Classis)
Ascaridida (Ordo)
Ascaridoidea (Superfamilia)
Ascarididae (Familia)
Parascaris (Genus)

2.1.1.2 Morphologie

Die adulten männlichen Würmer des Pferdespulwurms erreichen je nach Infektionsrate eine Länge von 15-28 cm, die adulten Weibchen sind zwischen 18 und 40 cm lang und haben einen Durchmesser von 3-5 mm (Southwood et al., 1998; Deplazes et al., 2012a). Wie auch bei anderen Nematoden können das leicht eingerollte Hinterende des Männchens (Abbildung 1A) sowie die beiden *Spicula* zur Geschlechtsdifferenzierung herangezogen werden; ein *Gubernaculum* und kaudale Flügel/Alae fehlen (Pilitt et al., 1979). Die Mundöffnung am Vorderende ist mit drei Lippen ausgestattet, die ihrerseits kleine Zähne tragen. Die Kutikula hat eine weiß-gelbliche Farbe (Deplazes et al., 2012a).

Die Eier sind im Gegensatz zu den Eiern von *Ascaris suum* eher kugelig und besitzen eine Größe von 90-100 µm (Abbildung 1B) (Deplazes et al., 2012a). Die dicke Eischale verleiht den Eiern eine hohe Widerstandsfähigkeit und ermöglicht es den Larven über mehrere Jahre in der Umwelt zu überleben (Clayton, 1986). Sie besteht von innen nach außen betrachtet aus einer endogen von der befruchteten Oozyte gebildeten Lipid-, Chitin- und Vitellinschicht. Die innere Lipidmembran ist für die hohe Impermeabilität der Eischale verantwortlich, während die mittlere, dicke Chitinschicht mechanischen Schutz gewährleistet. Kovalente Verbindungen von Protein-Chitin-Komplexen schützen die Larve außerdem vor chemischen

Einflüssen (Wharton, 1980). Die äußerste, dünne Lipoproteinschicht (Vitellin) verleiht den Eiern einen klebrigen Charakter durch den sie aufgrund der Anhaftung von Umgebungspartikeln ihre gelblich-braune Farbe erhalten und an Oberflächen adhären (Deplazes et al., 2012a).

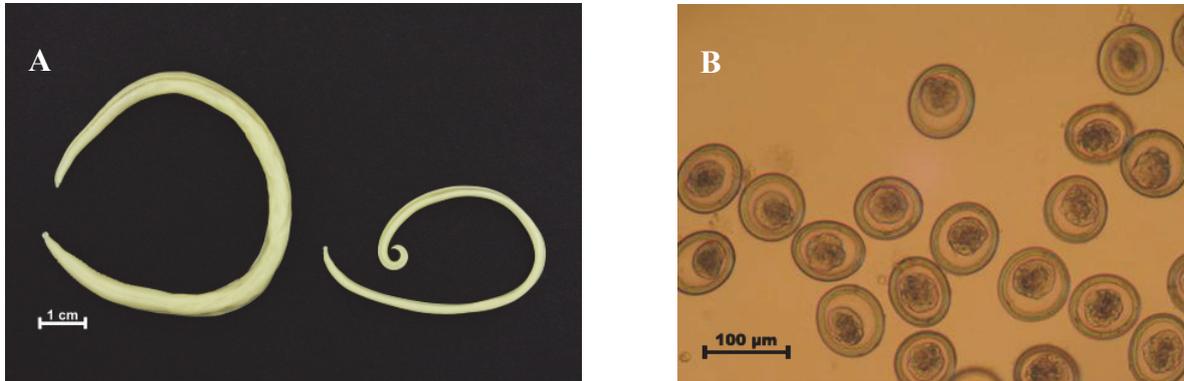


Abbildung 1: *Parascaris equorum* – Adulte und Eier: (A) Morphologie eines adulten Weibchens und adulten Männchens, makroskopisch meist eindeutig zu differenzieren anhand des Größenunterschiedes und des eingerollten Hinterendes des Männchens; (B) Eier von *P. equorum* nach der direkten Isolierung aus dem Uterus

2.1.1.3 Arten und Chromatindiminution

Abzugrenzen von *P. equorum* ist der von diesem morphologisch nicht zu unterscheidende und mit ihm eng verwandte Spulwurm *Parascaris univalens*. Kreuzungen zwischen den beiden Arten waren zwar möglich, führten aber zu einer erhöhten Embryonensterblichkeit durch Hybridsterilität. Diese ebenfalls bei Pferden auftretende Art besitzt im haploiden Zustand im Gegensatz zu *P. equorum* ($2n = 4$) nur ein Chromosomenpaar ($2n = 2$). Eine Unterscheidung der beiden *Parascaris*-Spezies ist daher durch eine Karyotypisierung zur Bestimmung des Chromosomensatzes möglich (Goday & Pimpinelli, 1986). Auch die Beurteilung des individuellen Isoenzymusters mittels Gelelektrophorese stellt eine Methode der Speziesdifferenzierung dar (Bullini et al., 1978). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der beiden Spezies ist die Anordnung des Chromatins: Während bei *P. univalens* eine eindeutige Trennung des Eu-/Heterochromatins zu finden ist, zeigt die Anfärbung der Chromosomen bei *P. equorum* eine interkalare Organisation (Goday & Pimpinelli, 1984). Gemeinsam ist beiden *Parascaris*-Spezies ein stark ausgeprägter Chromosomenpolymorphismus (Goday & Pimpinelli, 1986) sowie der vollständige Verlust des Heterochromatins in den präsomatischen Zellen im Rahmen des im Jahr 1887 erstmalig beschriebenen Prozesses der Chromatindiminution (Boveri). Dieser Vorgang tritt hauptsächlich in der Familie der Ascarididae (u. a. *A. suum*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*) auf, nicht aber bei freilebenden Nematoden wie *Caenorhabditis elegans* (Sulston & Brenner, 1974; Emmons et al., 1979). Darüber hinaus gibt es Berichte bei Ciliaten, *Crustacea*, Insekten und Vertebraten (Goday & Pimpinelli, 1993). Chromatindiminution findet während der frühen Embryogenese statt. Es handelt sich hierbei um eine festgelegte Neuordnung des Genoms, die, einhergehend mit der Zelldifferenzierung, zu quantitativen und qualitativen Veränderungen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) der Keimbahnzellen und der somatischen Zellen führt (Müller & Tobler, 2000). Die erste Teilung der Primordialkeimzelle P_0 verläuft normal und führt zur Bildung der Primordialkeimzelle P_1 und der präsomatischen Zelle S_1 mit gleichem Chromatingehalt. Je nach Art setzt mit der nächsten (*P. equorum* und *P. univalens*) oder übernächsten (*A. suum*) Zellteilung der Prozess der Chromatindiminution ein (Müller &

Tobler, 2000): Hierbei zerfällt das Euchromatin der präsomatischen Zelle S_1 in $2n = 60$ kleinere Chromosomen, die sich auf zwei Tochterkerne aufteilen. Das Heterochromatin hingegen wird aus dem Kern ausgestoßen und verbleibt auch während der Zellteilung im Zytoplasma, wo es wahrscheinlich enzymatisch degradiert wird und sich schließlich auflöst (Boveri, 1887; Goday & Pimpinelli, 1986; Müller et al., 1996). Auf diese Weise werden im Laufe der Zyklen der Chromatindiminution bei *P. univalens* 79-88 % und bei *A. suum* 25 % der Gesamt-DNA von den späteren somatischen Zellen entfernt (Müller et al., 1996). Im Gegensatz zu den präsomatischen Zellen erfolgt die Teilung der Primordialkeimzelle P_1 normal und ohne Veränderung der Chromosomengestalt. Dieser Vorgang wiederholt sich während der folgenden Zellteilungen in einer für die von Chromatindiminution betroffenen Arten festgelegten Anzahl (meist vier Wiederholungen) und ist gleichzeitig die Grundlage der Zelldifferenzierung: Zellen mit geringem Chromatingehalt (d. h. mit Chromatindiminution) werden zu somatischen Zellen, während Zellen, die diesem Prozess nicht unterliegen und den ursprünglichen Chromatingehalt beibehalten, zu Keimzellen werden (Müller & Tobler, 2000). Der Grund für das Auftreten von Chromatindiminution ist nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass hierdurch Gene aus den somatischen Zellen entfernt werden, die für Funktionen der Keimbahnentwicklung von Bedeutung sind. Dies trifft besonders für Gene zu, die an Translationsprozessen beteiligt sind (Wang et al., 2012). Ein weiterer möglicher Grund ist die mit dem Umbau der Chromosomen einhergehende neue Anordnung der Gene, die zu veränderten Transkriptionsraten der nicht entfernten Gene führen könnte (Tobler et al., 1992; Goday & Pimpinelli, 1993). Auch der Erhalt des genetischen Gleichgewichts in den somatischen Zellen wird als Ursache für die Entstehung der Chromatindiminution diskutiert. Eine partielle Genomduplikation, wie sie z. B. bei *A. suum* anzutreffen ist und die schon wenige Prozent des gesamten Genoms überschreitet, kann schädliche oder gar letale Auswirkungen haben. Durch die Chromatindiminution wird somit einer Aneuploidie zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt entgegengewirkt, während sie im Laufe der Keimbahnentwicklung, bei der ohnehin ein Großteil der Genaktivität unterdrückt ist, nicht erforderlich ist (Müller & Tobler, 2000).

2.1.1.4 Vorkommen, Prävalenz und Bedeutung

Es handelt sich bei *P. equorum* um einen Kosmopoliten, der vorwiegend bei Fohlen und Jährlingen aller Equidenspezies anzutreffen ist. Die orale Infektion erfolgt meist in den ersten Lebenstagen/-wochen; eine pränatale oder galaktogene Infektion konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Clayton, 1978; Clayton, 1986; Anderson, 2000). Der Höhepunkt der Eiausscheidung wird im 4.-5. Lebensmonat erreicht (Lyons & Tolliver, 2004; Deplazes et al., 2012a), weshalb den Fohlen die größte Rolle in der Umgebungskontamination zukommt. Aufgrund der einsetzenden Immunität sinkt die Prävalenz und Intensität der Infektion mit zunehmendem Alter (Anderson, 2000), wobei ältere Pferde weiterhin als Träger an der Eiausscheidung beteiligt sein können (Kassai, 1999; Hinney et al., 2011). Es überrascht daher nicht, dass Zuchtbetriebe häufiger eine *P. equorum* Problematik aufweisen als andere Betriebsformen; entscheidend ist auch die Bestandsgröße, da große Bestände häufiger betroffen sind, als solche mit geringeren Tierzahlen (Rehbein et al., 2002).

In Mitteleuropa wird die Prävalenz bei Fohlen und Jährlingen mit 70 % angegeben (Deplazes et al., 2012a). Kürzlich durchgeführte Untersuchungen von Schlachttieren eines Standortes in Bayern ergaben eine Prävalenz von 11,3 %, wobei keine Angaben hinsichtlich des Alters der untersuchten Tiere gemacht wurden (Rehbein et al., 2012). Eine saisonale Abhängigkeit des Befalls besteht nicht (Bucknell et al., 1995; Rehbein et al., 2012). Ähnliche Untersuchungen der letzten 10 Jahre aus Europa und den USA ergaben Prävalenzen zwischen 12 und 25 % (Kornás et al., 2006; Lyons et al., 2006b). Prävalenzen, die auf Grundlage des

koproscopischen Einachweises erhoben wurden, weichen von denen der Sektionsbefunde ab: Hier wurden Werte zwischen 16,7 und 86 % auf Farmebene bzw. zwischen 1 und 25 % auf Tierebene beschrieben (< 1 Jahr: 16-45,4 %; 1-3 (2) Jahre: 2,1-2,86 (6) %; > 3 Jahre: 0-13 %) (Lyons & Tolliver, 2004; Lyons et al., 2006b; Francisco et al., 2009; Fritzen et al., 2010; Hinney et al., 2011; Rehbein et al., 2012). Der Grund für die stark schwankenden Prävalenzen, die sich bei dem Vergleich zwischen den koproskopischen Untersuchungen und Sektionsbefunden einerseits, andererseits zwischen den einzelnen koproskopischen Untersuchungen ergeben, könnte darin liegen, dass ein Zusammenhang zwischen der Eizahl der Kotprobe (*Faecal Egg Count*, FEC) und der tatsächlichen Wurmbürde nicht zwangsläufig vorliegt (Nielsen et al., 2010; Rehbein et al., 2012; Andersen et al., 2013). So muss für die Bestimmung des FEC eine bestimmte Anzahl adulter Würmer vorhanden sein. Des Weiteren müssen bei der Bewertung die Altersstruktur der in die Untersuchung miteinbezogenen Tiere sowie die Haltungsbedingungen berücksichtigt werden (Francisco et al., 2009). Studien zur Entwicklung der *P. equorum* Prävalenzen ergaben, dass diese, trotz der Einführung der MLs während des Untersuchungszeitraumes, nahezu identisch geblieben sind (Lyons et al., 2000; Chapman et al., 2002).

Milde Infektionen verlaufen bei Equiden häufig inapparent oder werden nur von leichten Symptomen begleitet, während stärkere Infektionen zu Wachstumsverzögerungen und verringerten Gewichtszunahmen von bis zu 50 % (Clayton & Duncan, 1978) sowie zu Todesfällen führen können. Zusätzlich wird der *Parascaris*-Infektion eine gewisse Bedeutung als Wegbereiter von Sekundärinfektionen mit Bakterien, Viren oder Protozoen zugeschrieben (Srihakim & Swerczek, 1978).

Bei Meerschweinchen konnten nach vorheriger Sensibilisierung Überempfindlichkeitsreaktionen hervorgerufen werden, die zu systemischer Anaphylaxie und Todesfällen führten (Bemrick et al., 1977). Diese Reaktionen werden durch die Kutikula der Askariden hervorgerufen, die einen bedeutenden Faktor bei der Mastzelldegranulation darstellt (Nicholls et al., 1978). Ein gesundheitliches Risiko für den Menschen, das von den Antigenen insbesondere der Eier aber auch der Larven bzw. adulten Würmer ausgeht, ist zwar nicht beschrieben, kann somit nicht ausgeschlossen werden. Trotz erfolgreicher Infektionen von Mäusen, Ratten, Lämmern und Kaninchen (Srihakim & Swerczek, 1978) sowie der larvalen Wanderung in Fehlwirten, wurde *P. equorum* bisher nicht mit der viszeralen Form der *Larva migrans* beim Menschen in Zusammenhang gebracht (Clayton, 1986).

2.1.1.5 Entwicklungszyklus

Bei *P. equorum* handelt es sich um einen monoxenen Parasiten. Es wird vermutet, dass die Monoxenie aus dem Verlust eines ursprünglichen Endwirtes (Prädator) hervorgegangen ist. Die komplexe Wanderung der Larven ist charakteristisch für eine Entwicklung im Zwischenwirt, mit dem Unterschied, dass für die Reifung zum graviden Entwicklungsstadium kein weiterer Wirt notwendig ist (Anderson, 2000). Nach der oralen Aufnahme der bescheideten infektiösen dritten Larve (L3) im Ei durch den Wirt schlüpft die Larve im Magen und Dünndarm. Zu welchem Zeitpunkt und in welchem Gewebe die Häutung zur vierten Larve (L4) erfolgt, ist nicht eindeutig geklärt. Gut untersucht ist hingegen das Wanderungsverhalten von *P. equorum*: Nach dem Schlupf penetriert die Larve die Darmmucosa und tritt in die Darmvenen ein. Über das Pfortadersystem gelangt sie in die Leber (Deplazes et al., 2012a). Nach einer Wanderungsphase setzt sie ihren Weg zur Lunge über die Blutbahn fort, die sie schließlich nach 7-14 Tagen erreicht (Lyons et al., 1976). Ausgehend von den Alveolen erfolgt die weitere Wanderung über die Bronchioli, Bronchien und schließlich die Luftröhre hinauf bis zur Maulhöhle, von wo sie erneut abgeschluckt wird und sich ab dem 14. Tag p. i. ein weiteres Mal im Duodenum bzw. proximalen Jejunum

wiederfindet. Es folgt eine letzte Häutung zum präadulten Wurm, der sich insbesondere durch die Entwicklung der drei Lippen am Vorderende sowie eine starke Größenzunahme von den larvalen Stadien unterscheidet (Clayton & Duncan, 1979b). Die Wachstumsrate ist umgekehrt proportional zur Stärke der Infektion (Clayton & Duncan, 1977). Nach der Reifung zum adulten Wurm und der Paarung können die Eier im Kot ab Tag 72-110 p. i. gefunden werden (Lyons et al., 1976; Clayton & Duncan, 1977; Clayton & Duncan, 1979b). Die Patenz wird häufig mit 1 Jahr angegeben, selten dauert sie auch bis zu 2 Jahre an (Deplazes et al., 2012a). Untersuchungen hinsichtlich der Eiausscheidung ergaben Werte von bis zu 17.500 Eiern pro Gramm Kot (Epg), welche Schlussfolgerungen auf eine tägliche Ausscheidung von über 50 Millionen Eiern mit dem Kot zulassen (Clayton, 1986). Die Eier befinden sich zum Zeitpunkt der Ablage im Einzellstadium (Kassai, 1999; Anderson, 2000). Die Dauer der Embryonierung sowie der beiden Häutungen zur infektiösen L3 ist von der Umgebungstemperatur abhängig, beansprucht aber mindestens 1-2 Wochen (Kassai, 1999). Begünstigend sind Temperaturen zwischen 25 und 35 °C. Bei niedrigeren Temperaturen kann sich die weitere Entwicklung über Monate erstrecken bzw. wird bei unter 10 °C vorübergehend unterbrochen (Clayton, 1986), während Temperaturen über 39 °C zum Absterben der Larven führen (Southwood et al., 1998).

2.1.1.6 Pathologische und klinische Befunde

Aufgrund des trachealen Wanderweges der Larven kommt es neben Schädigungen der Darmwand auch zu Läsionen in der Leber und der Lunge. Die Leber zeigt als Reaktion nach anfänglichen Hämorrhagien Vernarbungen, die sich makroskopisch in großen milchig-weißen Bindegewebsherden äußern und histologisch durch Infiltrationen mit eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten gekennzeichnet sind (Srihakim & Swerczek, 1978). Ihr Auftreten ist transient. Sterben die Larven jedoch in der Leber ab, bilden sich fibrosierende und verkalkende Granulome (*Chalicosis*) (Käufer-Weiss, 2007). Ähnliche Reaktionen in Form von bis zu 1 cm großen subpleuralen Knoten finden sich in der Lunge: Insbesondere bei Reinfektionen können Larven durch die verstärkte Immunreaktion absterben und Granulome verursachen. Klinisch macht sich dies durch Nasenausfluss, Husten und Fieber bemerkbar. Falls die Larven in den großen Blutkreislauf übertreten, sind derartige Verkalkungen mit Wurmresten auch in anderen Organen anzutreffen (Weiss & Rudolph, 2007).

Da sich die Würmer frei im Darmlumen bewegen und von Darminhalt ernähren, kommt es i. d. R. zu keinen histopathologischen Veränderungen der Darmwand, die als Ursache für die Krankheitssymptome angesehen werden können (Clayton et al., 1980). Klinisch äußern sich Infektionen des Darmes durch ein gestörtes Allgemeinbefinden, in schwereren Fällen machen sie sich auch durch Koliken und Durchfall bemerkbar (Deplazes et al., 2012a). Massiver Spulwurmbefall kann durch die veränderte Darmmotilität Invaginationen oder Obstruktionen hervorrufen; wird die Kapazität der Darmwand durch die Wurmbürde überschritten, besteht die Gefahr der Ruptur mit anschließender Peritonitis und Todesfolge (Kassai, 1999).

Des Weiteren wird von manchen Autoren ein möglicher Zusammenhang zwischen der Verabreichung von Anthelminthika (insbesondere Pyrantelpamoat, PYR, und Ivermectin, IVM) und einer innerhalb von 24 h einsetzenden Koliksymptomatik diskutiert (Cribb et al., 2006). Es wird vermutet, dass durch das gleichzeitige Absterben und die Akkumulation vieler Würmer eine Obstruktion verursacht wird. Zur Prävention wird daher bei einer hohen Infektionsrate die Verwendung von Anthelminthika mit langsamem Wirkungseintritt empfohlen (d. h. BZs) (Cribb et al., 2006; Tatz et al., 2012).

2.1.1.7 Immunologie

Ab einem Alter von 4-6 Monaten entwickelt sich eine partielle Immunität. Diese richtet sich vorwiegend gegen die larvalen Stadien in der Leber und der Lunge und reicht nicht aus, um die präadulten Stadien aus dem Darm vollständig zu eliminieren. Daher können auch ältere Tiere weiterhin Träger einer patenten Infektion sein (Hinney et al., 2011). In diesem Fall nehmen die Läsionen in der Leber und der Lunge zu und nur wenige Larven kehren in den Darm zurück. Dies lässt auf eine starke immunologische Reaktion schließen (Clayton, 1986). Untersuchungen zufolge ist der Parasitenkontakt für die Entwicklung der Immunität nicht erforderlich (Clayton & Duncan, 1979a).

2.1.1.8 Diagnose

Anhand der Anamnese hinsichtlich des Alters, einer möglicherweise bereits bekannten Spulwurmproblematik des Betriebes sowie der insbesondere bei starkem Befall intermittierend im Kot zu findenden präadulten Würmer kann ein Anfangsverdacht erhoben werden. Des Weiteren sprechen die klinische Symptomatik sowie die erhobenen Befunde (Schleimansammlungen in der Lunge und Eosinophilie) für eine Infektion mit *P. equorum*. Der endgültige Nachweis erfolgt koproskopisch durch die Eier nach der Flotation (FEC) (Deplazes et al., 2012a). Neben Eiern mit der typischen braunen Oberfläche treten gelegentlich auch farblose und lichtdurchlässige Eier auf, deren Flotationseigenschaften eingeschränkt sind (Lyons et al., 1996; Kassai, 1999). Der FEC ermöglicht jedoch nur eine verlässliche Aussage auf qualitativer Ebene, da anhand des Ergebnisses kein linearer Zusammenhang mit der tatsächlichen Wurmbürde des Wirtes hergestellt werden kann (Nielsen et al., 2010; Andersen et al., 2013). So zeigte sich, dass der FEC bei einer einmaligen experimentellen Verabreichung infektiöser Larven im Verlauf der Infektion extrem variabel war (Clayton & Duncan, 1977; Clayton & Duncan, 1979b). Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens ist, dass der Nachweis einer Infektion erst mit dem Einsetzen der Patenz möglich ist, d. h. wandernde Larvenstadien, die ebenfalls ein hohes pathologisches Potenzial besitzen aber noch keine Eier ausscheiden, bleiben unentdeckt. Der serologische Nachweis mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, wie er bereits für *A. suum* etabliert werden konnte, war bisher für die Diagnose von *P. equorum* Infektionen nicht möglich (Andersen et al., 2013).

2.1.1.9 Therapie und Bekämpfung

Für die erfolgreiche Behandlung von *P. equorum* Infektionen ist, wie auch bei anderen gastrointestinalen Nematoden, das Zusammenspiel zwischen anthelminthischer Therapie und strukturiertem Weide-/Betriebsmanagement wichtig. Dies sollte insbesondere auch vor dem Hintergrund der zunehmenden Resistenzproblematik berücksichtigt werden.

2.1.1.9.1 Anthelminthische Therapie

Ein wichtiger Aspekt der anthelminthischen Therapie ist die regelmäßige Überprüfung der Wirksamkeit der eingesetzten Wirkstoffe. Es wird empfohlen, dies einmal jährlich mit Hilfe des Eizahlreduktionstests (*Faecal Egg Count Reduction Test*, FECRT) durchzuführen.

Adulte und juvenile Stadien im Darm können oral mit Pro-BZs (Febantel 6 mg/kg Körpergewicht [KGW]) und BZs (Fenbendazol (FBZ) 7,5 mg/kg KGW, Mebendazol oder Oxibendazol 10 mg/kg KGW) sowie mit MLs (IVM 0,2 mg/kg KGW, Moxidectin (MOX) 0,4 mg/kg KGW) und PYR-Verbindungen (PYR-Pamoat 6,6 bzw. 13,2 mg/kg KGW)

(Drudge et al., 1978; Drudge et al., 1979; DiPietro et al., 1987; DiPietro & Todd, 1987; Vandermyde et al., 1987; DiPietro et al., 1989; Austin et al., 1991; Monahan et al., 1995; Reinemeyer et al., 2010; Deplazes et al., 2012b) behandelt werden. Zur Anwendung bei den larvalen Stadien eignen sich IVM und MOX sowie FBZ (DiPietro & Todd, 1987; Vandermyde et al., 1987; DiPietro et al., 1989; Monahan et al., 1995; Love, 2003), allerdings ist die Wirksamkeit des IVM hier eingeschränkt (DiPietro et al., 1987; French et al., 1988; Daurio & Leaning, 1989). Levamisol (LEV) weist ebenso eine hohe Wirksamkeit auf, wird aber wegen der geringen therapeutischen Breite i. d. R. nicht verwendet (Austin et al., 1990). Detaillierte Behandlungsschemata sind der Literatur zu entnehmen (von Samson-Himmelstjerna et al., 2011). Die Anwendung von Anthelminthika erfordert auch immer die Berücksichtigung der individuellen Bestandsstruktur, wie z. B. der demographischen Zusammensetzung der Wirtstiere. Des Weiteren ist zu bedenken, dass Pferde häufig Mischinfektionen aufweisen und somit mehrere Spezies gleichzeitig im Focus stehen sollten (Nielsen, 2012). Hierfür gibt es mehrere Herangehensweisen, die in erster Linie als metaphylaktische Maßnahmen gegenüber dem Befall mit Strongyliden aber auch Bandwürmern durchgeführt werden. Dazu ist auch der regelmäßige Wechsel zwischen den einzelnen Wirkstoffklassen zu zählen, um einer Selektion auf Resistenz gegen eine bestimmte Klasse vorzubeugen (Love, 2003).

Selektive Behandlungsstrategien, wie sie bei anderen Wirtsspezies angewendet werden und gegebenenfalls auch für ausgewachsene Pferde (> 4 Jahre) denkbar sind, sind nicht für die Behandlung von *P. equorum*-Infektionen geeignet, da die Immunität der Jungtiere zu diesem Zeitpunkt noch nicht in dem Maße entwickelt ist, um einer Infektion standhalten zu können (von Samson-Himmelstjerna et al., 2011). Grundsätzlich sollte auch immer bedacht werden, dass eine vollständige Wurmelimination häufig nicht möglich ist und die Behandlung in erster Linie einer reduzierten Eiausscheidung und damit einhergehend einer geringeren Umgebungskontamination dient (Nielsen, 2012).

2.1.1.9.2 Bekämpfungsmaßnahmen

Neben der anthelminthischen Behandlung mittels Chemotherapeutika sind auch Maßnahmen zur Bekämpfung von entscheidender Bedeutung. Eine wichtige Rolle spielt hier v. a. die Dekontamination der Umgebung (Fritzen et al., 2010). Zum einen dient diese der Vorbeugung einer horizontalen Übertragung der Parasiten, zum anderen wird dadurch die Gefahr der Reinfektion durch Koprophagie vermindert (Lyons et al., 1996).

Die erfolgreiche Bekämpfung erweist sich aufgrund der hohen Reproduktionsrate von *P. equorum* als problematisch: Ein Weibchen kann bis zu 200.000 Eier pro Tag abgeben (Austin et al., 1990). Andererseits erschwert auch die hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Austrocknung, niedrigen Temperaturen und chemischen Substanzen die Umgebungsdekontamination, sodass embryonierte Eier leicht überwintern können und über Jahre in der Umgebung überleben (Clayton, 1986; Kassai, 1999). Über ihre klebrige Oberfläche verfügen die Eier außerdem über gute Haftungseigenschaften an Oberflächen (Clayton, 1986) und stellen dadurch bei unzureichender Stallhygiene und in Abhängigkeit vom Bodenprofil ein großes Risiko für Reinfektionen dar (Ihler, 1995; Lyons et al., 1996). Neben der Stallhygiene ist auch das Absammeln des Kotes von der Weide eine geeignete Maßnahme, um den Infektionsdruck zu senken (Deplazes et al., 2012a). Durch dessen richtige Kompostierung kann im weiteren Verlauf die Entwicklungsfähigkeit der darin enthaltenen Eier signifikant reduziert werden (Gould et al., 2013).

2.1.2 *Caenorhabditis elegans*

2.1.2.1 Taxonomie

Ebenso wie *P. equorum* gehört auch *C. elegans* dem Stamm der Nematoda an. Diese Art, sowie 24 weitere Spezies des Genus *Caenorhabditis*, wird der Klade V (Rhabditina) nach Blaxter et al. (1998) bzw. 9 nach Holterman et al. (2006) und van Megen et al. (2009) zugeordnet. Die taxonomische Einteilung wird bei NCBI folgendermaßen (Taxonomie-ID: 6239) angegeben:

Eukaryota (Superregnum)
Opisthokonta
Metazoa (Regnum)
Eumetazoa
Bilateria
Protostomia
Ecdysozoa
Nematoda (Phylum)
Chromadorea (Classis)
Rhabditida (Ordo)
Rhabditoidea (Superfamilia)
Rhabditidae (Familia)
Peloderinae (Subfamilia)
Caenorhabditis (Genus)

2.1.2.2 Morphologie

Bei *C. elegans* handelt es sich um einen ca. 1 mm langen und 65 µm breiten freilebenden Erdnematoden, der aufgrund verschiedener Eigenschaften häufig als Modellorganismus herangezogen wird. Es werden zwei Geschlechter unterschieden: Zum einen die meist selbstbefruchtenden Hermaphroditen, die auch die Arbeit mit Stämmen ermöglichen, die aufgrund ihrer genetischen Veränderungen nicht in der Lage sind, sich zu paaren. Zum anderen die männlichen Tiere, die für genetische Kreuzungen verwendet werden können. Ihr Anteil an der Population beträgt 0,1-0,2 % (Corsi, 2006). Die zwittrigen Individuen besitzen insgesamt 1090 somatische Zellen, von denen jedoch 131 noch vor Erreichen des adulten Stadiums durch Apoptose absterben; die männlichen Individuen besitzen hingegen 1031 somatische Zellen. Somit handelt es sich bei *C. elegans* um eine Art mit konstanter Zellzahl (Eutelie) (Johnson & Nelson, 1991).

Im Rahmen des *C. elegans* Genom Projektes, das 1998 finalisiert wurde, konnte für *C. elegans* als erstem multizellulären Organismus das Genom mit einer Größe von 97 Mbp entschlüsselt werden (Consortium, 1998). Die genetische Information ist auf fünf Autosomen sowie einem X-Chromosom verteilt (Waterston et al., 1997).

2.1.2.3 Entwicklungszyklus

Die Entwicklung von *C. elegans* beginnt im Hermaphroditen mit der Embryogenese im Ei. Sie wird nach der Eiablage in der Umwelt fortgesetzt und von vier verschiedenen Larvalstadien, die jeweils durch Häutungen abgegrenzt sind, gefolgt. Schließlich wird die

hohe Reproduktionsrate von 300 (nach Selbstbefruchtung) bis 1000 (nach Paarung) Nachkommen eines einzelnen Wurmes (Corsi, 2006) und (3) die nicht-parasitische Lebensweise, die die Anzucht auf mit dem *Escherichia coli*-Stamm OP50 inokulierten Agarplatten bzw. in Flüssigkulturen ermöglicht. Zusätzlich besteht außerdem die Möglichkeit des Einfrierens bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. in Flüssigstickstoff (Stiernagle, 2006). Ein weiterer Vorteil ist, dass *C. elegans* in jedem Stadium seiner Entwicklung transparent ist, was die mikroskopische Beobachtung innerer Strukturen ermöglicht. Darüber hinaus erlaubt dies die Verwendung fluoreszierender Marker, wie z. B. des *Green-Fluorescent-Proteins* (GFP), um Zellen im lebenden Organismus zu markieren (Chalfie et al., 1994). Im Gegensatz zu anderen Tiermodellen können mit Hilfe von *C. elegans* genetische Analysen i. d. R. schnell und kostengünstig durchgeführt werden. Des Weiteren können phänotypische Ausprägungen und physiologische Reaktionen direkt am Tier überprüft werden, was bei der Verwendung von Zellkultursystemen und Hefesystemen nicht möglich ist (Artal-Sanz et al., 2006). Der Einsatz eines *Worm-Sorters* (z. B. COPAS, www.unionbio.com) erlaubt außerdem die Anwendung im Rahmen des *High-Throughput-Screenings*.

Die Beliebtheit, die dieser Nematode daher in der Wissenschaft erfahren hat, wurde zudem dadurch gesteigert, dass für *C. elegans* als erstem Tier die vollständige Sequenz des Genoms vorlag (*C. elegans*: $10^8\text{ bp} = 20\times E. coli$, $\frac{1}{2}\times Drosophila melanogaster$) (Consortium, 1998). Dies ermöglichte es, neben Untersuchungen zur Veränderung des Phänotyps auch den Genotyp miteinzubeziehen.

2.1.2.4.2 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus für parasitische Nematoden

Aufgrund der unter Punkt 2.1.2.4.1 erwähnten Vorteile wird *C. elegans* häufig stellvertretend als Modell für parasitische Nematoden verwendet, z. B. auch beim Screening von Substanzen auf deren potenzielle anthelminthische Wirkung (Simpkin & Coles, 1981). Ebenso wie bestimmte Ereignisse im Entwicklungszyklus von Parasiten (z. B. Auffinden von Geschlechtspartnern, Wanderung innerhalb des Wirtes) ist auch der Eintritt in das Dauerstadium bei *C. elegans* pheromongesteuert und bietet sich daher für die Untersuchung als möglicher Angriffspunkt von Wirkstoffen an (Bürglin et al., 1998).

Des Weiteren hat sich *C. elegans* als sehr nützlich erwiesen, die Wirkmechanismen der drei großen Anthelminthikaklassen, insbesondere die der MLs (Cully et al., 1996; Vassilatis et al., 1997; Dent et al., 2000), aufzuklären. Untersucht werden verschiedene Parameter: das Überleben, die Entwicklung, Bewegung, Pharynxaktivität sowie die Reproduktionsfähigkeit (Simpkin & Coles, 1981; Bernt et al., 1998; Link et al., 2000; Hart, 2006; James & Davey, 2007).

Eine weitere Besonderheit von *C. elegans* besteht in der Möglichkeit der Erzeugung transgener Linien. Durch Mikroinjektion kann Fremd-DNA in die synzytiale Keimbahn der Gonaden des *C. elegans*-Hermaphroditen eingeführt und somit in der F1-Generation exprimiert werden (Stinchcomb et al., 1985). Zu beachten ist, dass die extrachromosomal in vielen Kopien vorliegende DNA meist nur transient weitergegeben wird. Nur ca. 2-5 % der transgenen Tiere geben die injizierte DNA über die Keimbahn weiter, wodurch es zu einer semistabilen Übertragung kommt (Bürglin et al., 1998). Aus diesem Grund folgt die Vererbung nicht den Mendel'schen Regeln und variiert bis zu einem gewissen Grad (Grant, 1992). Grundsätzlich ist aber auch der chromosomale Einbau der DNA möglich, durch den es zu einer stabilen Vererbung auf die nächsten Generationen kommt (Fire, 1986).

Verwendet werden transgene Tiere häufig im Rahmen von *Rescue*-Experimenten. Hierbei wird die Funktion von Genen entsprechender *C. elegans*-*Knock-out*-Stämme durch die Einführung von Orthologen beispielsweise parasitischer Nematoden wiederhergestellt. Dies ermöglicht deren funktionelle Untersuchung sowie die Bestimmung von unter Nematoden

2 LITERATURÜBERSICHT

konservierten Expressionsmustern (Grant, 1992; Gilleard, 2004). Neben der zu untersuchenden DNA wird meist ein Transformationsmarker injiziert, welcher der Identifizierung transgener Tiere dient. Häufige Verwendung findet z. B. das *rol-6(su1006)*, das einen Roller-Phänotyp verursacht, bei dem sich die Tiere korkenzieherartig fortbewegen (Kramer et al., 1990; Mello et al., 1991). Ein Vorteil ist die Identifizierung unter einem einfachen Durchlichtmikroskop. Von Nachteil sind die erschwerte Untersuchung bestimmter Zelltypen aufgrund der Bewegung, die nicht immer mögliche Expression, da der Phänotyp in manchen Stämmen unterdrückt wird, und die geringere Reproduktionsrate. Die Übertragung von *gfp* stellt dagegen eine geeignete Alternative dar, bei der die erfolgreiche Expression in somatischen Zellen mit Hilfe von Ultraviolett (UV)-Strahlung oder Blaulicht überprüft werden kann (Chalfie et al., 1994). Dies setzt allerdings die Verfügbarkeit einer entsprechenden Lichtquelle voraus. Häufige Anwendung findet *gfp* auch bei der Analyse von Expressionsmustern (Bürglin et al., 1998).

Trotz aller Vorteile, die die Verwendung von *C. elegans* als Stellvertreter verschiedener parasitischer Nematoden bei der Untersuchung bestimmter Parameter bietet, müssen auch die limitierenden Faktoren beachtet werden. Der Stamm der Nematoden ist äußerst vielfältig und die Übertragbarkeit von Ergebnissen, die für einen freilebenden Nematoden gelten, ist nicht unbedingt für alle parasitisch lebenden und u. U. phylogenetisch entfernt verwandten Nematoden gegeben (Geary & Thompson, 2001; Blaxter, 2011). Zum einen müssen die unterschiedlichen Umweltbedingungen, die für die Entwicklung der Nematoden erforderlich sind und mit dem Parasitismus einhergehen, berücksichtigt werden. Geringste Verhaltensänderungen des Parasiten können *in vivo* die Austreibung aus dem Darm und somit das Absterben zur Folge haben, während gleiche Wirkstoffkonzentrationen bei dem unter optimalen Laborbedingungen gehaltenen Modellorganismus *C. elegans* kaum Effekte zeigen (Geary et al., 1999; Geary & Thompson, 2001; Gilleard, 2006). Zum anderen ist zu beachten, dass $\geq 30\%$ der Gene parasitischer Nematoden kein entsprechendes Homolog in *C. elegans* aufweisen. Diese Zahl relativiert sich allerdings, sobald berücksichtigt wird, dass für den Vergleich mit *C. elegans* häufig *Expressed Sequence Tags* (ESTs) infektiöser Parasitenstadien herangezogen werden, die wahrscheinlich die größten Unterschiede zu den freilebenden Nematoden aufweisen und dass sich die Unterschiede zwischen den parasitären Spezies in einem ähnlichen Rahmen bewegen (Geary & Thompson, 2001). Darüber hinaus muss differenziert werden, welche Organsysteme untersucht werden. So zeigte sich beispielsweise, dass der Aufbau des Nervensystems zwischen *C. elegans* und *A. suum* weitestgehend konserviert ist (Stretton et al., 1991; Davis & Stretton, 1996), was aufgrund der phylogenetischen Distanz dieser beiden Spezies darauf schließen lässt, dass der Aufbau auch auf andere Nematoden übertragbar ist (Geary & Thompson, 2001).

Aus diesen Gründen ist es schwierig, allgemeingültige Aussagen darüber zu treffen, in welchen Fällen sich *C. elegans* für die Beantwortung bestimmter Fragestellungen bei parasitischen Nematoden eignet. Dies muss immer vor dem Hintergrund der vielfältigen phylogenetischen, morphologischen und ontogenetischen Hintergründe beurteilt werden aber auch in Hinblick auf die zu untersuchende Wirkstoffklasse (Geary & Thompson, 2001). Grundsätzlich bietet sich *C. elegans* aber sicherlich eher als Modell für Parasiten der Kladen III-V bzw. 3-12 als der der Kladen I und II bzw. 1 und 2 an, da erstere alle der Unterklasse der Chromadoria zuzuordnen sind (Blaxter et al., 1998; Holterman et al., 2006; van Megen et al., 2009).

2.1.2.4.3 *Caenorhabditis elegans* Stämme

In den letzten Jahren wurden zahlreiche sich geno- und phänotypisch vom Wildtypstamm Bristol N2 unterscheidende Stämme des Modellorganismus hergestellt. Diese werden in

Institutionen wie dem 'Caenorhabditis Genetics Center' (CGC) und dem 'National Bioresource Project (NBRP) for the Experimental Animal „Nematode *C. elegans*“' gesammelt und für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Das CGC ist der University of Minnesota, Twin Cities, angegliedert und wird seit 1978 betrieben (www.cbs.umn.edu/cgc). Neben den bereits verfügbaren Stämmen ist es hier außerdem möglich, Stämme mit bestimmten Deletionsallelen in Auftrag zu geben (www.celeganskoconsortium.omrf.org). Das NBRP wurde 2002 gestartet und wird in Tokyo verwaltet (www.shigen.nig.ac.jp/c.elegans/index.jsp).

Die Funktion eines Gens wird häufig durch dessen Veränderung untersucht. Diese kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden: Eine Möglichkeit ist der Einsatz von Mutagenen wie Trimethylpsoralen (TMP)/UV-Strahlung, Diepoxybutan und Ethylmethansulfonat (EMS), die zu zufälligen Punktmutationen oder kleinen Deletionen in einer großen Anzahl an Individuen führen (Barstead, 1999; Ahringer, 2006; Corsi, 2006). Am besten eignen sich hierfür L3 und L4, da sich die Zellen der Keimbahn hier in der Mitose befinden und die DNA somit repliziert wird (Barstead, 1999). Nach der Reproduktion über zwei Generationen, die die Homozygotie der Mutationen gewährleisten soll, werden die Würmer mit dem gewünschten Phänotyp selektiert und die für diesen verantwortlichen Mutationen durch Sequenzierung oder Restriktionsanalyse detektiert, wodurch ein Rückschluss auf das betroffene Gen möglich ist (Artal-Sanz et al., 2006). Dieser Ansatz, bei dem der genetische Hintergrund für einen bestimmten Phänotyp gesucht wird, wird auch als *Forward Genetics* bezeichnet.

Unter *Reverse Genetics* versteht man dagegen die gezielte Veränderung eines (bekannten) Gens und die nachfolgende Untersuchung des Phänotyps. Dies ermöglicht die Untersuchung aller Gene einer Familie und wird durch die vollständige Sequenzierung des *C. elegans* Genoms ermöglicht. Häufige Anwendung findet bei *C. elegans* in diesem Zusammenhang das Verfahren der Ribonukleinsäure-Interferenz (RNAi), bei der doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) des Zielgens in die Würmer überführt wird (Fire et al., 1998). Diese tritt mit der komplementären *messenger*-RNA (mRNA) in Wechselwirkung, ruft dadurch deren Abbau hervor und verhindert die Translation. Die Übertragung der dsRNA kann durch Mikroinjektion, Inkubation oder Fütterung erfolgen (Ahringer, 2006). Für *C. elegans* bestehen RNAi-Banken, die nahezu jedes Gen des Genoms abdecken (Kamath et al., 2003). Es handelt sich bei dieser Methode um einen *Gen-Knock-down*, bei dem die Genfunktion nur vorübergehend oder teilweise unterbunden wird. Ist hingegen ein *Gen-Knock-out*, also das vollständige Erliegen der Genfunktion, erwünscht, ist bei *C. elegans* die Mutagenese unter Anwendung unspezifischer Mutagene wie z. B. TMP/UV oder EMS erforderlich. Im Anschluss wird ein Teil der Population mit Hilfe genspezifischer Primer, die sich entweder über das gesamte Leseraster oder einen bestimmten Bereich erstrecken, auf eine Deletion untersucht (Jansen et al., 1997; Liu et al., 1999). Das Verfahren der *Reverse Genetics* eignet sich im Gegensatz zu den *Forward Genetics* insbesondere für die Untersuchungen aller Gene einer Genfamilie. Auch die Verfügbarkeit der vollständigen Genomsequenzen von einer zunehmenden Anzahl von Organismen, lässt die Bedeutung dieses Ansatzes zukünftig noch steigen (Ahringer, 2006).

2.2 Anthelminthika

Es gibt drei große Wirkstoffklassen, die in der Behandlung von Helminthosen beim Pferd zum Einsatz kommen: Die MLs, die BZs und die Tetrahydropyrimidine. Außerdem sind im Fall der MLs und der BZs Kombinationspräparate mit Praziquantel bzw. Piperazin erhältlich, die eine nahezu vollständige Abdeckung des gesamten equinen Helminthenspektrums erlauben. Auf welchem Weg der Parasit das Molekül aufnimmt, hängt von dessen chemischen Eigenschaften sowie den anatomischen Gegebenheiten des Parasiten ab. Kleinere, lipophile Moleküle (z. B. LEV, PYR) gelangen z. B. auf passivem Weg durch die Kutikula ins Wurminnere (Mehlhorn & Piekarski, 2002). Dies ist insbesondere bei Helminthen mit schwach ausgebildetem Gastrointestinaltrakt (z. B. Filarien) oder einem Tegument (z. B. *Fasciola*, *Moniezia*) der Fall, während diese Aufnahmeform bei Helminthen mit einer gut ausgebildeten Kutikula wie z. B. Askariden weniger stark ausgebildet ist (Mehlhorn & Piekarski, 2002; Mottier et al., 2006).

Um die Hintergründe der Resistenzentwicklung gegenüber anthelminthischen Wirkstoffen zu verstehen, ist die Kenntnis ihrer pharmakologischen Eigenschaften von entscheidender Bedeutung. Diese sollen in den folgenden Abschnitten mit dem Schwerpunkt auf den MLs näher beleuchtet werden.

2.2.1 Makrozyklische Laktone

2.2.1.1 Allgemeines

Avermectine (AVM) und Milbemycine, beide Gruppen werden im Folgenden als MLs zusammengefasst, zeichnen sich besonders durch ihr breites Wirkungsspektrum aus, das neben adulten auch die larvalen Stadien zahlreicher Nematoden sowie ektoparasitische Arthropoden umfasst; ein Umstand, der den AVMs zu ihrem Namen verholfen hat (*A* = ohne, *verm* = Wurm, *ect* = Ektoparasit, *in* = pharmazeutisches Produkt). Der wichtigste Vertreter der AVMs ist das IVM. Es wurde, wie auch andere Vertreter dieser Gruppe, im Rahmen eines Screening-Programmes der Merck, Sharp and Dohme Research Laboratories in New Jersey in Kooperation mit dem Kitasato Institut in Japan entdeckt (Campbell, 1993). Des Weiteren sind den AVMs noch das Abamectin (ABM), Doramectin (DRM), Eprinomectin (EPM) und das Selamectin (SLM) zuzurechnen. Hierbei handelt es sich um Mischungen acht verschiedener Fermentationsprodukte des Bakteriums *Streptomyces avermitilis* (Tabelle 7) (Shoop et al., 1995a; Martin et al., 2002). Seine chemische und radiäre Mutagenese sowie die Entwicklung erforderlicher Fermentationsprozesse erhöhte die Produktivität und ermöglichte 1981 die Markteinführung des IVM als erstem ML (Shoop et al., 2002). Bereits nach 5 Jahren war es in 46 Ländern zur Behandlung zugelassen (Omura & Crump, 2004) und zählt heute zu den am häufigsten verwendeten Anthelminthika der Veterinärmedizin (Prichard & Roulet, 2007).

Zu den Milbemycinen (*Milbe*, *myc* = Pilz, *in* = pharmazeutisches Produkt) wird das Milbemycin D gerechnet, das ein Produkt von *Streptomyces hygroscopicus* ist sowie das MOX, welches ein halbsynthetisches Derivat des Fermentationsproduktes Nemadectin von *Streptomyces cyanogriseus* subsp. *noncyanogenus* ist (Martin et al., 2002).

Die hohe antiparasitäre Potenz ermöglicht es, diese Wirkstoffgruppe in geringen Dosierungen und somit in kleinen Volumina zu verabreichen. Ein weiterer Vorteil ist die Lipophilie, durch die eine schnelle Absorption von der Applikationsstelle gewährleistet wird (Hennessy & Alvinerie, 2002). Neben dem eingangs bereits erwähnten einzigartigen Wirkungsspektrum trug nicht zuletzt auch seine Verfügbarkeit zu einem Zeitpunkt, an dem Resistenzen gegenüber den anderen Wirkstoffklassen (BZs, LEV) an Bedeutung gewannen, dazu bei, dass

IVM innerhalb von nur 2 Jahren zum Marktführer im Bereich der Antiparasitika wurde (Omura & Crump, 2004).

2.2.1.2 Chemische Eigenschaften

Gemeinsam ist den AVMs und Milbemycinen der 16gliedrige Makrolidring, der mit einem für die pharmakologische Potenz bedeutenden Benzofuranring und einer Spiroeinheit verbunden ist (Albers-Schönberg et al., 1981; Lynagh & Lynch, 2012). Der größte Unterschied zwischen den beiden ML-Gruppen liegt in einer bei den AVMs vorhandenen Disaccharidgruppe am C-13 (Abbildung 3), die den Milbemycinen fehlt und eine entscheidende Bedeutung bei der Interaktion zwischen MLs und Pgps spielt (Lespine et al., 2007). Des Weiteren besitzt MOX im Gegensatz zu IVM am C-25 einen Alkenrest sowie eine spezifische Methoxy-Gruppe am C-23. MOX wird aufgrund seiner veränderten chemischen und biologischen Aktivitäten auch als ML der zweiten Generation bezeichnet (Cobb & Boeckh, 2009).

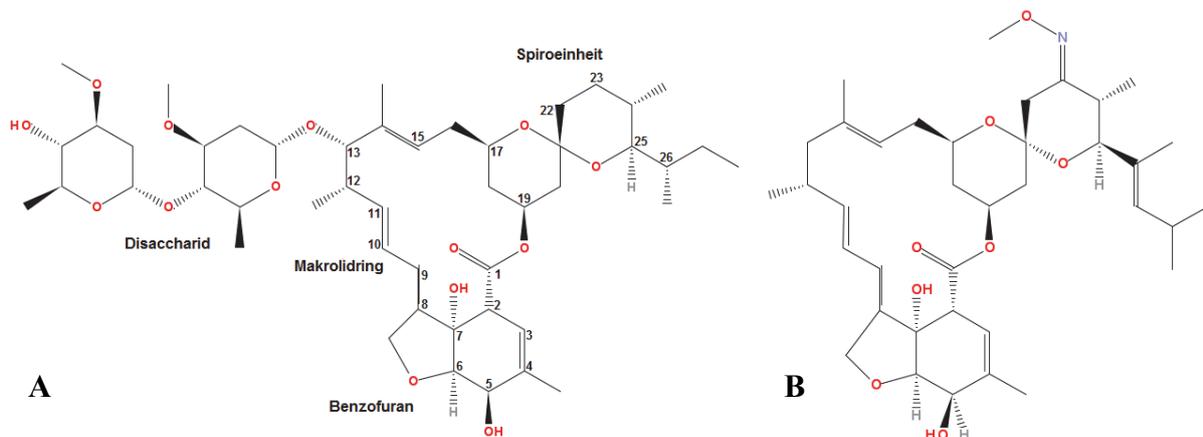


Abbildung 3: Strukturformel von (A) Ivermectin (Avermectin B_{1a}) und (B) Moxidectin

Man unterscheidet bei den AVMs zwischen jeweils vier homologen Derivaten der A- (AVM A_{1a}, 1b, 2a, 2b) und der B-Gruppe (AVM B_{1a}, 1b, 2a, 2b) (Tabelle 7), wobei der Letzteren, und hier besonders den B₁-Homologen, eine größere anthelminthische Wirkung und das breiteste Wirkungsspektrum zugeschrieben wird.

Das durch selektive Hydrierung synthetisierte 22, 23-Dihydro-AVM B₁ wird unter dem Freinamen IVM vertrieben. Es zeichnet sich bei unveränderter antiparasitärer Potenz durch eine höhere toxikologische Sicherheit als das ABM aus. IVM ist ein Gemisch der halbsynthetischen Homologe 22, 23-Dihydro-AVM B_{1a} (> 80 %) und 22, 23-Dihydro-AVM B_{1b} (< 20 %). Beide Komponenten unterscheiden sich in Bezug auf ihre Struktur nur an dem nicht an der Bindung beteiligten C-25, weshalb neben der mangelnden Praktikabilität auch keine Notwendigkeit besteht, diese bei der Synthese voneinander zu trennen (Shoop et al., 1995a; Lynagh & Lynch, 2012). Aufgrund einer höheren Anwendungssicherheit wurde durch die bereits erwähnte Hydrierung der B₁-Gruppe eine Annäherung an die Konformation der B₂-Homologe vollzogen und somit die anthelminthische Wirkung der einen Gruppe mit dem Sicherheitsfaktor der anderen kombiniert (Campbell, 1993; Shoop et al., 2002).

Das Molekulargewicht von IVM beträgt 875. Es handelt es sich um ein weißliches Pulver, dessen hohe Lipophilie und geringe Wasserlöslichkeit (4 mg/l) in wässriger Lösung die Adhäsion an Glas- oder Plastikwänden begünstigt (Campbell, 1993).

2.2.1.3 Pharmakodynamik

Entgegen erster Annahmen, nach denen der primäre Effekt der MLs bei Nematoden in der Funktion als γ -Aminobuttersäure (GABA)-Agonist liegt (Campbell et al., 1983), ließen elektrophysiologische Untersuchungen an Muskelpräparationen von *A. suum* auf die Beteiligung anderer Ionenkanäle schließen (Martin & Pennington, 1989). Kurze Zeit später zeigte sich, dass bei Nematoden in erster Linie bestimmte Untereinheiten der Glutamat-gesteuerten Chloridionenkanäle (GluCl) für die Sensitivität gegenüber den MLs verantwortlich sind (Arena et al., 1992; Cully et al., 1994; Dent et al., 1997; Vassilatis et al., 1997; Dent et al., 2000; Horoszok et al., 2001). Diese ligandengesteuerten Kanäle, die ebenfalls wie die GABA- und Glycin-gesteuerten Cl⁻-Kanäle zu der Familie der *Cys-loop*-Rezeptoren gehören, sind spezifisch für Invertebraten wie Insekten, Nematoden und Crustacea, treten aber nicht bei Vertebraten auf, wodurch sich der hohe Sicherheitsindex der MLs erklären lässt (Martin et al., 2002). Obwohl es zwischen den Arten zu Abweichungen hinsichtlich der Zusammensetzung kommt, ist der grundlegende Aufbau mit fünf entweder identischen oder homologen Untereinheiten und einer zentralen Pore immer gegeben (Wolstenholme & Rogers, 2005). Letztere ist vorwiegend positiv geladen, woraus die selektive Permeabilität des Kanals für Anionen resultiert (Martin et al., 1997). Die Bindung des Glutamats führt durch die Öffnung des Kanals und den damit verursachten kurzzeitigen Cl⁻-Einstrom zu einer Hyperpolarisation der Membran, was einen reversiblen inhibitorischen Effekt auf die neuromuskuläre Übertragung zur Folge hat (Dent et al., 1997).

Im Gegensatz zu der Bindung des natürlichen Liganden erfolgt die Aktivierung der Kanäle durch MLs deutlich langsamer, aber mit einer erheblich höheren Affinität und irreversibel (Wolstenholme, 2012). Bei niedrigen ML-Konzentrationen kommt es zu einer Potenzierung der natürlichen Ligandenwirkung, während sich bei höheren Konzentrationen die Wirkung über die direkte Aktivierung der Kanäle entfaltet (Arena et al., 1992; Cully et al., 1994). Die Bindung erfolgt allerdings nicht wie die des Glutamats an der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der MLs assoziieren diese vielmehr mit der Zellmembran, wodurch eine Interaktion mit den Untereinheiten im Bereich der Porenregion nahe dem extrazellulären Kompartiment eingegangen wird. Auf die hydrophoben Eigenschaften ist auch der irreversible Effekt der MLs zurückzuführen, durch die die Diffusion der Moleküle nur langsam erfolgt (Geary & Moreno, 2012).

Es wird vermutet, dass die Bindung zwei Konformationsänderungen des Kanals nach sich zieht: Einerseits treten lokale Veränderungen in der Umgebung der Bindungsstelle auf, die die Affinität zwischen IVM und Rezeptor erhöhen, andererseits geht der gesamte Rezeptor vom geschlossenen in den geöffneten, aktivierten Zustand über (Hibbs & Gouaux, 2011). Die Folge ist ein zelleinwärts gerichteter Cl⁻-Strom. Die anhaltende Hyperpolarisation der Zellmembran verhindert das Entstehen weiterer Aktionspotenziale und führt somit zu einer funktionellen Paralyse der GluCl-exprimierenden Strukturen (Muskeln und Neuronen). Betroffen sind durch die MLs vorwiegend die Nahrungsaufnahme, die Motilität sowie die Fortpflanzungsfähigkeit (Eiablage) suszeptibler Nematoden (Geary & Moreno, 2012).

Die Nahrungsaufnahme wird durch die Bindung der MLs an die GluCls der Muskelzellen des Pharynx beeinflusst (Martin, 1996; Adelsberger et al., 1997; Pemberton et al., 2001). Die hierdurch hervorgerufene Inhibition der Pumpaktivität führt aufgrund der langen Persistenz der MLs im Organismus schließlich zum Absterben des Parasiten (Avery & Horvitz, 1990; Geary et al., 1993; Brownlee et al., 1997). Dies ist entweder die Folge der Nahrungsdeprivation oder des Verlusts des inneren Turgors durch die fehlende Pharynxaktivität (Wolstenholme & Rogers, 2005). Neben der hemmenden Wirkung der MLs auf die Pharynxmuskulatur ist ihre Wirkung außerdem durch ihren paralytischen Effekt auf die Körperwandmuskulatur gekennzeichnet. Die sinusoidale Schwimmbewegung der

Nematoden wird durch die abwechselnde Relaxation und Kontraktion der dorsalen und ventralen Muskulatur vermittelt, deren Innervation durch exzitatorische und inhibitorische Motoneuronen des dorsalen und ventralen Nervenstranges erfolgt (Wolstenholme & Rogers, 2005). Kass et al. (1980) zeigten durch die selektive Applikation von AVM auf die dorsale bzw. ventrale Hälfte von *A. suum*, dass der Wirkstoff zum einen die Übertragung zwischen Interneuronen und exzitatorischen Motoneuronen des ventralen Nervenstranges hemmt, zum anderen die Übertragung zwischen inhibitorischen Motoneuronen und Muskeln inhibiert, was das Vorkommen von GluCl an den entsprechenden Strukturen voraussetzt (Delany et al., 1998; Jagannathan et al., 1999; Dent et al., 2000; Portillo et al., 2003). Somit werden sowohl relaxierende als auch kontrahierende Effekte hervorgerufen, deren Resultat eine Paralyse ist, die schließlich zur Ausscheidung des Wurmes führt. Dieser Effekt tritt bereits wenige Stunden nach der ML-Verabreichung ein, d. h. zum Zeitpunkt hoher Wirkstoff-Anflutungen. In Abhängigkeit von der Zeit und ML-Konzentration wird außerdem *in vitro* eine temporäre Hyperaktivitätsphase beobachtet, in der *C. elegans* eine gesteigerte Motilität zeigt (Ardelli et al., 2009). Im Laufe abfallender Wirkstoffspiegel überwiegt schließlich der Effekt auf die Pharynxmuskulatur (Gill & Lacey, 1998). Neben den beschriebenen Strukturen finden sich GluCl-Untereinheiten bei Motoneuronen, die den dorsalen und ventralen Nervenstrang miteinander verbinden, sowie bei Kommandointerneuronen im Kopfbereich, die die Motoneuronen kontrollieren (Wolstenholme & Rogers, 2005).

Des Weiteren wird den AVMs eine Wirkung auf die GluCl der Uterusmuskulatur zugeschrieben, welche mit Auswirkungen auf die Eilegerate einhergeht und daher die Fortpflanzungsfähigkeit suszeptibler Nematoden beeinträchtigt (Prichard, 2002). Zudem wurde die Expression bestimmter GluCl-Untereinheiten in extrapharyngealen Neuronen des Kopfes nachgewiesen und wird in Neuronen, die in sensorischen Organen in der Kopffregion (Amphiden) lokalisiert sind, vermutet (Dent et al., 2000; Wolstenholme & Rogers, 2005). Welcher Effekt in der Bedeutung für die antiparasitäre Wirkung überwiegt, scheint zwischen den Arten zu variieren (Prichard & Roulet, 2007): Bei Trichostrongyliden und *C. elegans* erwies sich der Pharynx als das Organ mit der höchsten Sensitivität gegenüber MLs (Wolstenholme & Rogers, 2005), wohingegen bei den Filarien die Unterdrückung der Mikrofilarienproduktion in den Vordergrund tritt (Duke et al., 1991; Lok et al., 1995). Artspezifische Unterschiede der intrinsischen Suszeptibilität gegenüber MLs sind auf verschiedene pharmakologische Faktoren zurückzuführen: Neben der Quantität der GluCl im Zielgewebe trägt hierzu auch ihre Zusammensetzung bzw. der jeweilige Anteil des entsprechenden Typus bei (Yates et al., 2003; Glendinning et al., 2011; Geary & Moreno, 2012).

Neben den GluCl als primärem und den GABA-sensitiven Cl⁻-Kanälen als sekundärem Ziel, gibt es weitere ligandengesteuerte Cl⁻-Kanäle, denen eine entsprechende Sensitivität zugesprochen wird (Prichard et al., 2012).

2.2.1.4 Pharmakokinetik

MLs werden nach oraler oder parenteraler Verabreichung aufgrund ihrer Lipophilie schnell in die Blutbahn aufgenommen und reichern sich insbesondere im abdominalen und subkutanen Fettgewebe an, das sie langsam wieder freisetzt. Ein weiteres Organ hoher Persistenz ist die Leber, wohingegen nur geringe Mengen in der Muskulatur und den Nieren gefunden werden (Cobb & Boeckh, 2009). Nach oraler Verabreichung (0,2 mg/kg KGW) zeigt IVM beim Pferd folgendes pharmakokinetisches Verhalten während der Absorptions- und Verteilungsphase: Die maximale Plasmakonzentration wird nach 3,3-9,2 h erreicht. Die Literaturangaben zur maximalen Plasmakonzentration (21,4-82,3 ng/ml), Bioverfügbarkeit (46,1-200,9 ng×d/ml), Eliminationshalbwertszeit (2,8-6,5 Tage) und mittleren Verweildauer (*Mean Residence Time*,

MRT) (2,3-7,3 Tage) weichen ebenfalls z. T. beträchtlich voneinander ab (Marriner et al., 1987; Pérez et al., 1999; Gokbulut et al., 2001; Perez et al., 2003; Gokbulut et al., 2010), was u. a. auf rasstypische Ausprägungen zurückgeführt wird (McKellar & Gokbulut, 2012). Der Zeitraum, in dem die Ursprungssubstanz bei einer Detektionsgrenze von 0,1 ng/ml im Plasma messbar ist, erstreckt sich von ca. 30 min bis 30 Tage nach der oralen Eingabe (Pérez et al., 1999). Die Elimination erfolgt fast ausschließlich über den Darm und nur zu einem geringen Anteil über die Niere. Bereits 4 Tage nach der oralen Verabreichung werden > 90 % des kaum metabolisierten IVM mit dem Kot ausgeschieden (Pérez et al., 2001). Aus diesem Grund kommt dem aktiven Transport in das Darmlumen durch entsprechende Proteine (z. B. Pgps) und somit der Ausscheidung mit den Fäzes eine besondere Bedeutung zu (Griffin et al., 2005; Kiki-Mvouaka et al., 2010; Prichard et al., 2012).

2.2.1.5 Toxikologie und ökologische Bedeutung

Grundsätzlich zeichnen sich die AVMs bei Menschen wie auch bei Haus- und Nutztieren durch eine gute Verträglichkeit und hohe Sicherheitsspanne (> 30) aus. Zu den Anzeichen der akuten Toxizität bei Überdosierung gehören zentralnervöse Störungen, die sich in Salivation, Mydriasis, Ataxie, Tremor und Koma bis hin zur Mortalität äußern (Richter & Steuber, 2010). Kontraindiziert sind AVMs (mit Ausnahme des SLM) bei Collies und einigen verwandten Rassen, bei denen bereits Dosierungen im therapeutischen Bereich mit zentralnervösen Störungen einhergehen (Hopper et al., 2002). Ähnliche Toxizitätserscheinungen wurden zudem bei Graurindern beobachtet (Seaman et al., 1987). Hintergrund der IVM-assoziierten Neurotoxizität sind erhöhte Konzentrationen im Zentralnervensystem (ZNS). Durch die Aktivität des transmembranären Pgp (siehe Kapitel 2.3.3.2.1), das sich u. a. in den Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) befindet, wird bei Säugern üblicherweise die Anreicherung seiner Substrate im Gehirn verhindert. Das für dieses Transportprotein kodierende *Multidrug-Resistance* (MDR) 1-Gen weist jedoch bei Collies eine 4 bp lange Deletion auf, wodurch es aufgrund der daraus resultierenden stark verkürzten Aminosäuresequenz zu der Expression eines nichtfunktionalen Proteins kommt (Mealey et al., 2001; Roulet et al., 2003). Infolgedessen reichern sich Pgp-Substrate wie die MLs im Gehirn an und interagieren mit den hier lokalisierten, bei funktionalem Pgp für MLs unzugänglichen, GABA_A-gesteuerten Ionenkanälen des ZNS (Pulliam et al., 1985; Edwards, 2003). Trotz des gleichen Transmitters weisen die GABA-Rezeptoren der Vertebraten und Nematoden einige grundlegende Unterschiede hinsichtlich ihrer Sequenzhomologie (35-45 % Übereinstimmung), Pharmakologie und Funktion auf (Geary et al., 1992; Bamber et al., 2003; Dent, 2006; Accardi et al., 2012). Während die GABA_A-Rezeptoren der Vertebraten ausschließlich eine inhibierende Wirkung zeigen, finden sich bei Nematoden sowohl solche mit hemmender als auch erregender Wirkung (Schuske et al., 2004). Des Weiteren sind die GABA_A-Rezeptoren der Vertebraten, die ausschließlich im ZNS anzutreffen sind und hier einen Anteil von 20-50 % ausmachen, u. a. für die Kontrolle der Erregbarkeit des Gehirns, die Wahrnehmung und verschiedene Verhaltensmuster verantwortlich (Sieghart et al., 1999), während die Rezeptoren der Nematoden an den neuromuskulären Endplatten zu finden sind und am Bewegungsablauf beteiligt sind (Bamber et al., 1999). Lediglich 10 % der Neuronen sprechen bei Nematoden auf GABA an, was auf das Vorkommen weiterer inhibierender Transmitter wie Glutamat zurückzuführen ist (Schuske et al., 2004).

Hinsichtlich der Toxizität bestehen bemerkenswerte Abweichungen innerhalb der Gruppe der MLs: So wird die Verabreichung von IVM bei Pgp-defizienten CF-1 Mäusen bereits bei geringen Dosierungen von neurologischen Störungen gefolgt, während MOX hier ein um das 2,7fach geringeres neurotoxisches Potenzial aufweist, welches aufgrund gleicher

Penetrationseigenschaften der BHS mit einer geringeren Bindungsaffinität bzw. einer geringeren intrinsischen Aktivität begründet wird (Janko & Geyer, 2012).

Beim Pferd wurden Anzeichen einer leichten Intoxikation (Mydriasis) ab einer 15- bis 30fachen IVM-Überdosierung festgestellt, während schwerere Intoxikationserscheinungen einhergehend mit Depression und Ataxie erst ab einer 60fachen Überdosierung auftraten (Campbell & Benz, 1984). Fohlen zeigten ab einer 9fachen Überschreitung der empfohlenen Dosierung erste Anzeichen einer Vergiftung (Pulliam & Preston, 1989).

Beachtet werden sollten außerdem die ökologischen Konsequenzen, die mit der Verabreichung einhergehen, da mindestens 90 % des IVM unverändert in die Umwelt abgegeben werden (Campbell, 1993). Außerdem zeigte sich, dass der Abbau unter klimatischen Bedingungen, die denen der Weide nachempfunden wurden (Dunkelheit, Temperaturen $\leq 22\text{ }^{\circ}\text{C}$) sehr langsam erfolgt (Halbwertszeit von 93-240 Tagen), wodurch es zu einer Akkumulation im Bodenprofil kommt (Halley et al., 1989). Beeinflusst wird die Exkretionsstärke und -dauer durch die Art der Anwendung sowie das verwendete ML. Neben einer erhöhten Mortalität koprophager Arthropoden haben ABM und das Derivat IVM auch langfristige Effekte auf die Entwicklung und Reproduktion dieser Insekten. Untersuchungen bei Wiederkäuern ergaben, dass die orale Verabreichung von IVM die geringsten Auswirkungen (bis 1 Woche nach Anwendung) auf die Dungfauna hat. Ähnliche Werte wurden für *Pour-on*-Formulierungen ermittelt. Die subkutane Behandlung führt dagegen zu toxischen Effekten, die in den Fäzes für 14-21 Tage anhalten (Steel & Wardhaugh, 2002). Der Vergleich zwischen den MLs ergab, dass AVMs grundsätzlich eine höhere Toxizität auf die Dungfauna aufweisen ($\text{DRM} > \text{IVM} \geq \text{EPM}$) als Milbemycine (Lumaret et al., 2012).

2.2.1.6 Antiparasitäre Aktivität

Die Verabreichung von MLs ist in Deutschland in oraler, subkutaner oder kutaner Form möglich; nicht mehr wekehrsfähig ist dagegen eine Bolus-Formulierung bei Rindern, welche eine kontinuierliche Abgabe des Wirkstoffes über einen längeren Zeitraum gewährleistet (Richter & Steuber, 2010). Für Pferde sind Produkte, die IVM enthalten, sowohl als Paste/Gel als auch als Kautablette für die orale Anwendung erhältlich. Die Dosierung wird mit 200 mg/kg KGW angegeben. Die intramuskuläre Injektion einer wässrigen Lösung ist ebenfalls möglich (Klei & Torbert, 1980; DiPietro et al., 1982; Schröder & Swan, 1982), wird aber aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen, wie Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber dem Trägerstoff Polysorbat 80, Fehlinjektionen oder Infektionen der Injektionsstelle mit Clostridien sowie einer verminderten Wirksamkeit gegenüber den unreifen Parasitenstadien im Vergleich zur oralen Darreichungsform nicht mehr durchgeführt (Karns & Luther, 1984; Clayton, 1986; Barragry, 1987). IVM zeigt Wirksamkeit gegenüber adulten und migrierenden larvalen Nematodenstadien und Arthropoden, jedoch nicht gegenüber Trematoden und Zestoden (Egerton et al., 1981; Torbert et al., 1982; Shoop et al., 1995b). Diese erfordern den Einsatz von Kombinationspräparaten (Praziquantel). Des Weiteren ist keine ovizide Wirkung vorhanden (Richter & Steuber, 2010). Darüber hinaus finden bei Pferden Formulierungen mit MOX als aktivem Wirkstoff Verwendung (bei einer Dosierung von 400 mg/kg KGW). Das anthelminthische Wirkungsspektrum der beiden Substanzen unterscheidet sich nur unwesentlich. Unterschiede finden sich in der Aktivität gegenüber Arthropoden (*Gasterophilus* spp.) mit einer höheren Wirksamkeit des IVM bzw. gegenüber den hypobiotischen Larven der Cyathostominae, mit einer höheren Effektivität zugunsten des MOX (Monahan et al., 1996). Letzteres liegt wahrscheinlich an dem bei MOX ($t_{1/2\beta} = 23,11$ Tage) im Vergleich zu IVM ($t_{1/2\beta} = 4,25$ Tage) längeren Zeitraum, in dem der Plasmaspiegel durch Metabolisierungs-, Exkretions- und Umverteilungsprozesse auf die

Hälfte absinkt, weshalb MOX einen längeren anthelminthischen Effekt aufweist (Pérez et al., 1999; Monahan & Klei, 2002).

2.2.2 Andere Anthelminthikaklassen

Bei der Behandlung von Nematodeninfektionen werden beim Pferd neben den MLs derzeit auch BZs und Pro-BZs sowie Tetrahydropyrimidine eingesetzt. Die Behandlung von Trematoden- bzw. Zestodeninfektionen erfordert die Anwendung anderer Wirkstoffklassen bzw. den Gebrauch entsprechender Kombinationspräparate.

Der Wirkmechanismus der BZs und Pro-BZs, die im Wirtsorganismus zu den eigentlich wirksamen BZs biotransformiert werden, wird durch die selektive Bindung an die β -Tubuline von Nematoden hervorgerufen (Martin et al., 1997). α - und β -Tubulinheterodimere polymerisieren unter physiologischen Bedingungen zu Mikrotubuli, die u. a. für den zellulären Transport (Glukoseaufnahme) verantwortlich sind und am Ablauf der Mitose und Meiose beteiligt sind (Caviston & Holzbaur, 2006). Während an einem Ende dieser Strukturen unter physiologischen Bedingungen weitere Tubulin-Dimere polymerisieren, dissoziieren diese in einem dynamischen Gleichgewicht von dem gegenüberliegenden Ende (*Treadmilling*) (Lacey, 1988). Der Anbau von β -Tubulinen, an die ein BZ-Molekül gebunden ist, verhindert jedoch die Assoziation weiterer Tubulindimere (*Capping*) (von Samson-Himmelstjerna, 2006), während am gegenüberliegenden Mikrotubulus-Ende die Depolymerisation weiterhin voranschreitet und schließlich zur Auflösung des Polymers führt (Lacey, 1990). Dem Verlust der Mikrotubuli folgt die Erschöpfung der zellulären Glykogenvorräte und schließlich die Zelllyse, weshalb die anthelminthische Wirkung vergleichsweise spät einsetzt (2-3 Tage) (Martin, 1997; Richter & Steuber, 2010). Diesen Umstand macht man sich bei der Behandlung massiver Askarideninfektionen zunutze, um das Auftreten einer behandlungsassoziierten Koliksymptomatik zu vermeiden (Love, 2003). Darüber hinaus wird durch die Hemmung der Polymerisation auch die Spindelbildung während der Mitose beeinträchtigt, wodurch die Eiproduktion gestört wird. Dieser Effekt ist bereits nach ca. 8 h zu beobachten (Martin, 1997; Richter & Steuber, 2010).

Tetrahydropyrimidine wie das PYR treten als selektive Agonisten mit den nikotinergen Acetylcholin (ACh)-Rezeptoren der Muskelzellen von Nematoden in Wechselwirkung, wodurch, ausgelöst durch die erhöhte Permeabilität für Kationen, eine Membrandepolarisation hervorgerufen wird, deren Folge die Muskelkontraktion und spastische Paralyse ist. Dies resultiert in der Ausscheidung des Wurmes (Martin, 1997; Martin & Robertson, 2007). Höhere Konzentrationen führen zusätzlich zu einer Hemmung der ACh-Esterase (Richter & Steuber, 2010).

Des Weiteren kommen bei der anthelminthischen Behandlung des Pferdes noch Isochinoline (Praziquantel, zur Behandlung der Anoplocephaliden) und Salicylsäureanilide (Closantel, bei der Leberegelbehandlung) zum Einsatz, auf die hier aber nicht näher eingegangen wird, da sie keine ausreichende Wirkung gegenüber *P. equorum* zeigen (Deplazes et al., 2012b).

2.3 Anthelminthikaresistenz

Die ersten Berichte über eine verringerte Wirksamkeit von Breitspektrumanthelminthika traten ungefähr 2 Jahre nach der Einführung des Thiabendazols bei dem Schafnematoden *Haemonchus contortus* (Conway, 1964; Drudge et al., 1964) und kurze Zeit später auch bei den Cyathostominae auf (Drudge & Lyons, 1965). Seitdem mehren sich die Fälle auch bei anderen Wirkstoffklassen und anderen Nematodenarten fast überall dort, wo ein regelmäßiger Anthelminthikaeinsatz erfolgt (Kaplan, 2004).

Häufige Gründe für die Selektion auf Resistenz sind der dauerhafte und häufige Einsatz nur einer Wirkstoffklasse (sowohl mehrmals pro Jahr als auch seltener über mehrere Jahre) sowie subtherapeutische Dosierungen bei der Anthelminthikaaanwendung, da sie das Überleben (teil-)resistenter heterozygoter Individuen ermöglichen (Tritschler et al., 1986; Smith et al., 1999). Letztere sind nicht nur auf eine fehlerhafte Verabreichung zurückzuführen, sondern entstehen auch durch unterschiedliche Bioverfügbarkeiten der Wirkstoffe bei den verschiedenen Wirtstierarten. Überraschenderweise scheinen abnehmende Wirkstoffkonzentrationen persistierender Anthelminthika (z. B. MOX) nur eine untergeordnete Rolle bei der Selektion von infektiösen Larven zu spielen (Dobson et al., 1996). Entscheidend zur bestehenden Resistenzproblematik trägt zudem die breite Anwendung von Generika mit z. T. verringerten anthelminthischen Potenzen bei (Jabbar et al., 2006; Molento, 2007). Problematisch ist in diesem Zusammenhang auch die mangelnde Verfügbarkeit neuer Anthelminthika: Trotz einiger Entwicklungen in den letzten Jahren wie den Cyclooctadepsipeptiden (Harder & von Samson-Himmelstjerna, 2002), den Paraherquamiden (Zinser et al., 2002) und den Amino-Acetonitril-Derivaten (Kaminsky et al., 2008) mangelt es seit Einführung der MLs an geeigneten neuen Anthelminthika mit anderen Wirkmechanismen, die über ein ähnlich breites Wirkungsspektrum verfügen und für Equiden zugelassen sind. Der Rückgang in der Entwicklungsaktivität liegt nicht zuletzt an der hohen Wirksamkeit und der Wirkungsbreite der MLs, die entsprechende Forschungen nach anderen Wirkstoffklassen zunächst nicht erforderlich erscheinen ließen (McKellar & Jackson, 2004). Neben den Anthelminthika-assoziierten Faktoren tragen auch die biologischen Eigenschaften der Parasiten zu einer Resistenzentwicklung bei: So variiert die intrinsische Suszeptibilität bereits zwischen eng verwandten Arten (Geary & Moreno, 2012) und es liegt daher nahe, dass Resistenzen zunächst bei Parasiten mit geringer intrinsischer Suszeptibilität zu beobachten sind (Reinemeyer, 2009). Des Weiteren wird die Ausbreitung von Resistenzen durch einen direkten Lebenszyklus, eine kurze Generationszeit und eine hohe Fortpflanzungsfähigkeit begünstigt (De Graef et al., 2013a).

2.3.1 Definition und Formen

Anthelminthikaresistenz liegt vor, wenn ein größerer Anteil von Individuen einer Parasitenpopulation in der Lage ist, eine Dosis/Konzentration eines Wirkstoffes zu tolerieren, als dies in einer normalen Population dieser Spezies der Fall ist und diese erworbene Eigenschaft vererblich ist (Prichard et al., 1980). Sie macht sich in einer Verschiebung der Dosis/Konzentrations-Wirkungskurve zugunsten höherer Konzentrationen sowie einem vermehrten Auftreten des resistenten Genotyps in der Population bemerkbar (Sangster, 1999). Besteht die Unempfindlichkeit gegenüber dem Wirkstoff bereits vor dem Erstkontakt, handelt es sich um Toleranz, die von dem Begriff der Resistenz abzugrenzen ist (Coles, 2006).

Häufig bilden Parasiten Resistenzen nicht nur gegen einen Wirkstoff einer chemischen Klasse aus, sondern zeigen diese auch gegenüber allen anderen derselben Wirkstoffklasse, wobei es Abstufungen in der Ausprägung gibt (z. B. IVM vs. MOX). Man spricht in diesem Fall von Nebenresistenz. Als Kreuzresistenz wird die Fähigkeit bezeichnet, durch das Erlangen der

Resistenz gegenüber einer chemischen Klasse ebenfalls eine Resistenz gegenüber einer anderen Wirkstoffklasse mit einem anderen Wirkmechanismus zu erhalten (Sangster, 1999). Eine weitere Form ist die MDR, die sich gegen mehrere verschiedene Wirkstoffgruppen gleichzeitig richtet, wobei sich die Resistenzen gegen die verschiedenen Klassen oft nacheinander und unabhängig voneinander entwickeln (Prichard et al., 1980). Erste Fälle von MDR traten zu Beginn der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts auf und sind vor allem bei den Schafnematoden (*H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis*) zu finden (Kaplan, 2004).

2.3.2 Molekulare und genetische Hintergründe

Dem Auftreten von Anthelminthikaresistenz können spezifische und unspezifische Mechanismen zugrunde liegen. Bei spezifischen Mechanismen ist das eigentliche Wirkstoffziel betroffen. Sie beinhalten (1) Veränderungen im Bereich der Arzneimittelbindungsstelle, wodurch sich die Bindungseigenschaften oder die funktionalen Folgen der Arzneimittelbindung verschlechtern sowie (2) die verstärkte oder verminderte Expression des entsprechenden Zielgens (wurde bisher nicht mit ML-Resistenz in Verbindung gebracht). Nichtspezifische Mechanismen verändern dagegen die Konzentration des Wirkstoffes an seinem Zielort durch (3) veränderte Metabolisierung im Zielorganismus und der damit einhergehenden Inaktivierung bzw. Entfernung des Wirkstoffes oder durch (4) einen verstärkten zellulären Effluxmechanismus (Wolstenholme et al., 2004; Prichard, 2007; Wolstenholme & Kaplan, 2012). Insbesondere der letztgenannte Punkt birgt die Gefahr der Ausbildung von MDR, da es sich hier um einen unspezifischen Resistenzmechanismus handelt und die Substratspezifität vieler Transporter sehr breit ist (Kerboeuf et al., 2003a). Die Beeinträchtigung der empfindlichen Würmer und das Überleben der resistenten Würmer nach der anthelminthischen Behandlung ermöglicht es Letzteren, die mit Resistenz assoziierten Gene auf die nächste Generation zu übertragen. Dies führt im Laufe mehrerer Generationen unter dem Einfluss desselben Wirkstoffes zu einer Selektion für die entsprechenden Allele und erhöht deren Anteil im Genpool der Gesamtpopulation (Sangster, 1999). Begünstigend für die fortschreitende Resistenzentwicklung ist eine hohe genetische Diversität parasitischer Nematoden (Nadler, 1987b; Blouin, 1998; Höglund et al., 2004; Troell et al., 2006), die in direktem Zusammenhang mit den meist sehr hohen Populationsgrößen und Mutationsraten steht (Gilleard & Beech, 2007). Hierdurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass bestimmte Resistenz-assoziierte Allele im Genpool vor dem Erstkontakt mit der betroffenen Wirkstoffklasse bereits vorhanden sind, in Abhängigkeit von etwaigen Fitnessnachteilen aber häufig nur in einer geringen Frequenz vorliegen (Wolstenholme et al., 2004). Alternativ kann die Mutation unmittelbar vor bzw. während des Anthelminthikaeinsatzes entstehen. In diesem Fall ist ihr Vorkommen zu diesem Zeitpunkt ebenfalls noch sehr gering. Des Weiteren besteht die Theorie, dass entsprechende Mutationen regelmäßig wiederkehren. Hier ist das Resistenzverursachende Allel jeweils vor einem anderen genetischen Hintergrund zu finden und weist eine individuelle Zusammensetzung an assoziierten Markern auf (Gilleard & Beech, 2007). Ein weiterer Faktor, der an der Verbreitung seltener Allele beteiligt ist, ist der Austausch genetischen Materials zwischen den Populationen z. B. durch Tierbewegungen (Blouin et al., 1995). Der Ursprung der Allele hat neben der praktischen Relevanz wie z. B. den entsprechenden Quarantänemaßnahmen auch einen Einfluss auf die Entwicklung und den Einsatz molekularer diagnostischer Assays sofern entsprechende Marker verfügbar sind (Gilleard & Beech, 2007). Im Gegensatz zu *H. contortus* zeigten Untersuchungen verschiedener *P. equorum*-Populationen mit Hilfe der *Amplified Fragment Length Polymorphism*-Analyse eine nur schwach ausgeprägte genetische Vielfalt und ergaben in Hinblick auf die geographische Verteilung kein einheitliches genetisches Muster. Es wird

vermutet, dass hierfür eine geringe Neigung zu Mutationen und/oder der starke Tierverkehr verantwortlich sind (Tydén et al., 2013); Eigenschaften, die auch für andere Askariden beschrieben wurden (Nejsum et al., 2005).

Mit welcher Geschwindigkeit sich die Anthelminthikaresistenz in einer Population ausbreitet, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Begünstigend wirkt beispielsweise ein monogener Ursprung sowie eine dominante Vererbung (Geary et al., 1999; De Graef et al., 2013a). Um welchen Erbgang es sich jeweils handelt, kann sich von Spezies zu Spezies auch innerhalb derselben Wirkstoffklasse unterscheiden (Gill & Lacey, 1998; Le Jambre et al., 2000).

2.3.3 Resistenzen gegenüber makrozyklischen Laktonen

Resistenzen gegenüber IVM wurden als erstes Ende der 80er bzw. Anfang der 90er Jahre des vorigen Jahrhunderts in Südafrika, Brasilien und den USA bei *H. contortus* beobachtet: Zur gleichen Zeit zeigte sich, dass sowohl bei parasitischen als auch bei freilebenden Nematoden eine experimentelle IVM-Selektion möglich war (Prichard, 1994). Auf die Einführung des MOX im Jahr 1991 folgten ebenfalls nach nur 4 Jahren die ersten Berichte über resistente Stämme (James et al., 2009). Vergleichende Studien zwischen IVM und MOX zeigten, dass Resistenzen gegenüber AVMs bereits weit verbreitet sind und ihr Auftreten stetig zunimmt, während Resistenzen gegenüber MOX weniger weit verbreitet sind (Prichard et al., 2012). Dies und die Erkenntnisse vergleichender Selektionsversuche führen zu der Annahme, dass die Resistenzentwicklung gegenüber AVMs und Milbemycinen zwar auf gleichen Mechanismen beruhen kann, eine multigenetische Genese aber nicht ausgeschlossen werden darf (Prichard et al., 2012). Deren Ursprung wird in dem Einsatz subtherapeutischer Dosierungen gesehen. Dagegen ist die schnelle Selektion bei therapeutischen Konzentrationen eher auf ein einzelnes Gen zurückzuführen (Gilleard, 2006). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass die Selektion auf IVM-Resistenz bei *H. contortus* unter Laborbedingungen nach nur drei Generationen erfolgen kann (Coles et al., 2005), was die Schlussfolgerung zulässt, dass zumindest bei diesem Parasiten bereits in IVM-naiven Populationen ein gewisser Anteil an Resistenzallelen vorhanden sein muss.

Bei der ML-Resistenz von *H. contortus* handelt es sich um einen autosomal-dominanten Erbgang, wobei die Expression geschlechtlich beeinflusst ist, da heterozygote Weibchen eine höhere Widerstandsfähigkeit aufweisen als heterozygote Männchen (Le Jambre et al., 2000). Neben der rasanten Ausbreitung der ML-Resistenz bieten auch Hinweise auf eine mit dieser einhergehende Zunahme der Pathogenität bei *Cooperia oncophora* Anlass zur Besorgnis (Coles et al., 2001).

2.3.3.1 Resistenzen gegenüber makrozyklischen Laktonen bei *P. equorum*

Im Gegensatz zu den kleinen Strongylyden ist das Vorkommen ML-resistenter Spulwürmer beim Pferd bereits von klinischer Bedeutung, da es trotz entsprechender Behandlungen mit MLs zu Todesfällen infolge der *P. equorum*-Infektion gekommen ist (von Samson-Himmelstjerna et al., 2011; Wolstenholme & Kaplan, 2012).

Ein wesentlicher Aspekt, der bei der Resistenzentwicklung von *P. equorum* mitspielt, liegt in seiner Eigenschaft als dosislimitierender Parasit bei der Anwendung zahlreicher Anthelminthika (Reinemeyer, 2012; von Samson-Himmelstjerna, 2012), was sich in der jeweiligen Wirksamkeit gegenüber den intestinalen Stadien bemerkbar macht (DiPietro et al., 1987; French et al., 1988). Der für einen Wirkstoff dosislimitierende Parasit wird während der Dosisfindungsstudie bestimmt. Es handelt sich hierbei um die Spezies, bei der die empfohlene Dosierung des Wirkstoffes eine 90 %ige Wirksamkeit aufweist. Während geringere

2 LITERATURÜBERSICHT

Dosierungen bei anderen Spezies aber weiterhin eine ausreichende Wirksamkeit zeigen ($\geq 90\%$), führen diese bei dem dosislimitierenden Parasiten zu einer Wirksamkeit von $< 90\%$ (VICH-Steering-Committee, 2000). Aus diesem Grund ist der Spielraum zwischen der wirksamen und der empfohlenen Dosierung bei *P. equorum* niedriger, welches die Entwicklung von Resistenzen erleichtert (Reinemeyer, 2009). Zu einer schnellen Verbreitung ML-resistenter *P. equorum*-Populationen trägt außerdem der starke Tierverkehr in der Pferdehaltung zwischen den Tierbeständen sowohl innerhalb eines Landes als auch auf internationaler Ebene bei (Reinemeyer, 2009). Dies ist abgesehen von Behandlungsfehlern bzw. einseitiger Anthelminthikaaanwendung sicherlich ebenfalls ein Grund für das gehäufte Auftreten resistenter Populationen in den letzten Jahren (Abbildung 4; Tabelle 1). Als weiterer Grund für Resistenzen bei *P. equorum* wird auch eine häufige Entwurmung angesehen (von Samson-Himmelstjerna, 2012).

Neben Resistenzen gegenüber MLs allein gibt es außerdem Berichte über MDR-Fälle bei *P. equorum*-Isolaten mit Resistenzen gegenüber MLs und PYR (Craig et al., 2007; Lyons et al., 2008; Cirak et al., 2010; Lyons et al., 2011). Berichte von BZ-Resistenzen bei *P. equorum* bestehen derzeit noch nicht, wobei der FECRT zweier Studien zu sehr schwankenden Ergebnissen hinsichtlich der Wirksamkeit führte (Lyons et al., 2008; Lyons et al., 2011).

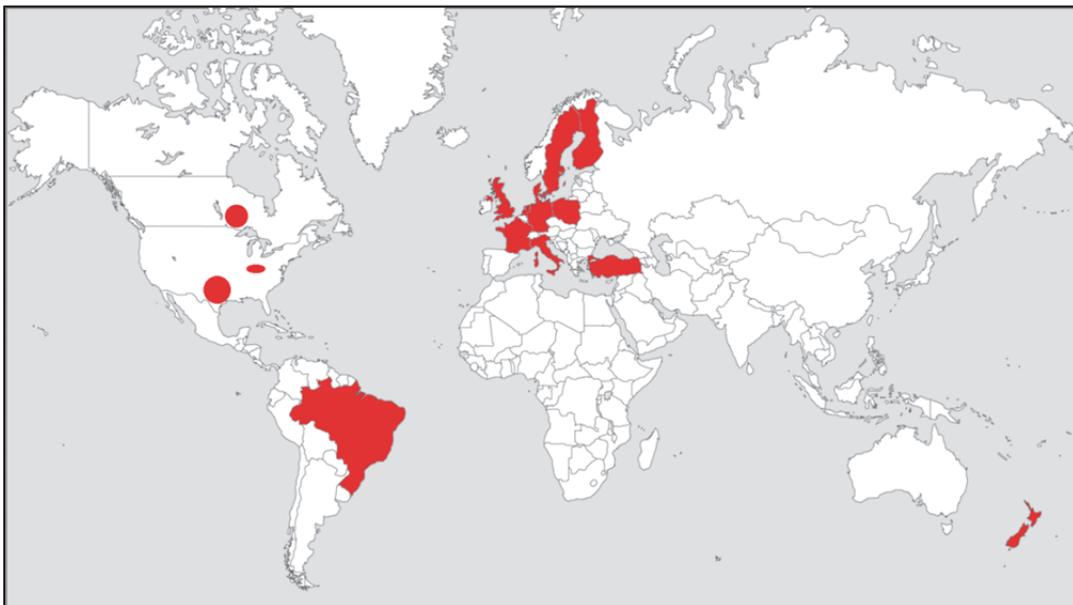


Abbildung 4: Darstellung der globalen Verteilung veröffentlichter Fälle von *Parascaris equorum*-Populationen mit Resistenzen gegenüber makrozyklischen Laktonen (rot); Referenzen siehe Tabelle 1 (Weltkarte in Anlehnung an http://horizont3000.org/image/karte/weltkarte_gry.gif)

Tabelle 1: Chronologische Darstellung veröffentlichter Fälle von *Parascaris equorum*-Populationen mit Resistenzen gegenüber makrozyklischen Laktonen; angegeben ist das Erscheinungsjahr des Artikels

Vorkommen	Erscheinungsjahr	Referenz
Niederlande	2002	Boersema et al.
Kanada	2003	Hearn & Peregrine
Kentucky	2006	Lyons et al.
UK	2006	Stoneham & Coles
Texas	2007	Craig et al.
Deutschland	2007	von Samson-Himmelstjerna et al.
Dänemark	2007	Schougaard & Nielsen
Kanada	2007	Slocombe et al.
Niederlande	2007	van Doorn et al.
Schweden	2008	Lindgren et al.
Brasilien	2008	Molento et al.
Niederlande/UK ^a	2008	Peaty; Traill
Kentucky	2008	Lyons et al.
Italien	2009	Veronesi et al.
Schweden	2009	Lind & Christensson
Italien	2010	Veronesi et al.
Türkei	2010	Cirak et al.
Finnland	2011	Näreaho et al.
Polen	2011	Basiaga & Kornas
Frankreich	2012	Laugier et al.
Neuseeland	2013	Bishop et al.

^a Behandlungsversagen bei einem 4 Jahre alten Einzeltier nach Import aus den Niederlanden; drei weitere Tiere konnten erfolgreich mit MOX behandelt werden

2.3.3.2 Resistenzmechanismen

In den letzten Jahren gab es zahlreiche Bemühungen in verschiedene Richtungen, die Resistenzmechanismen gegenüber den MLs zu ermitteln. Hierzu gehören Arbeiten zur Transportaktivität spezieller transmembranärer Proteine, zu Veränderungen in den GluClIs als Zielstrukturen der MLs sowie zu Veränderungen der β -Tubuline. Daher verwundert es nicht, dass auch ein multigenetischer Ursprung diskutiert wird, der sich langsam und über mehrere Generationen hinweg entwickelt und in Abhängigkeit von den jeweiligen Umweltbedingungen zwischen den Arten und Isolaten variieren kann (Wolstenholme et al., 2004). Auch das Vorliegen verschiedener Ursachen innerhalb einer Spezies kann nicht ausgeschlossen werden (Gill & Lacey, 1998). Nichtsdestotrotz kommt der endgültigen Anthelminthikakonzentration, die im Parasiten aktiv werden kann, eine entscheidende Bedeutung zu und die Entwicklung der MDR beruht auf dem aktiven Transport der Wirkstoffe aus der Zelle. Die an diesem Vorgang beteiligten Transporter weisen im Allgemeinen eine breite Spezifität für chemisch nicht miteinander verwandte Moleküle auf (Higgins, 2007).

2.3.3.2.1 P-Glykoproteine

Beobachtungen an Colchicin-selektierten Zellen, die eine veränderte Permeabilität der Zellmembran gegenüber verschiedenen amphiphilen Stoffen aufwiesen, führten zu der Entdeckung eines Glykoproteins, dessen Anwesenheit sich zunächst nicht bei Zellen des Wildtyps nachweisen ließ. Es wurde aufgrund seiner Eigenschaft in der Beeinflussung der Permeabilität der Zellmembran als Pgp bezeichnet (Juliano & Ling, 1976). In der Folgezeit konzentrierten sich die Untersuchungen hauptsächlich auf seine Beteiligung an der Ausbildung von MDR in Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika (Kartner et al., 1983; Gottesman & Ling, 2006). Mehr durch Zufall wurde ihre Bedeutung für die Bioverfügbarkeit und Toxikologie des IVM entdeckt: Nach einer antiparasitären Routinebehandlung Pgp-defizienter Mäuse (*mdr1a*^{-/-}) mit IVM kam es zu Intoxikationen und Todesfällen der homozygoten Mäuse, welche auf eine stark erhöhte IVM-Konzentration und Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren im Gehirn der betroffenen Tiere zurückzuführen waren (Schinkel et al., 1994). Ähnliche Beobachtungen wurden kurze Zeit später auch bei Subpopulationen von CF1-Mäusen (Kwei et al., 1999) und Collies (Mealey et al., 2001) gemacht; letztere besitzen, wie sich herausstellte, eine Mutation im Pgp-Gen. Weitere Untersuchungen des menschlichen Pgp zeigten, dass IVM neben seiner Eigenschaft als Substrat auch ein Inhibitor ist (Didier & Loor, 1996; Pouliot et al., 1997).

Bei den Pgps handelt es sich um ca. 170 kDa große integrale Membranproteine, die der ABC-Transporter Superfamilie angehören. Sie bestehen aus zwei ähnlich aufgebauten Hälften, die durch eine *Linker*-Region miteinander verbunden sind (Abbildung 5). Jede dieser Hälften besitzt sechs stark hydrophobe Transmembranhelices (TMH) mit den Substratbindungsstellen als Grundlage des Transportweges und eine intrazelluläre, hydrophile Nukleotidbindungsdomäne (NBD) (Acc. No.: c117201). Diese ist mit zahlreichen für ATPasen und/oder ABC-Transporter-typischen Motiven ausgestattet, die die Energieversorgung des Transportvorganges gewährleisten und somit den Substrattransport durch die Membran auch entgegen hoher Konzentrationsgradienten ermöglichen (Zhou, 2008). Im basalen Zustand befinden sich die NBDs in einer geöffneten Dimerkonfiguration und haben eine geringe Affinität für ATP, während die Substratbindungsstellen in einem hochaffinen Zustand im Bereich des inneren Blattes der Zellmembran liegen. Durch die Assoziation des Substrates mit den TMHs erhöht sich die Affinität der NBDs für ATP; gleichzeitig verringert sich die Aktivierungsenergie, die für die Bildung eines geschlossenen NBD-Dimers notwendig ist (Higgins & Linton, 2004). Für den weiteren Transportvorgang ist die Bindung zweier ATP-Moleküle im NBD-Dimer erforderlich, die sich hier sandwichartig einfügen (Hollenstein et al., 2007). Die Bildung des geschlossenen NBD-Dimers bewirkt weitreichende Konformationsänderungen der TMHs, sodass die Substratbindungsstelle dem Extrazellulärraum bzw. dem äußeren Blatt der Zellmembran präsentiert wird und die Bindungsaffinität gegenüber dem Substrat verringert wird. Dies ermöglicht die Abgabe des Substrats (Higgins & Linton, 2004; Aller et al., 2009; Seeger & van Veen, 2009). Die anschließende ATP-Hydrolyse und Freisetzung von P_i versetzt den Transporter wieder in seinen basalen Zustand, indem das im Rahmen der ATP-Bindung geschlossene NBD-Dimer destabilisiert wird und schließlich wieder in die geöffnete Konformation übergeht (Aller et al., 2009). Neben dem hier beschriebenen *ATP-Switch Model*, das die Dimerisierung der NBDs als das auslösende Moment ansieht (Higgins & Linton, 2004), gibt es noch weitere Modelle, die den Ablauf des Pgp-vermittelten Transports beschreiben. Häufig wird auch das *Occlusion-induced Switch Model* vorgestellt (Seeger & van Veen, 2009). Hierbei beeinflussen sich die Bindungen von Substrat und ATP nicht gegenseitig und erst die ATP-Hydrolyse führt zu Konformationsänderungen, die die Substratfreisetzungen ermöglichen (Ambudkar et al., 2006). Ob die Hydrolyse beider ATPs für den erfolgreichen Ablauf des Substrattransportes

erforderlich ist oder der Verbrauch eines Moleküls ausreichend ist, hängt von dem jeweiligen Modell ab (Seeger & van Veen, 2009).

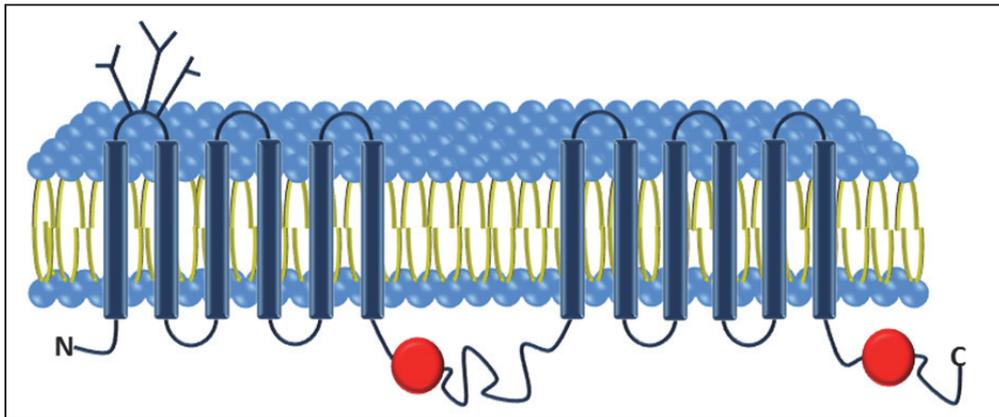


Abbildung 5: Schematische Darstellung der P-Glykoprotein-Sekundärstruktur; das Pgp besteht aus zwei Hälften, jede ihrerseits aus sechs Transmembranhelices (dunkelblau) und einer Nukleotidbindungsdomäne (rot). Die erste extrazelluläre Schleife ist N-glykosyliert; *N* kennzeichnet das amino-terminale Ende, *C* den carboxy-terminalen Rest des Proteins.

Außer bei Säugern wurde das Auftreten von ABC-Transportern und ihre Beteiligung am Resistenzgeschehen auch bei Bakterien, Pilzen, Hefen und Parasiten beschrieben (Jones & George, 2005). Während sie bei Bakterien am Im- und Export von Molekülen beteiligt sind, vermitteln sie bei Eukaryonten ausschließlich den unidirektionalen, ATP-abhängigen Transport aus der Zelle (Seeger & van Veen, 2009). Abgesehen von den Zellen der BHS werden Pgps bei Säugern außerdem besonders an der apikalen Oberfläche der Enterozyten, Hepatozyten sowie Zellen der Niere und Nebenniere exprimiert und gewährleisten somit den IVM-Transport aus den Zellen in die Organlumina (Zhou, 2008). Die Expressionsorte bei Nematoden sind derweil nur für *C. elegans* eindeutig geklärt: Es handelt sich vorrangig um Zellen des Darms, aber auch um die H-Zelle sowie um Zellen des Pharynx, des Nervensystems und der chemosensorischen Strukturen (AWA-Neuronen der Amphiden) am Vorderende und um Zellen am Hinterende der männlichen Tiere (Zhao et al., 2004; Nunes et al., 2005). Für *H. contortus* wurde außerdem die Pgp-Expression auf der Eischale und der Kutikula larvaler Stadien nachgewiesen (Riou et al., 2005).

Die Pgps von Säugetieren werden durch eine kleine Genfamilie mit zwei Isoformen beim Menschen (*MDR1/ABCB1* und *MDR2/ABCB4*) bzw. drei bei der Maus (*mdr1a/Abcb1a*, *mdr1b/Abcb1b* und *mdr2/Abcb4*) repräsentiert. Die beiden Isoformen des Menschen sind aus einer Genduplikation hervorgegangen und stimmen in ihrer Aminosäuresequenz zu 78 % überein. Während die Isoformen der Klasse 1 für den Transport von Wirkstoffen verantwortlich gemacht werden, exportieren die der Klasse 2 Phosphatidylcholin in die Galle, weswegen sie im allgemeinen Sprachgebrauch nicht als Pgps bezeichnet werden (Sharom, 2006). Im Gegensatz zu den Säugern besitzen Nematoden eine Vielzahl von Pgps. So konnten bei *C. elegans* 14 Pgp-Homologe sowie ein Pseudogen identifiziert werden. Diese sind auf fünf Chromosomen verteilt. Für *Caenorhabditis briggsae* liegen die Sequenzen von 13 Pgps in den Datenbanken vor, während bei *H. contortus* zehn Pgp-Gene im Genom identifiziert wurden (Laing et al., 2013). Des Weiteren wurden homologe Sequenzen für *Onchocerca volvulus* (Huang & Prichard, 1999), kleine Strongyliden (Drogemüller et al., 2004), *O. ostertagi* (Pachnicke, 2009), *C. oncophora* (De Graef et al., 2013b), *Brugia malayi* (Ardelli et al., 2010), *Dirofilaria immitis* (Bourguinat et al., 2011c), *T. circumcincta* (Dicker et al., 2011) und *A. suum* (Ardelli, 2013) beschrieben. Die Ursache für die Vielfalt der Pgp-exprimierenden Strukturen und deren verhältnismäßig hohe Anzahl bei einem

vergleichsweise kleinen Genom, wird in ihrer Schutzfunktion gegenüber Toxinen der Umwelt gesehen, denen die Nematoden entgegentreten müssen (Broeks et al., 1995; Broeks et al., 1996). Des Weiteren wird die Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Homöostase diskutiert. Da die Zellen der Helminthen im Vergleich zu denen ihres Wirtes hypoosmotisch sind, könnten Pgps an der Regulierung der Osmolalität beteiligt sein (Sangster, 1994).

Substrate sind verschiedene endogene und exogene Substanzen, u. a. auch Arzneimittel (Gottesman & Pastan, 1993), deren effektive Konzentration durch den Pgp-vermittelten Transport am eigentlichen Zielort verringert wird. Durch ihre hohe Substratvariabilität werden die Pgps zu den nichtspezifischen Resistenzmechanismen gezählt, die auch an der Ausbildung von MDR beteiligt sein können. Die meisten Substrate sind pflanzlichen, bakteriellen oder mykotischen Ursprungs, planar, lipophil oder amphiphil und meist schwache Basen. Die Größe kann zwischen 330 und 4000 Da schwanken (Higgins, 2007; Aller et al., 2009). Gemeinsam ist allen Pgp-Substraten die räumliche Trennung ihrer hydrophilen und hydrophoben Reste (Srivalli & Lakshmi, 2012), ein Umstand, der bei der Substratbindung eine wichtige Rolle spielt (siehe Kapitel 4.3.1). Neben chemischen Substanzen induziert auch physikalischer Stress, Röntgen und UV-Strahlung sowie Hitzeeinwirkung die Pgp-Expression. Diese Noxen führen zu zellulären Schäden, die wiederum als eine der ersten Reaktionen die Pgp-Transkription zur Folge haben (Zhou, 2008). MLs sind aufgrund ihrer Lipophilie sehr gute Substrate mit einer hohen Bindungsaffinität für die Pgps. Dies wurde bei Untersuchungen von Säugerzellen festgestellt (Lespine et al., 2007). Außerdem lässt die Größe der Moleküle zahlreiche potenzielle Bindungsstellen zu (Lespine et al., 2012). Allerdings gibt es auch innerhalb der Gruppe der MLs Abstufungen hinsichtlich der Substrateigenschaften: Während diese für die meisten AVMs gut ist, wird MOX nur in geringem Umfang durch Pgps transportiert (Kiki-Mvouaka et al., 2010). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die mit dem Transport einhergehende Pgp-Inhibition durch MLs gemacht. Auch hier erwies sich IVM als ein starker kompetitiver Inhibitor des Transports der fluoreszierenden Pgp-Substrate Rhodamin 123 und Daunorubicin (Didier & Loor, 1996), während MOX kaum hemmende Eigenschaften aufwies (Lespine et al., 2007). Diese Ergebnisse beruhen jedoch nur auf Untersuchungen an Säugerzellen und die Übertragbarkeit auf die Pgps der Nematoden ist fragwürdig, zumal der Rhodamin 123-Efflux im Nematodenmodell durch MLs aktiviert wird (Kerboeuf & Guégnard, 2011). Neben den MLs selbst verfügen auch Verapamil (VPL), Imidazolderivate, Quercetin, Loperamid, Ketoconazol, Itraconazol u. a. Substanzen über die Fähigkeit, die Bioverfügbarkeit von Pgp-Substraten zu erhöhen (Lespine et al., 2008) (siehe Kapitel 4.4). Die klinische Anwendung dieser Substanzen in Kombination mit beispielsweise IVM ist aber umstritten, da zu befürchten ist, dass neben der Hemmung der Transportproteine des Parasiten auch die des Wirtes beeinflusst werden. Zusätzlich erschwert ihre verhältnismäßig kurze Halbwertszeit im Plasma den Einsatz (Lespine et al., 2012).

Im Gegensatz zu den Pgps der Säuger ist deren Charakterisierung bei den Nematoden (noch) nicht so weit fortgeschritten; ein Umstand der sicherlich auch auf der hohen Anzahl von Pgps im Nematodengenom beruht. So konnte der direkte Nachweis für den Transport von MLs durch Pgps bisher nicht erbracht werden (von Samson-Himmelstjerna & Blackhall, 2005; Lespine et al., 2012).

Eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber MLs kann auf verschiedenen Wegen durch Pgps hervorgerufen werden: Einerseits kann ein Anstieg in der Pgp-Expression die Suszeptibilität beeinflussen, andererseits ist auch eine veränderte Affinität gegenüber den Substraten, d. h. den MLs, denkbar bzw. das gleichzeitige Auftreten beider Mechanismen (Wolstenholme et al., 2004). Der erste Nachweis für eine erhöhte Pgp-Expression nach IVM-Selektion wurde für das *pgpA* (entspricht Pgp-2) bei *H. contortus* erbracht (Xu et al., 1998). Zahlreiche weitere Untersuchungen für diesen und andere Nematoden folgten (Lespine et al., 2012). Zu

unterscheiden ist hierbei die konstitutive Überexpression, die wahrscheinlich aus Mutationen in den regulatorischen Sequenzen der Pgps (Promotor-Region, Intron) resultiert, von der induzierbaren Überexpression, deren Hintergrund bisher nicht eindeutig geklärt ist (Prichard, 2008).

Mutationen der Pgps, die zu qualitativen Veränderungen führen und somit möglicherweise die Transporteigenschaften beeinflussen, konnten für das menschliche Pgp identifiziert werden (Hoffmeyer et al., 2000; Sauna et al., 2007; Fung & Gottesman, 2009). Diese befinden sich vorwiegend im Bereich der TMHs und könnten somit die Substratspezifität beeinflussen (Sangster, 1994). Ähnliche Hinweise gibt es auch für einige Filarien- und Trichostronglidenspezies, die mit Erlangen einer Resistenz gegenüber IVM das Auftreten spezifischer Allele bzw. eine verringerte Allelvariation zeigten (Blackhall et al., 1998a; Ardelli & Prichard, 2004; Ardelli et al., 2005; Eng & Prichard, 2005; Ardelli et al., 2006b; Bourguinat et al., 2011b; Dicker et al., 2011).

Das *C. elegans* Genom enthält insgesamt 60 ABC-Transportergene, die einen Anteil von 0,3 % an der Gesamtzahl der Gene ausmachen (Sheps et al., 2004). Ein Großteil dieser Proteine ist wahrscheinlich an dem spezifischen Transport endogener Metaboliten beteiligt. Neben den Pgps werden bei Nematoden außerdem Homologe der *Multidrug Resistance Proteine* (MRPs) sowie der *Half-Transporter* für den Efflux von Fremdstoffen verantwortlich gemacht (Borst et al., 1999; Bates et al., 2001). Bei Säugetieren findet sich außerdem das *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) (Doyle & Ross, 2003). Die Affinität dieser Transporter für IVM ist allerdings, zumindest bei den Säugern, schwächer als die der Pgps. Trotz eines stark konservierten Aufbaus zeigten phylogenetische Untersuchungen eine unabhängige Entstehungsweise dieser einzelnen Unterfamilien (Sheps et al., 2004).

2.3.3.2.2 Glutamat-gesteuerte Chloridionenkanäle

Unterschiedliche Beobachtungen wurden hinsichtlich der Beteiligung der GluCl_s bei Resistenzen gegenüber MLs gemacht. An Membranpräparationen von IVM-suszeptiblen und -selektierten *H. contortus* Stämmen konnten zunächst keine Unterschiede in der IVM-Bindungsaffinität, die auf eine Veränderung der Bindungsstelle schließen lassen, festgestellt werden (Rohrer et al., 1994).

Dass ein Zusammenhang zwischen GluCl_s und IVM-Resistenz nicht auszuschließen ist, ergaben Untersuchungen an *C. elegans*: Das gleichzeitige Vorkommen von Null-Mutationen in drei unterschiedlichen GluCl- α -Untereinheiten, *avr-15* (*GluCl α 2*), *avr-14* (*GluCl α 3*) und *glc-1* (*GluCl α 1*) führte zu einer stark ausgebildeten Resistenz. Interessanterweise konnte dieser Effekt nicht durch die Veränderung von nur zwei Genen erzielt werden (Dent et al., 2000). Bei parasitischen Nematoden ließ der Vergleich eines Gens, das für die α -Untereinheit des GluCl_s bei *H. contortus* kodiert, auf das Auftreten eines resistenzassoziierten Allels schließen (Blackhall et al., 1998b). Ein ähnliches Ergebnis ergab die Untersuchung entsprechender Gene bei *C. oncophora*, während die β -Untereinheit des GluCl keine resistenzassoziierten Unterschiede aufwies (Njue & Prichard, 2004). Die Expression der GluCl α -Untereinheiten resistenter und sensibler *Cooperia*-Isolate in *Xenopus laevis* Oozyten führte zu einem moderaten aber signifikanten Verlust der ML-Suszeptibilität, der auf eine Aminosäuresubstitution (Leu256Phe) zurückgeführt wurde (Njue et al., 2004). Allerdings blieb der Nachweis dieses resistenzassoziierten Aminosäureaustausches bei anderen Feldisolaten bisher aus, wie erst kürzlich die Untersuchung mehrerer *T. circumcincta*-Stämme unterschiedlicher Suszeptibilität gegenüber IVM, BZs und LEV zeigte und auch zuvor bei Untersuchungen von Labor- und Feldisolaten von *C. oncophora*, *Ostertagia ostertagi* und *H. contortus* ermittelt wurde (El-Abdellati et al., 2011; Williamson et al., 2011; Martínez-

2 LITERATURÜBERSICHT

Valladares et al., 2012). Neben den GluCl_s wurde auch die Beteiligung der GABA-gesteuerten Cl⁻-Kanäle an der ML-Resistenz untersucht (Blackhall et al., 2003).

2.3.3.2.3 β -Tubuline

Für *H. contortus* und *O. volvulus* wurde außerdem eine Veränderung in der Frequenz bestimmter β -Tubulin-Allele unter IVM-Selektion festgestellt (Eng et al., 2006). Bei *H. contortus* zeigte sich ein Zusammenhang zwischen ML-Resistenz und dem Auftreten dreier Codons, die bisher mit BZ-Resistenz in Verbindung gebracht wurden (siehe Kapitel 2.3.4). Eine entsprechende Assoziation wäre insofern von Bedeutung, als dass dies auf die Ausbildung einer MDR hinweist und daher Auswirkungen auf das Behandlungsregime hätte, dem häufig die Rotation oder Kombination dieser beiden Wirkstoffklassen zugrunde liegt (de Lourdes Mottier & Prichard, 2008). Ob diese oder mit ihnen assoziierte Veränderungen der β -Tubulingene tatsächlich in Zusammenhang mit der Ausbildung der IVM-Resistenz stehen oder nur mit anderen Veränderungen der Gene verbunden sind, bedarf weiterer Untersuchungen (Prichard & Roulet, 2007). Vergleichende Untersuchungen von Neuronen IVM-resistenter und -suszeptibler *H. contortus*-Isolate deuten darauf hin. Neuronen, die in Kanälen (Amphiden) am Vorderende in unmittelbarer Nähe des Pharynx lokalisiert sind und mit der Umwelt in Kontakt stehen, wiesen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen u. a. den Verlust von Mikrotubuli auf. Die Autoren vermuten, dass diese chemo- und thermosensiblen Strukturen auch einen entscheidenden Faktor beim Eintritt der MLs in den Organismus spielen (Freeman et al., 2003).

2.3.4 Resistenzen gegenüber anderen Wirkstoffklassen

Für die BZ-Resistenz von *H. contortus* konnte gezeigt werden, dass diese mit einer verminderten Bindungsaffinität der BZs für das β -Tubulin einhergeht (Lubega & Prichard, 1991; Russell & Lacey, 1992). Hierfür werden Einzelnukleotidpolymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) im Bereich des Codons 200 (Phe200Tyr), Codons 198 (Glu198Ala) und Codons 167 (Phe167Tyr bzw. Phe167His) verantwortlich gemacht (von Samson-Himmelstjerna et al., 2007a). Das Auftreten der einzelnen Aminosäuresubstitutionen variiert zwischen den Spezies aber auch zwischen den Populationen derselben Spezies (von Samson-Himmelstjerna et al., 2007a; Beech et al., 2011). Von besonderem Interesse könnte der Austausch an Position 200 sein, da der resistente Genotyp bestimmter Nematodenspezies dem Genotyp des entsprechenden Homologs von Säugetieren entspricht. Es erscheint daher schwer vorstellbar, dass BZs an dieser Position an die β -Tubuline der Nematoden binden, gleichzeitig aber nicht an die des Wirtes und hier keine Wirkung entfalten; eine Überlegung, die für die Beteiligung des Codons 200 an der BZ-Resistenzentwicklung spricht (Prichard, 2008). Neben Veränderungen des β -Tubulin Isotyps-1 wurde mit dem Erlangen der BZ-Resistenz auch ein Verlust des Isotyps-2 in Verbindung gebracht (Kwa et al., 1993), wobei dieser Mechanismus in nachfolgenden Untersuchungen weiterer resistenter *H. contortus*-Populationen nicht bestätigt werden konnte (Beech et al., 1994).

Darüber hinaus gibt es Untersuchungen, die auf einen Zusammenhang zwischen Pgps und der Ausbildung von BZ-Resistenz schließen lassen (Nare et al., 1994; Gilleard, 2006; Blackhall et al., 2008; Pachnicke, 2009). Auch der chemische Aufbau der BZs zeigt Strukturen, wie diese bei anderen Pgp-Substraten zu finden sind (Kerboeuf et al., 2003a).

Die molekularen Resistenzmechanismen gegenüber den cholinergen Anthelminthika, wie dem PYR und LEV sind noch nicht eindeutig geklärt. Untersuchungen lassen aber einen polygenen Hintergrund vermuten (Prichard, 2007). Für *C. elegans* konnten fünf Gene (*unc-*

29, -38 und -63 sowie *lev-1* und -8) identifiziert werden, die für Untereinheiten des LEV-sensitiven ACh-Rezeptors kodieren. Es zeigte sich, dass Nullmutationen der Rezeptoruntereinheiten mit LEV-Resistenz einhergehen (Martin & Robertson, 2007). Bei Trichostrongyliden konnten Orthologe für alle Gene mit Ausnahme von *lev-8* zugeordnet werden; zudem wurde die Vielfalt der Untereinheiten bei diesen Spezies deutlich. Auch hier führte der Funktionsverlust einer Untereinheit, der durch Deletionen innerhalb des *unc-63* Gens hervorgerufen wird, zu LEV-Resistenz (Neveu et al., 2010). Für ein 3fach resistentes Feldisolat (ML, LEV, BZ) von *H. contortus* wurde außerdem ein starker Anstieg in der Expression des verkürzten Transkripts einer weiteren nicotinergen ACh-Rezeptoruntereinheit (*acr-8b*) festgestellt (Williamson et al., 2011); diese Splicing-Variante wurde auch schon früher mit LEV-Resistenz in Verbindung gebracht (Fauvin et al., 2010). Die Analyse der Expressionsrate orthologer Gene von *Ancylostoma caninum*-Isolaten mit unterschiedlicher PYR-Resistenz führte zu einer Korrelation zwischen der verminderten Expression der für die ACh-Rezeptoruntereinheiten kodierenden Gene (*unc-29*, -28 und -63) und dem PYR-Resistenzstatus (Kopp et al., 2009).

2.3.5 Resistenzdiagnostik

2.3.5.1 *In vivo*-Testverfahren

Bei der klinischen Diagnose von Anthelminthikaresistenz kommt der FECRT als einziger Test, der auch im Feld für alle Anthelminthikaklassen verfügbar ist, zum Einsatz. Hierbei wird bei einer Tiergruppe der mittlere Epg vor und nach der Behandlung bestimmt und miteinander verglichen. Aufgrund einer meist geringen Bestandsgröße und eines häufig niedrigen Epg bei adulten Tieren, wird bei Pferden eine modifizierte Form der Eizahlreduktion angewendet, bei der jedes Pferd als seine eigene Kontrolle angesehen wird. Die gewählte Detektionsmethode für das Epg sollte eine Sensitivität von ≤ 5 aufweisen. Die Eizahlreduktion kann dann für jedes Einzeltier nach folgender Formel ermittelt werden, wobei die mittlere Eizahlreduktion für den gesamten Bestand erst im Anschluss bestimmt wird (Kaplan, 2011):

$$\text{Eizahlreduktion (\%)} = 100 \times \left[1 - \left(\frac{\text{Epg (nach Behandlung)}}{\text{Epg (vor Behandlung)}} \right) \right]$$

Der Beprobungszeitpunkt vor bzw. nach der Behandlung ist abhängig vom eingesetzten Anthelminthikum. Um eine Vorselektion zu vermeiden, sollte im Falle der MLs die Wurmkur vor dem ersten FEC mindestens 10-12 Wochen zurückliegen, während die zweite Eizahlbestimmung 14-17 Tage nach der eigentlichen Behandlung durchgeführt wird.

Entsprechend der von der „World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology“ (WAAVP) herausgegebenen Definition liegt Anthelminthikaresistenz bei Nematoden der kleinen Wiederkäuer bei einer prozentualen Eizahlreduktion von ≤ 95 % und einem Wert von ≤ 90 % für die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls vor. Wird lediglich eines der beiden Kriterien erfüllt, besteht der Verdacht auf Anthelminthikaresistenz (Coles et al., 1992).

Im Gegensatz zu den kleinen Wiederkäuern wurden bei Pferden bisher für die Durchführung des FECRT hinsichtlich des Beprobungszeitpunktes und Schwellenwertes sowie für die Interpretation seiner Ergebnisse keine standardisierten Richtlinien festgelegt (Coles et al., 2006; Reinemeyer, 2009). Für Cyathostominae wird üblicherweise eine mittlere Reduktion des FEC von < 90 % nach Anwendung von BZs und PYR bzw. bei MLs von < 95 % als Resistenz angesehen (Bauer et al., 1986; von Samson-Himmelstjerna et al., 2011).

Die Problematik, die sich bei der Erstellung allgemeingültiger Richtlinien stellt, liegt nicht zuletzt an der Gruppengröße der Pferdebestände. Unterschiede in der Gruppengröße können zu unterschiedlichen statistischen Signifikanzen des FECRT führen (von Samson-Himmelstjerna, 2012). So nimmt die Variabilität in der Messung des FEC sobald der FECR $< 95\%$ sinkt, zu. Dies macht sich insbesondere in kleinen Beständen bemerkbar, sodass bei Gruppengrößen von < 10 Pferden die Ergebnisse des FECRT unter Vorbehalt zu betrachten sind (Kaplan, 2011). Ein weiterer limitierender Faktor für die Anwendung des FECRT bei *P. equorum* liegt in der intermittierenden Ausscheidung der Eier sowie der Tatsache, dass nur das Vorhandensein adulter Stadien nachgewiesen werden kann. Aus diesen Gründen muss die Eiausscheidung nicht zwangsläufig mit der tatsächlichen Wurmbürde korrelieren. Daher ist es sinnvoll, für die Berechnung nur Tiere mit einem Epg von > 100 heranzuziehen (von Samson-Himmelstjerna et al., 2011), manche Autoren empfehlen einen Epg-Richtwert von ≥ 200 (Reinemeyer, 2009). Ein weiterer Schwachpunkt des FECRT liegt in der für *T. colubriformis* und *O. ostertagi* ermittelten Detektionsuntergrenze. Erst ein Anteil der resistenten Wurmpopulation von 25% an der Gesamtpopulation garantiert die Detektion, wodurch das Auftreten eines sich in der Entwicklung befindlichen Resistenzgeschehens möglicherweise verschleiert wird (Martin et al., 1989).

Einen zuverlässigeren Aufschluss über den tatsächlichen Resistenzstatus erhält man durch die Anwendung des kritischen oder kontrollierten Tests (Drudge & Lyons, 1977). Beim kritischen Test werden mindestens 4 Tage nach anthelminthischer Behandlung die mit dem Kot ausgeschiedenen Würmer gesammelt und deren Anzahl mit der im Tierkörper verbliebenen Restwurmbürde ins Verhältnis gesetzt. Einen Schwachpunkt stellt hier der einsetzende Verdau der Würmer bei der Passage des Gastrointestinaltraktes und der hohe Zeit- und Arbeitsaufwand dar. Von Vorteil ist, dass hier keine Verwendung von Kontrolltieren erforderlich ist, wie dies beim kontrollierten Test der Fall ist. Bei Letzterem wird die Wurmbürde der zu untersuchenden Wirtstiere mit derer artifiziiell infizierter Tiere (Infektion erfolgt mit einem Isolat eines bekannten Resistenzstatus) nach der Behandlung verglichen. Dieser Test wird als der zuverlässigste angesehen und wurde auch zur Bestätigung der Ergebnisse des FECRT sowie zur Validierung der *in vitro*-Tests eingesetzt und gilt daher als Goldstandard für die Evaluierung der Effizienz aller Anthelminthikaklassen (Coles et al., 2006). Dennoch spricht auch hier wieder der hohe Arbeits- und Zeitaufwand sowie der zusätzliche Einsatz von Kontrolltieren gegen eine routinemäßige Anwendung, weshalb dieser Test nur noch selten durchgeführt wird (Taylor et al., 2002). Außerdem sind sowohl der kritische als auch der kontrollierte Test aufgrund der Tötung der Wirtstiere auf die Forschungsebene beschränkt und daher nicht für die Routineanwendung im Feld geeignet, weshalb der FECRT derzeit die einzig verfügbare Möglichkeit darstellt, den Entwurmungserfolg in einem Pferdebestand zu überprüfen.

2.3.5.2 *In vitro*-Testverfahren

In vitro-Testverfahren zur Detektion von Anthelminthikaresistenz basieren entweder auf der Untersuchung der Entwicklung, der Nahrungsaufnahme, der Bewegung oder der Detektion enzymatischer Reaktionsabläufe. Die Interpretation beruht auf der Bestimmung des Wertes der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50} -Wert), wobei resistente Isolate durch einen höheren Wert gekennzeichnet sind. Trotz einer Vielzahl von Testsystemen ist die Anwendung beim Pferd nur eingeschränkt möglich, da die meisten Verfahren für die Parasiten der kleinen Wiederkäuer entwickelt wurden und eine entsprechende Validierung für Pferde häufig nicht erfolgte (Craven et al., 1999).

Der Larvenschlupfhemmtest (*Egg Hatch Assay*), bei dem Eier unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt werden, kann im Fall des Verdachts auf BZ-Resistenz

(Le Jambre, 1976) und in einer modifizierten Form (*Egg Hatch Paralysis Assay*) auch zur Bestimmung des Resistenzstatus gegenüber LEV durchgeführt werden (Dobson et al., 1986). Wichtig für die korrekte Durchführung ist hier die Verwendung nicht entwickelter Eier, da die Empfindlichkeit gegenüber manchen Wirkstoffen mit fortschreitender Embryonierung abnimmt (Weston et al., 1984). Bei Mischinfektionen ist eine anschließende Larvendifferenzierung erforderlich. Allerdings besitzt auch dieser Test ähnlich wie der FECRT eine verhältnismäßig geringe Sensitivität (Martin et al., 1989). Die Durchführung des Larvenentwicklungstests (*Larval Development Assay*, LDA) ermöglicht die Detektion der Resistenz gegenüber allen Breitspektrumanthelminthika und führt aufgrund einer höheren Sensitivität (Detektionsgrenze von 10 %) zu einer guten Korrelation mit den Ergebnissen der *in vivo*-Tests. Unter der Einwirkung unterschiedlicher Anthelminthikakonzentrationen wird die Entwicklung vom Ei bis zur L3 bestimmt, deren Hemmung vorrangig als Folge einer Beeinflussung der Nahrungsaufnahme anzusehen ist (Coles et al., 1988; Gill et al., 1995). Ein weiteres Verfahren, das auf diesem Parameter beruht, ist das des *Larval Feeding Inhibition Assays* (LFIA), das im Rahmen der ML- und Imidazothiazolresistenzdiagnostik zur Verfügung steht. Die orale Aufnahmefähigkeit von L1 wird hier mithilfe Fluorescein-5-Isothiocyanat-markierter *E. coli* unter dem Einfluss serieller Anthelminthikaverdünnungen bestimmt (Álvarez-Sánchez et al., 2005b). Inwiefern sich die Suszeptibilität gegenüber IVM und/oder ACh-Agonisten auf die Motilität auswirkt, kann durch Anwendung des Larvenmotilitätstests (*Larval Motility Assay*), des Larvenmigrationsinhibitionstests (*Larval Migration Inhibition Assay*) bzw. des *Micromotility Meter Tests* (MMT) untersucht werden, bei denen der Anteil der paralysierten Larven bzw. adulten Würmer nach Anthelminthikainkubation bestimmt wird (Martin & Le Jambre, 1979; Folz et al., 1988; Gill et al., 1991; d'Assonville et al., 1996; Demeler et al., 2010).

Einen anderen Ansatz verfolgt das kolorimetrische Verfahren: Hier wird der Gehalt unspezifischer Esterasen BZ-empfindlicher und -resistenter Nematodenstämme miteinander verglichen. Dies hat den Vorteil, dass keine Abhängigkeit von dem Entwicklungsstadium der Eier vorliegt; allerdings ist für die Auswertung der Vergleich mit einem Referenzstamm erforderlich (Sutherland et al., 1989). Des Weiteren steht im Fall der BZ-Resistenzdiagnostik der Tubulin-Bindungstest zur Verfügung (Lacey & Prichard, 1986).

Trotz zahlreicher Vorteile der *in vitro*-Testverfahren, die sich in der Reduktion des Arbeits-/Zeitaufwandes sowie in der Verringerung der Kosten und der Variation zwischen den Wirten darstellen, wird die Anwendung, verglichen mit den *in vivo*-Testverfahren, auch von einigen Nachteilen begleitet: Zum einen können mit Hilfe dieser Testsysteme nicht die pharmakodynamischen bzw. -kinetischen Verhältnisse, denen der Wirkstoff im Parasiten bzw. Wirtsorganismus ausgesetzt ist, nachgestellt werden, durch die gegebenenfalls andere Interaktionen zwischen Parasit und Wirkstoff hervorgerufen werden. Eine weitere Herausforderung stellen die insbesondere bei den Spulwürmern komplexen Kultivierungsprozesse sowie das Fehlen freilebender Larvenstadien (Coles et al., 2006) dar, weshalb diese Art der Resistenzdiagnostik für diese Parasiten nur eingeschränkt geeignet ist. Dies macht sich auch in der vergleichsweise geringen Anzahl der für die Askariden beschriebenen *in vitro*-Testverfahren bemerkbar. Für *A. suum* wurde ein MMT mit Larven, die aus den Lungen experimentell infizierter Nager gewonnenen wurden, entwickelt (Bennett & Pax, 1986). Der inhibitorische Effekt verschiedener Stoffe auf die gesamte embryonale Entwicklung sowie die Entwicklung von der L2 zur L3 bzw. L3 zur L4 wurde ebenfalls untersucht (Rew et al., 1986; Urban et al., 2008). Als bedeutender Nachteil dieser Verfahren ist zu werten, dass, neben der langwierigen Durchführung, für die Gewinnung der Larven die experimentelle Infektion und anschließende Tötung von Versuchstieren erforderlich ist, welches einer routinemäßigen Anwendung in der Resistenzdiagnostik im Wege steht.

2.3.5.3 Molekulare Testverfahren

Neben anderen Verfahren zur PCR-basierten Detektion Resistenz-assoziiierter Mechanismen (siehe Kapitel 4.3.1) verdienen die Methoden der *Real-Time* PCR und der PyrosequenzierungTM besondere Beachtung. Diese bieten die Möglichkeit einer schnellen Auswertung und der Untersuchung gepoolter Proben. Eine *Real-Time* PCR steht z. B. für die Bestimmung der Allelfrequenzen am Codon 200 des β -Tubulin Isotyps 1 zur Verfügung (von Samson-Himmelstjerna et al., 2003; Álvarez-Sánchez et al., 2005a; Walsh et al., 2007; von Samson-Himmelstjerna et al., 2009). Das Verfahren der PyrosequenzierungTM beruht auf der Erkennung von Lichtsignalen, die durch den enzymatischen Abbau von Pyrophosphat während der DNA-Synthese entstehen. Die Stärke des empfangenen Signals ist demnach proportional zu der Menge des freigesetzten Pyrophosphats, welches seinerseits bei dem Einbau des jeweiligen komplementären Nukleotids frei wird. Durch die Kenntnis der Reihenfolge der zugeführten Nukleotide kann somit die Sequenz des zu untersuchenden Bereiches eindeutig bestimmt werden (Ronaghi et al., 1998; Nyrén, 2007). Auch diese Methode erwies sich als geeignet, um resistenzassoziierte SNPs zu identifizieren (von Samson-Himmelstjerna et al., 2009). Des Weiteren findet dieses Verfahren Anwendung bei der Detektion von Indels, kurzen Wiederholungen und kann zur *de novo* Sequenzierung verwendet werden.

Bei der Anwendung von kandidatengenorientierten Methoden zur Resistenzdetektion muss grundsätzlich die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass der Resistenz auch eine polygene Ursache zugrunde liegen kann. In diesem Fall oder auch bei einer Variation der Resistenzmechanismen zwischen den Spezies oder Isolaten kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass die bekannten Resistenz-übertragenden Allele immer vorhanden sind und detektiert werden können (Prichard et al., 1980; Coles et al., 2006; McCavera et al., 2007).

2.3.6 Resistenz: Retardierung und Reversion

Häufig vorgeschlagene Methoden präventiv der Resistenzentwicklung entgegenzutreten sind der Gebrauch von Anthelminthikakombinationen, ein alternierender Anthelminthikaeinsatz sowie größere Behandlungsintervalle. Auch der Erhalt eines Anteils an Individuen, die den empfindlichen Genotyp tragen (Refugium) und somit zu einer „Verdünnung“ der Resistenz-assoziierten Gene beitragen, verdient Beachtung (van Wyk, 2001). Hierfür ist es erforderlich, einen bestimmten Anteil der Population nicht dem Behandlungsdruck des angewendeten Anthelminthikums auszusetzen. Dies sind z. B. Eier und Larvenstadien in der Umwelt oder hypobiotische und migrierende Larven im Wirt (von Samson-Himmelstjerna et al., 2011). Auch das Unterlassen der Behandlung bestimmter Wirtstiere (i. d. R. diejenigen ohne klinische Symptomatik) kann zum Bestehen eines Refugiums beitragen (Kaplan, 2004). Je höher der Anteil dieser Individuen an der Gesamtpopulation ist, desto langsamer schreitet auch die Selektion auf Resistenz fort.

Im Gegensatz zu diesen vorbeugenden Maßnahmen führten Versuche, eine bereits bestehende Anthelminthikaresistenz rückgängig zu machen, meist nicht zum gewünschten Erfolg. Überlegungen, dass sich Resistenzen durch den Nichtgebrauch der betroffenen Wirkstoffe aufgrund eines Resistenz-assoziierten Fitnessnachteils (Reversion) oder durch den Gebrauch eines Wirkstoffes einer anderen chemischen Klasse mit anderem Wirkmechanismus (*Counter Selection*) wieder umkehren lassen, konnten bisher nicht bzw. nur kurzzeitig in der Praxis bestätigt werden (Leathwick et al., 2001; Leignel et al., 2010; von Samson-Himmelstjerna, 2012). Das Vorkommen der Resistenz-assoziierten Allele gegenüber dem zuerst angewandten Wirkstoff wird auf diese Weise zwar reduziert; nichtsdestotrotz bestehen die Allele zu einem

geringen Prozentsatz in der Population und können sich innerhalb kürzester Zeit nach erneuter Anwendung des betroffenen Wirkstoffes wieder ausbreiten (Sangster, 1999).

2 LITERATURÜBERSICHT

3 VERÖFFENTLICHUNGEN

3.1 Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

I.J.I. JANSSEN, J. KRÜCKEN, J. DEMELER, M. BASIAGA, S. KORNAŚ, G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA

Veröffentlicht bei PLOS ONE:
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0061635>

Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

I. Jana I. Janssen¹, Jürgen Krücken¹, Janina Demeler¹, Marta Basiaga², Sławomir Kornaś², Georg von Samson-Himmelstjerna^{1*}

¹ Institute for Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Germany, ² Department of Zoology and Ecology, University of Agriculture in Krakow, Poland

Abstract

Macrocyclic lactones (MLs) represent the major drug class for control of parasitic infections in humans and animals. However, recently reports of treatment failures became more frequent. In addition to human and ruminant parasitic nematodes this also is the case for the horse-nematode *Parascaris equorum*. Nevertheless, to date the molecular basis of ML resistance is still not understood. Unspecific resistance mechanisms involving transporters such as P-glycoproteins (Pgps) are expected to contribute to ML resistance in nematodes. Here, complete sequences of two *P. equorum* Pgps were cloned and identified as orthologs of *Caenorhabditis elegans* Pgp-11 and an unnamed *Caenorhabditis briggsae* Pgp designated as Pgp-16 using phylogenetic analysis. Quantitative real-time PCR was used to compare expression between tissues. Significantly higher *PeqPgp-11* expression was found in the gut for both genders, whereas for *PeqPgp-16* the body wall was identified as predominant expression site. Furthermore, Pgps were analyzed regarding their participation in resistance development. Using SeqDoC analyses, Pgp-sequences of *P. equorum* populations with different ML susceptibility were compared. This approach revealed three single nucleotide polymorphisms (SNPs) causing missense mutations in the *PeqPgp-11* sequence which correlated with decreased ML susceptibility. However, no resistance associated differences in mRNA expression levels were detected between embryonated eggs of these populations. In contrast, comparison of two pre-adult groups with different ivermectin (IVM) susceptibility revealed the presence of the three SNPs and in addition statistically significant *PeqPgp-11* overexpression in the group of worms with reduced susceptibility. These results indicate that Pgp-11 might be involved in IVM resistance in *P. equorum* as it shows increased expression in an IVM exposed life-cycle stage of an IVM resistant population as well as occurrence of putatively resistance associated SNPs in populations with reduced IVM susceptibility. These SNPs are promising diagnostic candidates for detection of ML resistance with potential also for other parasitic nematode species.

Citation: Janssen IJ, Krücken J, Demeler J, Basiaga M, Kornaś S, et al. (2013) Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility. PLoS ONE 8(4): e61635. doi:10.1371/journal.pone.0061635

Editor: Bernhard Kaltenboeck, Auburn University, United States of America

Received: January 1, 2013; **Accepted:** March 12, 2013; **Published:** April 24, 2013

Copyright: © 2013 Janssen et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a research grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, www.dfg.de) (SA973/3-1) and by funding from the Freie Universität Berlin (<http://www.fu-berlin.de>) for interim employment of IJJ. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: gvsamson@fu-berlin.de

Introduction

For decades macrocyclic lactones (MLs) have been used for the treatment and control of infections with endoparasitic nematodes and ectoparasitic arthropods in human and veterinary medicine [1]. Due to their extensive use, ML resistance has evolved in several parasites, as it also has been described for the two other major families of broad-spectrum anthelmintics routinely used in livestock, the benzimidazoles (BZ) and the agonists of the nicotinic acetylcholine receptor such as the tetrahydropyrimidine pyrantel and the imidazothiazole levamisole [2,3,4]. Even though the prevalence of ML resistant nematode populations increases, the resistance mechanisms remain largely unclear. Several possible mechanisms are discussed, including the activity of ATP-binding-cassette (ABC)-transporters, in particular P-glycoproteins (Pgps) [5]. Pgps are located in the apical cell-membrane, act as ATP-dependent transporters for hydrophobic xenobiotics such as

anthelmintics and decrease the concentration of the drugs at their target sites [6]. This effect finally prohibits an efficient treatment.

A correlation between Pgps and resistance to both BZs and MLs has already been described for some nematodes [7,8,9,10]. For *Caenorhabditis elegans*, 14 Pgp genes and one pseudogene have been published [11,12] or annotated in Wormbase and use of a Pgp-3 deficient strain demonstrated that this protein decreases sensitivity to colchicine and chloroquine [7]. In contrast, the loss of Pgp-1 results in hypersensitivity to heavy metals [13]. More recently, an overexpression of five Pgps was demonstrated in an ivermectin (IVM) resistant *C. elegans* strain [14]. Furthermore, eight Pgps were reported in *Brugia malayi* [15], nine full or partial sequences in *Haemonchus contortus* [10,16,17,18], at least two Pgp cDNAs in cyathostomins [19], eleven partial sequences in *Teladorsagia circumcincta* [20] and two full-length Pgp-encoding sequences in *Onchocerca volvulus* [17,21]. However, there are currently no database entries for *Parascaris equorum* Pgps although there are

3.1 Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

several *P. equorum* populations known to show reduced susceptibility or even resistance against IVM as reported from various countries in Europe and the Americas [22].

Due to its global distribution, high prevalence and severe pathogenicity, the nematode *P. equorum* is one of the most important parasitic pathogens of equines. In particular in foals and yearlings parascariosis can cause severe illness and even death. Infected horses can show several clinical signs, depending on the worm burden and ranging from nasal discharge and coughing, to a bad general condition and ceased growth, up to lethal intestinal obstruction and/or rupture. Treatment is generally carried out with BZs, tetrahydropyrimidines or MLs. In this context, *P. equorum* takes an exceptional position as it is the dose-limiting species for all currently available broad-spectrum anthelmintics in horses except for the tetrahydropyrimidines [23]. Moreover, due to its high pathogenicity for foals and yearlings, many horse breeders deworm this age group more than six times a year [24]. Therefore, it is not surprising that decreased susceptibility to anthelmintics in *P. equorum* is rapidly spreading and currently has become a key health concern for foals and young horses on many stud farms. This emphasizes the importance to decipher resistance mechanisms and to identify markers which can be used to detect developing resistance at an early stage. However, the number of routine molecular diagnostic tests for detection of anthelmintic resistance is restricted to the BZs, where resistance markers could already be identified and evaluated. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) which cause changes at codons 167, 198 or 200 in the β -tubulin isotype 1 gene are present in many BZ-resistant nematode populations [5]. In contrast, results for the MLs are more diverse: studies of the *T. circumcincta* and *H. contortus* glutamate-gated chloride channel (GluCl) subunits revealed no changes of the target genes which might be responsible for anthelmintic resistance [25,26]. On the other hand, mutations of the GluCl-subunits of *Cooperia oncophora* have been shown to cause a significant decrease in sensitivity to glutamate and IVM [27], although the identified SNPs have not yet been reported in any IVM resistant field isolates since then. Results appear to be similarly variable for the Pgps where a high frequency of polymorphisms in *pgp-9* of *T. circumcincta* was demonstrated but no resistance associated coding SNPs for the investigated region were identified [20]. It has also been shown that the restriction patterns of *H. contortus* *pgp-2* differ between IVM susceptible and IVM resistant populations [10]. Additionally, slightly increased *pgp-2* and *pgp-9* mRNA expression levels were demonstrated in resistant isolates of *H. contortus* [10,28] as well as *T. circumcincta* *pgp-9* [20] and *C. elegans* *pgp-1* and *pgp-2* [29]. In contrast, a decreased expression was shown for *pgp-1* in *H. contortus*.

The techniques to detect ML resistance in *P. equorum* populations are very limited. Since there are no laboratory hosts for *P. equorum* and *in vitro* culture is very labor intensive and only possible for a short time, molecular resistance markers would help to develop a particularly attractive diagnostic tool. Currently, the only option to diagnose resistance for this parasite is the fecal egg count reduction test (FECRT); however this test has not been validated for *P. equorum* yet. Moreover, this test provides no information regarding the proportion of resistant individuals in the population and has a high risk to be false negative when the frequency of resistant parasites is still low [30]. Additionally, results are only available after two weeks.

In order to find predictive molecular markers, parasites have to be screened for genetic changes. As IVM is a known substrate of mammalian Pgps [31], the objective of this work was to identify and characterize *P. equorum* Pgps. Remarkably, SNPs in non-drug target genes potentially involved in the development of ML

resistance were identified by comparing the coding sequences for specific Pgps between several populations with different IVM susceptibility. Furthermore, increased Pgp expression levels were encountered in a *P. equorum* isolate showing reduced IVM-susceptibility.

Materials and Methods

Parasite Material

Adult *P. equorum* worms were obtained from a necropsy of experimentally infected horses which were euthanized by bleeding through opening the carotid artery immediately following captive bolt stunning. Worms were stored at -80°C until use. Experiments were conducted in accordance with the German law (Tierschutzgesetz) and the European Union directive 2010/63/EU regarding animal welfare and approved by the Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) under the reference number 33.9-42502-05-07A499. Fecal samples were collected rectally from horses of six stud farms and were sent in the institute for routine diagnostic examinations. The remainders of the samples not used for diagnostic purposes were used for ascarid egg collection and thus no permit for sample collection was required according to current legislation. Two populations (collected from stud-farm A and B-1) were susceptible against ML and treatment with IVM resulted in complete elimination of *P. equorum* eggs in feces two weeks after treatment. From stud farm A eggs were collected in two sequential years showing no difference in ML susceptibility *in vivo*. For foals of stud farm B, no reduction but even an increase of the fecal egg count was found one year later when routine diagnostic controls after deworming with IVM were carried out by Flotac for 33% of the foals ($n=9$). For this reason, eggs from the same stud farm but collected at different points of time were classified as two populations in further investigations (B-1 and B-2). Besides eggs from farm B-2, the *P. equorum* population on an additional farm (E) did show decreased IVM susceptibility at the FECRT (i.e. FECR 0%; $n=9$). Samples of this farm were also taken in two different years with no hints of changes in ML susceptibility *in vivo*. Two other stud-farms (C and D) were not definitely classified being either IVM susceptible or having a decreased susceptibility as they just showed initial signs of decreased ML susceptibility: Repeated treatment with MOX was not successful for 17% of the foals ($n=23$) of stud farm D showing a FECR of 89.6% as determined by Flotac 19 days after treatment. At stud farm C, 22% of the examined foals ($n=23$) were still highly positive for *P. equorum* in the fecal examination 20 days after deworming with IVM (52–200 eggs per gram). Unfortunately, no pre-treatment data were available for this farm, so determination of the FECR was not possible. Ages of the examined foals ranged from four to eight months. Eggs were isolated from feces by sieving with different mesh sizes (120 μm and 80 μm , respectively) followed by sedimentation and flotation with saturated saline before eggs were diluted with tap water and stored in ventilated cell culture bottles at 4°C .

For quantitative reverse transcriptase-PCR, adult and pre-adult worms with unknown treatment of the infected horses were collected from a slaughterhouse in Slomniki near Kraków, Poland with permission by the slaughterhouse manager to isolate and use the ascarids for further analyses. A group of pre-adult worms which were suspected to be ML resistant was obtained from Prof. Bretislav Koudela (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic). These worms were collected from the small intestine of a three month old foal kept on a farm where horses were regularly treated with IVM and where ML resistance was suspected due to the persistence of egg shedding

post treatment (though no FECRT available). Pre-adult worms had a mean length of approximately 10 cm which suggests that the animal was infected within the first days after birth [32]. This group was compared with a randomly selected, size-matched group of worms from the slaughterhouse in Kraków.

Cloning and Sequencing of *PepPgps*

Total RNA was extracted from adult female worms using peqGOLD TriFast™ (Peqlab), following the manufacturer's instructions, after homogenization with a TissueRuptor (Qiagen). RNA was stored at -80°C until use.

Contaminating genomic DNA was eliminated by digestion with DNase I (Fermentas). First strand cDNA synthesis was performed with 160 ng of total RNA using the RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase Kit (Fermentas) and random hexamer primers according to the manufacturer's protocol with incubation at 22°C for 5 min followed by 50°C for 30 min, 60°C for 30 min and 85°C for 5 min. A nested PCR with degenerated primers (Table S1) [18] was performed to generate an initial PCR product of the internucleotide binding domain (IBD). The reaction contained 2.5 μl AccuPrime™ Buffer I (with dNTPs), 1 μM of each forward and reverse primers, 0.5 μl cDNA, 0.5 μl AccuPrime™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 16.5 μl dH₂O. After an initial denaturation at 94°C for 2 min, 40 cycles with 94°C for 15 s, 55°C for 30 s and 72°C for 1 min were performed. Gel-purified PCR products were cloned into the pCR4 TOPO vector (Invitrogen). Sequencing was carried out by GATC Biotech (Konstanz). Gene specific primers (Table S1) were designed from the sequenced fragments for RACE PCR (5'/3' RACE Kit, 2nd Generation, ROCHE), which allowed amplification of the respective full-length cDNA sequences.

Phylogenetic Analyses

For phylogenetic analysis, nucleic acid sequences were translated into amino acid sequences and these were compared with Pgp amino acid sequences of other nematodes as well as sequences of *Mus musculus*, *Schistosoma mansoni*, *Pediculus humanus corporis*, *Drosophila melanogaster*, *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus* as outgroup (for Genbank-accession numbers see Table S5). Sequences were first aligned with ClustalX2 using default parameters. The alignment was then analyzed with Prottest 3.0 [33,34] to identify the optimal amino acid substitution model. The number of substitution rate categories for this analysis was set to 8. Finally, a maximum likelihood tree was calculated using PhyML 3.0.1 [35,36] with 8 substitution rate categories and the LG+G+F model [37]. Both, nearest neighbor interchange (NNI) and subtree pruning and regrafting (SPR) moves were allowed. Calculations were started with one neighbor joining and five random trees to avoid trapping of the iterative optimization process in a local maximum of the likelihood function. Both the Shimodaira-Hasegawa [SH] approximate likelihood test and the Bayesian transformation of the approximate likelihood ratio test for branch support were calculated. The best tree was finally visualized using MEGA5.

SeqDoC Analyses

The six *P. equorum* populations with different ML susceptibility were compared regarding their Pgp cDNA sequences. For each population at least to independently obtained samples were analyzed. For RNA isolation approximately 5000 *P. equorum* eggs were crushed in tubes containing Buffer RLI1 (Macherey & Nagel) and ceramic beads of 0.4 to 0.6 mm (innuSpeed Lysis Tube S, Analytik Jena, Germany) with a Speed Mill homogenizer (Analytik Jena). Afterwards, RNA was isolated using the NucleoSpin RNA

XS-Kit (Macherey & Nagel) including a DNase treatment step during isolation. Additionally, RNA of individual pre-adult putatively resistant (Czech Republic worms) and randomly selected worms (from slaughterhouse in Krakow) was extracted with TriFast™ (Peqlab). RNA was reverse transcribed into cDNA with RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. RT-PCR was performed in a 10 μl reaction (1 μl AccuPrime™ Buffer I, 0.5 μM forward and reverse primers, 1 μl cDNA, 0.25 μl AccuPrime™ Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 4.75 μl dH₂O). For each Pgp sequence, eight pairs of gene-specific primer pairs covering the whole open reading frame with about 100 bp overlap between amplicons were used (Table S2). Cycling conditions were first an initial denaturation at 94°C for 2 min, then 40 cycles with 94°C for 15 s, 55°C for 30 s and 72°C for 45 s. PCR fragments of about 700 bp were excised from agarose gels, purified and directly sequenced using the gene-specific forward primer. For each of the eight overlapping fragments, sequence chromatogram files were entered into the SeqDoC web platform [38]. The detected SNPs were mapped to the full-length cDNA sequence and translated to discriminate silent and missense mutations and to find any potential amino acid changes. The chemical distance between these substitutions was determined according to Grantham [39]. Additionally, chromatogram files of sequences containing SNPs potentially involved in ML resistance were exported to GraphPad Prism 5.0.3 and area under curve of fluorescence signals detected for the corresponding bases was calculated.

Three-dimensional Modelling of Pgp-11

The webserver ESyPred2d was used to calculate a tertiary structure model using a 3D model of murine Pgp-1 deposited in PDB with accession no. 3G5U_A [40] as template. The model obtained for *P. equorum* Pgp-11 was visualized using Jmol, an open-source Java viewer for chemical structures in 3D (<http://www.jmol.org/>).

Real-time RT-PCR of *P. equorum* Eggs from Different Populations

For comparison of *P. equorum* Pgp expression levels in the different populations, quantitative RT-PCR was conducted. Embryonated *P. equorum* eggs of populations A-E were homogenized and RNA was subsequently extracted with the innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena) which already includes a genomic DNA removal step. RNA purity and amount were measured with a Take3 plate in a Synergy plate reader (Biotek). Due to the very small amount of RNA isolated from eggs, control of RNA integrity on the Bioanalyzer® was not possible. For each population approximately 80 ng RNA were used for the following cDNA synthesis with QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) per 20 μl reaction with another integrated genomic DNA removal step. Real-time RT-PCR was performed in a total reaction of 50 μl with 25 μl GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 0.2 μM each of a forward and reverse gene-specific primer for the particular *P. equorum* Pgp (Table S3), 18 μl dH₂O and 5 μl of template on white 96-well plates sealed with BZO adhesive optical film (Biozym, Germany). Reactions were carried out under the following PCR cycling conditions: After an initial denaturation step at 95°C for 2 min, 50 cycles with 95°C for 15 s, 59°C for 30 s and 72°C for 30 s were performed on a CFX96 Thermal Cycler (Biorad). Melting curves were recorded between 60°C and 95°C . Two biological replicates (from different sampling occasions) were analyzed for each of the five populations; for each replicate two cDNA syntheses were performed and each sample was analyzed in

3.1 Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

duplicates on the same plate (technical replicates). At least four independent PCR runs were performed, providing a minimum of eight replicates. Three RNAs, namely actin, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gpd-1*) and 18S rRNA, were used as reference genes for normalization according to MIQE guidelines [41]. Serial dilutions of plasmid DNA (from 4 to 4×10^6 copies per reaction) were used to obtain standard curves and calculate reaction efficiencies. Pgp gene expression was normalized to the geometric mean of the signals obtained from the reference genes as described by Hellemans et al. [42].

Real-time RT-PCR of Different *P. equorum* Tissues

A real-time RT-PCR was conducted to compare *pgp-11* and *pgp-16* mRNA expression between tissues. For this purpose, adult male and female worms were collected from the slaughterhouse (Kraków, Poland) and stored at -80°C in RNAlater (Sigma). Worms were dissected and from a middle body part, uterus, intestine and body wall of six female worms and the intestine and body wall of six male worms were collected. Unfortunately, clean preparation of testes was not possible with the material preserved in RNAlater. Homogenization of body wall and uterus was carried out in tubes containing ceramic beads of 1.4–1.6 mm, while the intestine was homogenized in tubes with ceramic beads with a size of 0.4–0.6 mm (Analytik Jena, Germany). RNA isolation, cDNA-synthesis and real-time RT-PCR were performed as described above. To ensure that no RNA degradation would influence results, RNA integrity was confirmed with the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Only RNA preparations with a RNA integrity number (RIN) >8.3 were used.

Real-time RT-PCR of Adult *P. equorum* Worms after Incubation with IVM

In order to investigate the influence of a short term incubation of *P. equorum* with IVM, adult worms were collected at an abattoir (Kraków, Poland), sexed and rinsed with pre-warmed artificial peritenteric fluid (APF) to remove host intestinal contents as previously described [43]. In brief, APF contained 5 mM MgCl_2 , 6 mM CaCl_2 , 24 mM KCl, 23 mM NaCl, 110 mM NaCH_3COO , 11 mM dextrose, 10 mM Tris and was adjusted to a final pH of about 7.5 at 37°C . Before IVM-challenge was carried out in ventilated cell culture flasks, worms were adapted to *in vitro* conditions at 37°C in APF for 18 h. Providing 20 ml of APF for each worm with either IVM (10^{-8} M or 10^{-9} M) or only 1% DMSO (vehicle control), worms were incubated for 12 h at 37°C . At a concentration of 10^{-9} M nearly all worms survived the treatment whereas higher IVM concentrations killed worms before the end of the incubation time. Therefore, only worms surviving exposure to 10^{-9} M IVM were used for quantitative analysis of gene expression, rapidly frozen and stored at -80°C until further use. Total RNA was extracted from individual female worms using the TriFast reagent as described above and RNA integrity was determined with the Bioanalyzer 2100 (RIN >9.1) before cDNA was synthesized. Further real-time RT-PCR steps were conducted as described above. Five biological replicates (individual worms) were analyzed per group and for each RNA preparation of individual worms, two cDNA syntheses were performed. PCR was carried out with two technical replicates resulting in at least four replicates per individual worm.

Comparison of Expression Levels between a Putatively Resistant and Random Group of *P. equorum*

Worms of a presumably IVM resistant population were collected from the small intestine of a foal and directly frozen at

-80°C . Samples of a group of pre-adult *P. equorum* worms with unknown treatment were collected from the slaughterhouse in Kraków, Poland. For gender determination, degenerated primers for vitellogenin-6 derived from corresponding sequences of *Ascaris suum*, *C. elegans* and *C. briggsae* (Table S4) were used in an RT-PCR to differentiate between female and male worms. Relative expression of *pgp-11* and *pgp-16* of each group containing five worms was compared with regard to the state of resistance of worms in a RT-qPCR. RNA quality was assessed and only RNAs with RIN >9.1 were used for downstream application. For each biological replicate, two separate cDNA synthesis were carried out, followed by two technical replicates for each cDNA.

Results

Sequencing of *P. equorum* Pgps

RT-PCR using degenerated primers resulted in 12 fragments localized in the IBDs of Pgps. These products had a size of approximately 408 bp. Identity of the obtained PCR products was confirmed by a nested PCR resulting in products of about 345 bp. Following 5'/3' RACE starting from two selected partial sequences allowed obtaining full-length sequences with a length of 3858 bp and 3855 bp, respectively. For the first sequence, a 5' spliced leader sequence SL1 [44] was identified upstream of the open reading frame. Sequences were deposited in the GenBank™ database with accession no. JX308230 and JX308231. Conceptual translation resulted in two putative protein products of 1285 and 1284 amino acids revealing typical, highly conserved Pgp domains such as two Walker A/P-loops, Walker B motif, Q-loop/lids, D-loop, H-loops/switch region, ABC transporter signature motifs as well as two ATP binding sites (Fig. S1). Predicted proteins have a calculated molecular weight of 141.05 kD and 139.45 kD, respectively. Phylogenetic analysis by maximum likelihood estimation using the deduced amino acid sequences from the two putative Pgps of *P. equorum* and Pgp sequences of several nematodes including the complete Pgp sets of *C. elegans* and *Caenorhabditis briggsae* (Table S5) revealed that nematode Pgps are monophyletic and did not evolve from different precursors present in a common protostomian ancestor. The first *P. equorum* Pgp sequence is orthologous to *C. elegans* Pgp-11 (accession-no.: NP_495674) (Fig. 1) and was therefore designated as *PeqPgp-11*. Blast analyses showed an identity of 37%. The other full-length sequence has no direct ortholog in the *C. elegans* Pgp-family, but is closely related to the *Caenorhabditis briggsae* CBG12969 sequence (accession-no.: XP_002630530). In the *C. elegans* genome, Pgp-3 and Pgp-4 (accession-no.: NP_509901 and NP_001257143) with an identity of 51% and 49%, respectively, were most closely related. According to the rules for gene nomenclature in nematodes [45] it was designated as *PeqPgp-16*. The most closely related sequences identified in GenBank were the *A. suum* Pgp orthologs MRP-1 (accession-no.: ADY40818) and MRP-3 (accession-no.: ADY40776) with 92% identity (99% similarity) and 93% identity (91% similarity) to *PeqPgp-11* and *PeqPgp-16*, respectively.

Single Nucleotide Polymorphisms in *P. equorum* Pgps

In order to compare the cDNA sequence of the two Pgps between different *P. equorum* populations, gene specific primer sets were used to amplify overlapping fragments of approximately 700 bp covering the complete coding sequences followed by sequencing and SeqDoC analysis. RNA was isolated from eggs collected from two sensitive (farms A and B1), two intermediate (farms C and D) and two populations with severely decreased susceptibility (farms B2 and E) to MLs. Several single nucleotide polymorphisms (SNP) could be identified in this way.

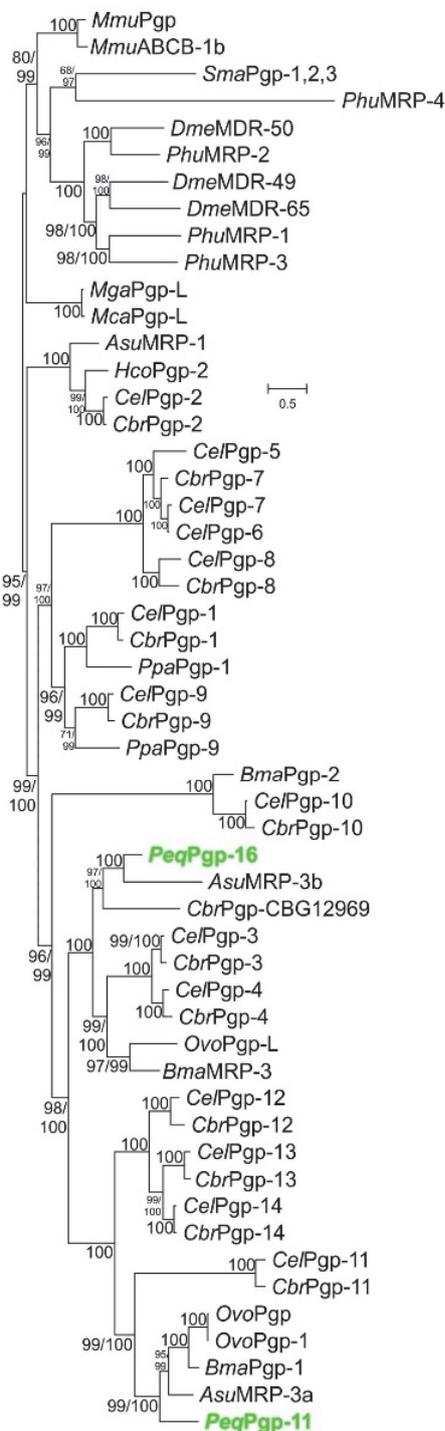


Figure 1. Maximum likelihood phylogenetic analysis of Pgp protein sequences from nematodes. Protein sequences were aligned using ClustalX2 under default conditions. Optimal amino acid substitution models were determined using Prottest 3.0 before calculating the most likely tree topology using PhyML3.0.1. The substitution model LG was used and PhyML was set to optimize the

number of invariant sites, the amino acid frequencies and the Γ shape parameter for modelling the distribution of the amino acid substitution rate categories which were set to eight. Both results of the approximate likelihood ratio test modified according to Shimodaira and Hasegawa (before the slash) and of a Bayesian-like transformation of the approximate likelihood ratio test (after the slash) are shown as branch supports. As outgroup, Pgp sequences from mouse (*Mmu*), *Drosophila melanogaster* (*Dme*), *Pediculus humanus corporis* (*Phu*), *Schistosoma mansoni* (*Sma*) were used. The complete Pgp protein families of *Caenorhabditis elegans* (*Cel*) and *Caenorhabditis briggsae* (*Cbr*) were included. In addition, available annotated Pgp sequences of *Pristionchus pacificus* (*Ppa*) and of the parasites *Ascaris suum* (*Asu*), *Brugia malayi* (*Bma*), *Haemonchus contortus* (*Hco*) and *Onchocerca volvulus* (*Ovo*) were used for alignment. Pgp, P-glycoprotein; MDR, multi-drug resistance protein. The scale bar represents the indicated number of substitutions per site. Accession numbers for protein sequences in the tree are provided in Table S5.

doi:10.1371/journal.pone.0061635.g001

For *PeqPgp-16* cDNA, the analysis revealed only seven SNPs (Table S7 and Fig. S1), two of them missense and five silent mutations, but none of them was consistently present in all investigated populations with decreased ML susceptibility.

In contrast, the corresponding analysis of the *PeqPgp-11* cDNA revealed 29 polymorphisms by comparing the partial sequences of all populations (Table S6 and Fig. S1). Fifteen SNPs resulted in a silent mutation, whereas 14 caused amino acid substitutions. Most of them were localized in the NH₂-terminal part of the first transmembrane domain region whereas three of these missense SNPs were found in the COOH-terminal part of the second transmembrane domain region within a range of about 50 amino acids (Fig. S1). In IVM susceptible and intermediate populations both alleles were identified at all three positions although the frequency of the minor allele in the susceptible population was strongly increased in the intermediate populations (Fig. S2 and Table 1). In contrast, populations with decreased susceptibility were homozygous and revealed exclusively that allele which was present at only about 20–25% in the susceptible populations. All three SNPs caused a change in the deduced amino acid sequence, *i.e.* from aspartic acid to asparagine (Asp931Asn), from cysteine to serine (Cys951Ser) and from tyrosine to histidine (Tyr978His). The chemical differences according to the scale of Grantham [39] between these amino acids are 23, 112 and 83, respectively (Table S6). The first and the last polymorphism were caused by a substitution at the first position of the codon, while the substitution of the second amino acid was a result of a change in the second codon position. A three dimensional model of *PeqPgp-11* was calculated using the ESyPred3D webserver [46] and mouse Pgp-1 (PDB accession no.: 3G5U_A) as template. Fig. S3A reflects the position of the three substituted amino acids and highlights their proximity to residues known to be involved in drug binding in the mouse Pgp. The latter were described to interact with the Pgp substrates QZ59-SSS, QZ59-RRR or verapamil [40] and the corresponding amino acids in *PeqPgp-11* were identified from a local alignment of both sequences (Fig. S3B). Interestingly, only nine out of 27 residues involved in substrate binding are conserved between both proteins suggesting that there are substantial differences in the properties of the substrate binding pockets of both transporters.

Tissue-specific Expression Patterns of pgp mRNAs

Comparison of expression levels for both pgp mRNAs identified several significant differences. In general, differences in expression levels were much higher for pgp-16 than for pgp-11 (Fig. 2). For pgp-11, significantly lower expression was found in the uterus compared to the female gut, and for the male body wall compared to the male gut (Fig. 2A). Moreover, expression was higher in male

3.1 Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

Table 1. Allele frequencies in different *Parascaris equorum* populations.

Position	N ^b	Population ^a						Czech ^c	Poland ^d
		A	B1	B2	C	D	E		
2791	G	78	80	—	62.7	44	—	58.7	72.8
	A	22	20	100	37.3	56	100	41.3	27.2
2852	G	79.3	75.8	—	61.3	42.7	—	56.1	75.3
	C	20.7	24.2	100	38.7	57.3	100	43.9	24.7
2932	T	71.6	63.2	—	50	32.3	—	45.9	60.3
	C	28.4	36.8	100	50	67.7	100	54.1	39.7

^aPopulations from farms are encoded only by letter code used throughout the manuscript. Values were obtained from the area under the curve of the corresponding pgp-11 sequence chromatograms of *P. equorum* populations showing different ML susceptibility. All values are given in %.

^bNucleotide.

^cPutatively resistant pre-adult worms from Czech Republic.

^dRandomly selected pre-adult worms from Krakow.

doi:10.1371/journal.pone.0061635.t001

than female gut. The pgp-16 mRNA expression was higher in male than in corresponding female tissues and in male body wall than in male gut (Fig. 2B).

Expression Levels of pgp mRNAs in Eggs of Different *P. equorum* Populations

Constitutive expression-levels of both Pgps in eggs from the six populations with different ML susceptibility were measured by RT-qPCR. All expression levels were normalized to the susceptible *P. equorum* population from stud-farm A. Variation between the biological replicates was very small whereas huge differences in the expression levels of the pgp-11 and pgp-16 transcripts were observed between the different populations (Fig. 3). However, no consistent patterns of Pgp-expression between ML susceptible populations on one hand and populations with decreased IVM susceptibility on the other hand were observed.

In vitro Effects of IVM on pgp mRNA Expression in Adult Worms

Adult *P. equorum* from a phenotypically uncharacterized Polish field population were cultured *in vitro* in the presence of 10⁻⁸ and 10⁻⁹ M IVM for 18 h before RNA isolation. All worms incubated in 10⁻⁸ M IVM died during incubation. In contrast, most worms incubated in 10⁻⁹ M IVM survived and RNA was extracted only from worms that were still motile after 18 h to prevent that potential degradation of RNA could compromise the analyses. Real-time RT-PCR did not show any significant differences between controls and IVM exposed individuals regarding pgp-11 and pgp-16 mRNAs (Fig. 4).

Comparison of a Putatively Resistant and a Random Group of *P. equorum*

Two groups of randomly selected male and female worms of young adult *P. equorum* were compared to a group of worms of the same development stage but with an assumed resistant phenotype due to treatment failure. Sequence comparison using the SeqDoC method revealed for the random group a genotype corresponding to the one of the susceptible *P. equorum* populations described above. In contrast, the group showing the resistant phenotype revealed frequencies of the three SNP correlating with decreased susceptibility between 41.3% and 54.1% (Table 1).

Resistance was associated with a significant 5.9 fold increase of pgp-11 expression in male worms (p = 0.008) while a 1.5 fold higher expression in putatively resistant female worms was just not

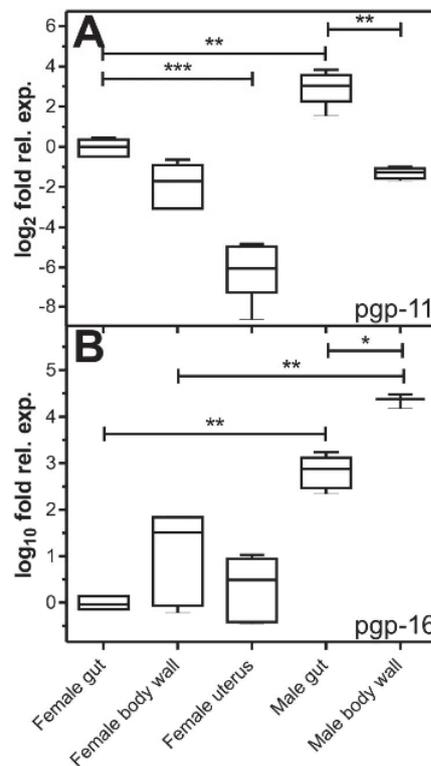


Figure 2. Tissue expression pattern of *P. equorum* pgp mRNAs.

Expression of pgp-11 (A) and pgp-16 (B) mRNAs was measured in gut, body wall, and uterus of 5–6 female and male worms. Real-time RT-PCR was performed on individual worms using actin and gpd-1 mRNA and 18S rRNA as reference genes. Two biological replicates were investigated for each population and each replicate was analyzed in two technical repeats of two independent cDNA samples. All individual values were normalised to the mean of the respective controls. Whiskers represent minimal and maximal values. A Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test was performed to identify significant differences between the three female tissues. Mann-Whitney U tests were conducted to identify differences between the male tissues and between males and females for the same tissue. ***, p < 0.001; **, p < 0.01; *, p < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0061635.g002

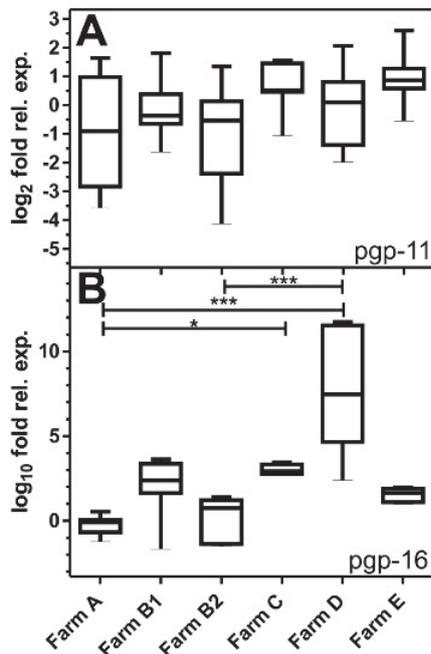


Figure 3. Expression of pgg-11 (A) and pgg-16 (B) mRNAs in *Parascaris equorum* eggs. Expression of mRNAs was compared between populations showing full (farms A and B1), intermediate (farms C and D) or decreased (farms B2 and E) ML susceptibility. RNA was extracted from eggs obtained from five different stables (farms A-E). Farm B was represented twice, once when IVM was still fully effective (farm B1) and a second time when efficacy was severely compromised (farm B2). Real-time RT-PCR was performed in four biological replicates and two technical replicates. Actin and *gpd-1* mRNA and 18S rRNA were used as reference genes. All individual values were normalized to the mean of the respective controls. Whiskers represent minimal and maximal values. A Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test was performed to identify significant differences between the six farms. ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0061635.g003

significant ($p = 0.056$) (Fig. 5A). Moreover, a significant difference was found by comparing male and female worms within the random groups showing a 2.7 fold higher expression of Pgp-11 in female than in male worms (p -value < 0.016), but not by comparing both genders between putatively resistant worms. The pgg-16 mRNA expression did not show any significant differences associated with resistance of worms (Fig. 5B).

Discussion

Anthelmintic resistance in nematodes is an increasing problem in livestock but is also seen or is suspected to occur in human parasites such as *O. volvulus* [4,47] and *Trichuris trichiura* [48]. During the past years, once very powerful broad-spectrum-anthelmintics such as IVM had to forfeit their efficacy against several parasite species. Therefore, it is important to characterize the mechanisms which are responsible for this development in order to (I) prolong the activity of existing drugs and (II) be aware of these mechanisms for the development of novel, resistance-breaking drugs in the future. ML resistance in nematodes has often been proposed to be associated with Pgp-mediated drug efflux [3] and for several organisms, these proteins and their sequences were already partially characterized. However, this was not yet the case

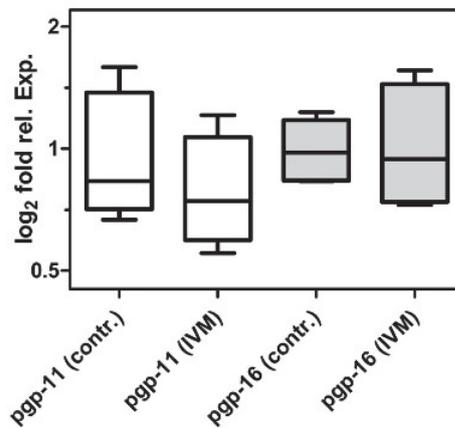


Figure 4. Effects of *in vitro* IVM incubation on Pgp mRNA expression. Adult male *P. equorum* ($n = 5$) were incubated for 18 h in 10^{-8} M IVM (IVM) or only in 1% DMSO as vehicle (contr.). Real-time RT-PCR was performed on individual worms using actin and *gpd-1* mRNA and 18S rRNA as reference genes. Expression of pgg-11 (open boxes) and pgg-16 (grey boxes) are shown. At least two cDNA syntheses were made for each biological replicate and used for two technical replicates each. All individual values were normalized to the mean of the respective controls. Whiskers represent minimal and maximal values. No significant differences were found. doi:10.1371/journal.pone.0061635.g004

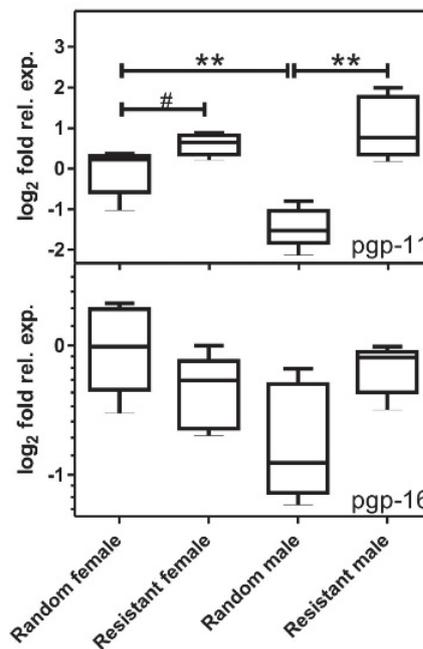


Figure 5. Expression of pgg-11 and pgg-16 mRNAs in pre-adult *Parascaris equorum*. A randomly chosen group ($n = 5$) was compared with a group where ML treatment failed ($n = 5$). As a reference, expression of the actin, *gpd-1* and 18S rRNA genes was measured. Real-time RT-PCR was conducted in duplicate for each sample using two different cDNAs for each biological replicate. Differences between randomly selected and putatively resistant worms were identified with Mann-Whitney U tests. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; #, $p < 0.056$. doi:10.1371/journal.pone.0061635.g005

3.1 Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

for *P. equorum*, although this nematode showed a decreased susceptibility against MLs in several studies [23]. It is noteworthy that for *P. equorum*, like for most other parasitic nematodes, no laboratory animal or *in vitro* life cycle model is available to date. This is a major constraint for the study of mechanistic or functional processes in this parasite. Furthermore, such work is hampered by the very high costs and ethical limitations when using horses in experimental studies. Accordingly also in the present study it was only possible to use parasite material derived from field infections and consequently differing genetic background as well as only comparatively limited opportunities for phenotypic characterization.

The two Pgp cDNAs identified in this work provide the first information about *P. equorum* multi-drug transporters. It does not surprise that phylogenetic analyses revealed for both sequences a close resemblance to amino acid sequences of Pgps from the phylogenetically most closely related *A. suum*. However, for these transporters no further information except for the sequences is available. Comparison with corresponding sequences of other nematodes showed also a close relationship of *PeqPgp-11* to *C. elegans* Pgp-11 as well as to *O. volvulus* Pgp and Pgp-1 which have already been linked to ML resistance [21,49]. In order to prevent any confusion, it should probably be mentioned that both *O. volvulus* cDNAs were not designated according to orthology with *C. elegans* orthologs. *C. elegans* Pgp-11 was found to be expressed in the excretory cell and in the intestine [50]. Similar locations were identified for the ortholog of *P. equorum* where the examination of different tissues for their Pgp expression levels revealed that in both genders a significantly higher expression was found in the intestine compared to body wall and uterus. The sequence of *PeqPgp-16* is apparently an ortholog to *C. briggsae* CBG12969 and is relatively closely related to *C. elegans* and *C. briggsae* Pgp-4 and Pgp-3. The *C. elegans* *pgp-3* gene has been shown to be involved in protection against toxic compounds such as colchicine and chloroquine [7] as well as against bacterial toxins [51]. More recently, an association between overexpression of *C. elegans* *pgp-4* and IVM resistance was demonstrated [14]. For *C. elegans* *pgp-4*, the excretory cell was identified as the main expression site, whereas results for *C. elegans* *pgp-3* indicate expression predominantly in the intestine and the excretory cell [50]. Results for *P. equorum* *pgp-16*, revealed a high expression in the body wall containing not only muscle cells and hypodermis but also the excretory cell. Further *in situ* hybridization analyses will be required to identify the cellular source of *pgp-16* mRNA in the body wall.

Pgps might contribute to the development of resistance by either overexpression [10,20,52] or changes in their primary structure that could lead to accelerated transport of anthelmintics. Comparison of two ML susceptible, two intermediate and two populations with decreased ML susceptibility revealed only a few mutations for *PeqPgp-16*, most of them silent. Regarding *pgp-16* expression levels, no consistent up- or down-regulation of *pgp-16* correlating with decreased ML susceptibility was found. Furthermore, in another experiment using a phenotypically uncharacterized field population IVM exposure *in vitro* did also not increase its expression. We therefore conclude that *PeqPgp-16* does not contribute to decreased ML susceptibility at least in the populations studied here.

In contrast, corresponding studies on Pgp-11 imply a putative contribution to ML resistance of this transporter. In particular, besides several other coding and silent SNPs, three amino acid substitutions were strongly increased in frequency or exclusively present in populations with intermediate and decreased ML susceptibility, respectively.

Aller et al. [40] described the three-dimensional structure of the mouse Pgp (ABCB1) with drug-binding sites in the internal cavity. Mapping of these amino acid residues and the three resistance-correlated exchanges to a calculated 3D model of *P. equorum* Pgp-11 revealed that the three amino acid residues are close to or in the putative drug binding region. Increased IVM affinity of Pgp-11 due to these mutations is an attractive hypothesis that could explain why such SNPs have apparently been selected in IVM resistant populations. Further experimental work involving recombinant *P. equorum* Pgp-11 from susceptible and resistant populations and characterization of their transport properties will be required to corroborate this hypothesis. There are currently no guidelines from the World's Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) for conducting the FECRT in *P. equorum*, in part due to the facts that there is (I) no correlation between worm burdens and egg counts [53] and (II) a high variability in egg counts even in samples repeatedly taken from the same animal [32]. Nevertheless, FECRT data are currently considered to be the only way to at least roughly estimate resistance. In particular since there is no standardized protocol for detection of resistance against ML, the SNPs and expression differences identified here can well be the basis for development of molecular tests as previously described for resistance to benzimidazoles [54]. In the absence of any validated *in vivo* or *in vitro* tests available for detection of resistance in ascarids, the opportunity to develop and evaluate molecular tests using the data provided here might be important also for human diseases such as ascariasis and toxascariasis. Validating and using the identified SNPs as molecular markers for resistance using for instance comparison of systematic comparison of FECRT data and SNP frequencies (e.g. by pyrosequencing) could solve this problem.

Increased expression of *Peqpgp-11* would further substantiate the view that Pgp-11 contributes to IVM resistance in *P. equorum*. However, incubation of worms *in vitro* for 12 h did not modify *pgp-11* mRNA expression. Moreover, *P. equorum* eggs were investigated by real-time RT-PCR, but no correlation between ML tolerance and *pgp-11* mRNA levels was found. In marked contrast, pre-adult worms obtained from a presumably resistant *P. equorum* population showed significant overexpression of *pgp-11* mRNA in male and female worms. In addition, the three SNPs identified in the eggs of other populations with decreased susceptibility were found with a frequency similar to that found in the intermediately resistant *P. equorum* populations. These findings imply that the susceptibility to MLs in *P. equorum* can be dependent on both changes in Pgp-11 primary structure and *pgp-11* expression levels. Further studies involving more adult stages will reveal whether this gene generally shows higher expression levels in ML resistant worms.

The reason for the different Pgp-11 expression patterns of the two development stages might be explained by lower expression levels of Pgps in earlier development stages than in adults due to other protective mechanisms. The high tenacity of embryonated ascarid eggs is probably based on the eggshell constituting an effective barrier for most compounds. Therefore, exposure to xenobiotics and need for efflux effectors such as Pgps might be lower compared to free larvae and adult worms which are in direct contact to exogenous compounds. Comparison of non-feeding, relatively resistant third larvae of *H. contortus* showed similar results, i.e. no significant differences were found in expression of nine Pgp mRNAs between a resistant and susceptible strain [16]. These authors suggested, among noting that only constitutive mRNA levels were under investigation, expression may change throughout the life cycle. They conclude that developmental stages living in compartments with the highest risk for an IVM exposure

require more protection through Pgps than stages without regular exposure to the drug. Indeed adult worms of *O. volvulus* were shown to have higher expression of two Pgp-genes than third stage larvae [21]. Nevertheless it should be mentioned that for other ML resistant nematodes such as *T. circumcincta* significant increases of the Pgp transcript levels were found throughout the whole life-cycle especially in the eggs [20]. Kerboeuf et al. [55] described significantly higher Pgp amounts on the egg-surface of *H. contortus* resistant to BZs and IVMs. These results are in apparent opposition to those reported in this study but the differences might be explained by different life cycles and differences in the egg structure between trichostrongylid and ascarid nematodes. Probably, there are different possible mechanisms to acquire ML resistance and various species (or even populations) might therefore differ in their actual resistance mechanisms.

In conclusion, this study suggests involvement of Pgp-11 in the level of IVM susceptibility in *P. equorum*. Increase in *pgp-11* mRNA expression was observed in one putatively resistant population. Most importantly increased frequency of *pgp-11* alleles differing in three SNPs from the predominant alleles in susceptible populations was observed in several populations with decreased IVM susceptibility. Bourginat et al. [56,57] identified SNPs in *Dirofilaria immitis* Pgps which are correlated to ML susceptibility/resistance. While one SNP was non-coding, the other caused a conservative change from lysine to arginine, immediately before the second nucleotide binding domain. Herein, we describe for the first time putatively ML resistance associated non-synonymous SNPs located in substrate binding regions of Pgps. This further corroborates the hypothesis that MLs select for certain Pgp genotypes. However, further functional analysis involving recombinant expression of both alleles and quantification of ML transport are required to prove involvement of the herein described SNPs in ML resistance in *P. equorum*. To date, molecular markers for detection of IVM resistance are urgently required and this study provides promising candidates obtained by comparison of field populations. Whether the identified SNPs might be useful as molecular markers for early detection of resistance will be evaluated by comparing additional field populations differing in geographical origin and resistance status. Moreover, analysis of corresponding regions in *pgp-11* genes from ML resistant nematodes of other species will further help to elucidate the involvement of Pgps in development of IVM resistance in general.

Supporting Information

Figure S1 Organization of the conserved domains and identified SNPs in *PeqPgp-11* and *PeqPgp-16*. ATP-binding sites are indicated in green, transmembrane domains in blue and further typical, conserved Pgp motifs in red. Length of the cDNA sequence is shaded in light grey. TMD, transmembrane domain; WA, Walker A/P-loop; WB, Walker B domain; WC, Walker C/linker peptide; D, D-loop; H, H-loop/switch region; Q, Q-loop/lid; (PDF)

Figure S2 Frequencies of alleles correlating with IVM susceptibility. Chromatograms showing partial coding sequences of *PeqPgp-11* with positions of ML resistance associated SNPs of

three farms of different ML susceptibilities: ML susceptible (farm A), intermediate ML susceptibility (farm C) and decreased ML susceptibility (farm E). Compared to the susceptible farms, farms of intermediate susceptibility had a tendency to the resistant genotype but still both alleles were present at all positions. In contrast, bases were replaced completely in farms of decreased susceptibility. (PDF)

Figure S3 Three dimensional model of *PeqPgp-11* structure. (A) Residues corresponding to drug binding residues in the mouse Pgp-1 [40] (blue) and residues differing in *PeqPgp-11* due to the three SNPs correlating with decreased IVM susceptibility (red) are highlighted in the 3D model. (B) Partial sequence alignments of mouse Pgp-1 and *PeqPgp-11* for regions involved in substrate binding. Identical and similar residues which are highlighted in dark grey and light grey, respectively. Amino acids known to be involved in substrate binding in *M. musculus* Pgp-1 are marked by asterisks. (PDF)

Table S1 Primer sets used for RACE PCR and amplification of two full length sequences of *P. equorum* Pgps. (DOCX)

Table S2 Primer sets used for amplification of PCR products compared by SeqDoC analysis. (DOCX)

Table S3 Primer pairs used for real-time PCR of *PeqPgp-11*, *PeqPgp-16* and reference genes *actin*, *gpd-1* and *18SrRNA*. (DOCX)

Table S4 Primer set for gender determination. Degenerated primers were generated from corresponding sequences of *Ascaris suum*, *C. elegans* and *C. briggsae*. (DOCX)

Table S5 NCBI accession numbers and Worm Base ID for protein sequences used for maximum likelihood tree. (DOCX)

Table S6 Position of single-nucleotide-polymorphisms in *PeqPgp-11* detected by SeqDoC analysis. (DOCX)

Table S7 Position of single-nucleotide-polymorphisms in *PeqPgp-16* detected by SeqDoC analysis. (DOCX)

Acknowledgments

We thank Prof. Bretislav Koudela for the supply of pre-adult *P. equorum*.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JK GvSH IJJ. Performed the experiments: IJJ MB. Analyzed the data: IJJ JK JD. Contributed reagents/materials/analysis tools: GvSH SK. Wrote the paper: IJJ JK JD MB SK GvSH.

References

- Campbell WC (2011) History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Curr Pharm Biotechnol* 13: 853–865.
- Sangster NC, Gill J (1999) Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitol Today* 15: 141–146.
- Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC (2004) Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol* 20: 469–476.
- Osei-Atweneboana MY, Awadzi K, Attah SK, Boakye DA, Gyapong JO, et al. (2011) Phenotypic evidence of emerging ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e998.

3.1 Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

Parascaris Equorum: Pgp and Ivermectin Resistance

- Beech RN, Skuce P, Bartley DJ, Martin RJ, Prichard RK, et al. (2011) Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? *Parasitology* 138: 160–174.
- Kerboeuf D, Blackhall W, Kaminsky R, von Samson-Himmelstjerna G (2003) P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *Int J Antimicrob Agents* 22: 332–346.
- Broeks A, Janssen HW, Calafat J, Plasterk RH (1995) A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins. *EMBO J* 14: 1858–1866.
- Blackhall WJ, Liu HY, Xu M, Prichard RK, Beech RN (1998) Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 95: 193–201.
- Blackhall WJ, Prichard RK, Beech RN (2008) P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Vet Parasitol* 152: 101–107.
- Xu M, Molento M, Blackhall W, Ribeiro P, Beech R, et al. (1998) Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol Biochem Parasitol* 91: 327–335.
- Lincke CR, The I, van Groenigen M, Borst P (1992) The P-glycoprotein gene family of *Caenorhabditis elegans*. Cloning and characterization of genomic and complementary DNA sequences. *J Mol Biol* 228: 701–711.
- Prichard RK, Roulet A (2007) ABC transporters and beta-tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology* 134: 1123–1132.
- Broeks A, Gerrard B, Allikmets R, Dean M, Plasterk RH (1996) Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 15: 6132–6143.
- Yan R, Urdaneta-Marquez L, Keller K, James CE, Davey MW, et al. (2012) The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Vet Parasitol* 190: 519–529.
- Ardelli BF, Stitt LE, Tompkins JB (2010) Inventory and analysis of ATP-binding cassette (ABC) systems in *Brugia malayi*. *Parasitology* 137: 1195–1212.
- Williamson SM, Wolstenholme AJ (2011) P-glycoproteins of *Haemonchus contortus*: development of real-time PCR assays for gene expression studies. *J Helminthol* 86: 1–7.
- Kwa MS, Okoli MN, Schulz-Key H, Okongkwo PO, Roos MH (1998) Use of P-glycoprotein gene probes to investigate anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* and comparison with *Onchocerca volvulus*. *Int J Parasitol* 28: 1235–1240.
- Sangster NC, Bannan SC, Weiss AS, Nuff SC, Klein RD, et al. (1999) *Haemonchus contortus*: sequence heterogeneity of inter-nucleotide binding domains from P-glycoproteins. *Exp Parasitol* 91: 250–257.
- Drogemuller M, Schnieder T, von Samson-Himmelstjerna G (2004) Evidence of p-glycoprotein sequence diversity in cyathostomins. *J Parasitol* 90: 998–1003.
- Dicker AJ, Nisbet AJ, Skuce PJ (2011) Gene expression changes in a P-glycoprotein (Tci-pgp-9) putatively associated with ivermectin resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol* 41: 935–942.
- Huang YJ, Prichard RK (1999) Identification and stage-specific expression of two putative P-glycoprotein coding genes in *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* 102: 273–281.
- Reinemeyer CR (2009) Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasit Vectors* 2 Suppl 2: S8.
- Reinemeyer CR (2011) Anthelmintic resistance in non-strongylid parasites of horses. *Vet Parasitol* 185: 9–15.
- von Samson-Himmelstjerna G, Traversa D, Demeler J, Rohn K, Milillo P, et al. (2009) Effects of worm control practices examined by a combined faecal egg count and questionnaire survey on horse farms in Germany, Italy and the UK. *Parasit Vectors* 2 Suppl 2: S3.
- Hejmadi MV, Jagannathan S, Delany NS, Coles GC, Wolstenholme AJ (2000) L-glutamate binding sites of parasitic nematodes: an association with ivermectin resistance? *Parasitology* 120 (Pt 5): 535–545.
- Rohrer SP, Birzin ET, Eary CH, Schaeffer JM, Shoop WL (1994) Ivermectin binding sites in sensitive and resistant *Haemonchus contortus*. *J Parasitol* 80: 493–497.
- Njue AI, Hayashi J, Kinne L, Feng XP, Prichard RK (2004) Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel alpha3 and beta subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *J Neurochem* 89: 1137–1147.
- Williamson SM, Storey B, Howell S, Harper KM, Kaplan RM, et al. (2011) Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 180: 99–105.
- James CE, Davey MW (2009) Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol* 39: 213–220.
- Miller GM, Waghorn TS, Leathwick DM, Gilmour ML (2006) How repeatable is a faecal egg count reduction test? *N Z Vet J* 54: 323–328.
- Lespine A, Ménez C, Bourguinat C, Prichard RK (2012) P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *Int J Parasitol: Drug Drug Resist* 2: 58–75.
- Clayton HM, Duncan JL (1979) The migration and development of *Parascaris equorum* in the horse. *Int J Parasitol* 9: 285–292.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2011) ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27: 1164–1165.
- Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21: 2104–2105.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, et al. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59: 307–321.
- Anisimova M, Gil M, Dufayard JF, Dessimoz C, Gascuel O (2011) Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Syst Biol* 60: 685–699.
- Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* 25: 1307–1320.
- Crowe ML (2005) SeqDoC: rapid SNP and mutation detection by direct comparison of DNA sequence chromatograms. *BMC Bioinformatics* 6: 133.
- Grantham R (1974) Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185: 862–864.
- Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, et al. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323: 1718–1722.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622.
- Hellemans J, Mortier G, De Paep A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8: R19.
- Weisblat DA, Russell RL (1976) Propagation of Electrical Activity in the Nerve Cord and Muscle Syncytium of the Nematode *Ascaris lumbricoides*. *J Comp Physiol* 107: 293–307.
- Krause M, Hirsh D (1987) A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. *Cell* 49: 753–761.
- Beech RN, Wolstenholme AJ, Neveu C, Dent JA (2010) Nematode parasite genes: what's in a name? *Trends Parasitol* 26: 334–340.
- Lambert C, Leonard N, De Bolle X, Depiereux E (2002) ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* 18: 1250–1256.
- Lustigman S, McCarter JP (2007) Ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*: toward a genetic basis. *PLoS Negl Trop Dis* 1: e76.
- Diawara A, Drake IJ, Suswillo RR, Kihara J, Bundy DA, et al. (2009) Assays to detect beta-tubulin codon 200 polymorphism in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e397.
- Ardelli BF, Guerrero SB, Prichard RK (2005) Genomic organization and effects of ivermectin selection on *Onchocerca volvulus* P-glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol* 143: 58–66.
- Zhao Z, Sheps JA, Ling V, Fang LL, Baillie DL (2004) Expression analysis of ABC transporters reveals differential functions of tandemly duplicated genes in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 344: 409–417.
- Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96: 47–56.
- Menez C, Mselli-Lakhal L, Foucaud-Vignault M, Balaguer P, Alvinerie M, et al. (2011) Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line. *Biochem Pharmacol* 83: 269–278.
- Nielsen MK, Baptiste KE, Tolliver SC, Collins SS, Lyons ET (2010) Analysis of multiyear studies in horses in Kentucky to ascertain whether counts of eggs and larvae per gram of feces are reliable indicators of numbers of strongyles and ascarids present. *Vet Parasitol* 174: 77–84.
- von Samson-Himmelstjerna G, Walsh TK, Donnan AA, Carriere S, Jackson F, et al. (2009) Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. *Parasitology* 136: 349–358.
- Kerboeuf D, Guegnard F, Vern YL (2003) Detection of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance against anthelmintics in *Haemonchus contortus* using anti-human mdr1 monoclonal antibodies. *Parasitol Res* 91: 79–85.
- Bourguinat C, Keller K, Bhan A, Peregrine A, Geary T, et al. (2011) Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*. *Vet Parasitol* 181: 388–392.
- Bourguinat C, Keller K, Blagburn B, Schenker R, Geary TG, et al. (2011) Correlation between loss of efficacy of macrocyclic lactone heartworm anthelmintics and P-glycoprotein genotype. *Vet Parasitol* 176: 374–381.

3 VERÖFFENTLICHUNGEN

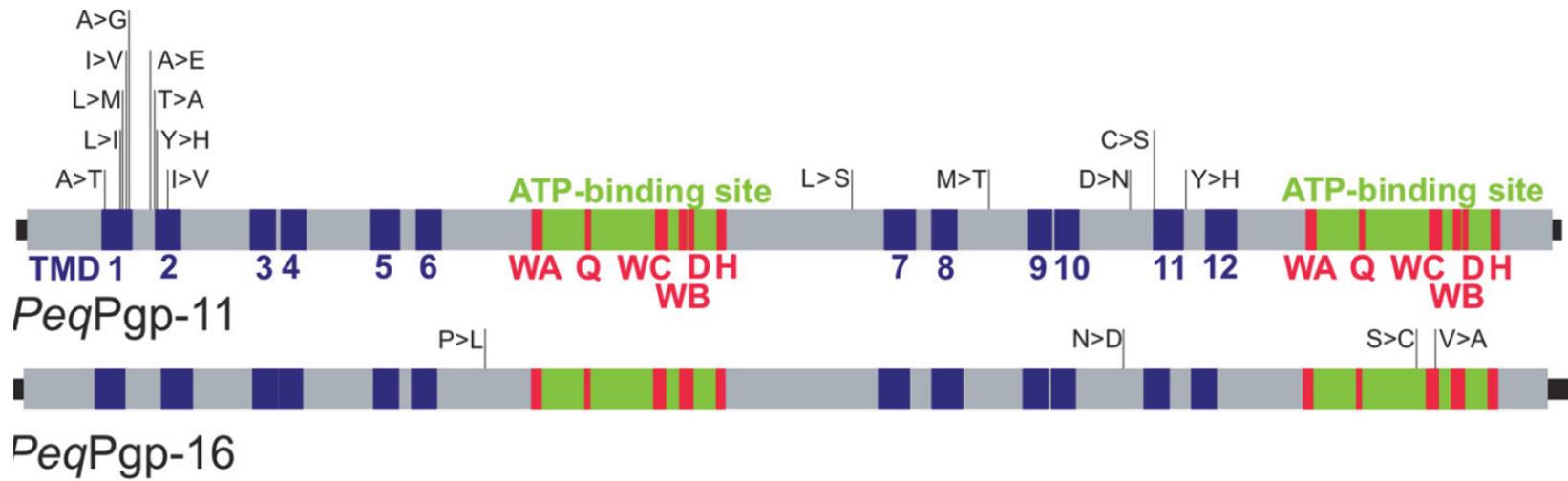


Figure S1

3.1 Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

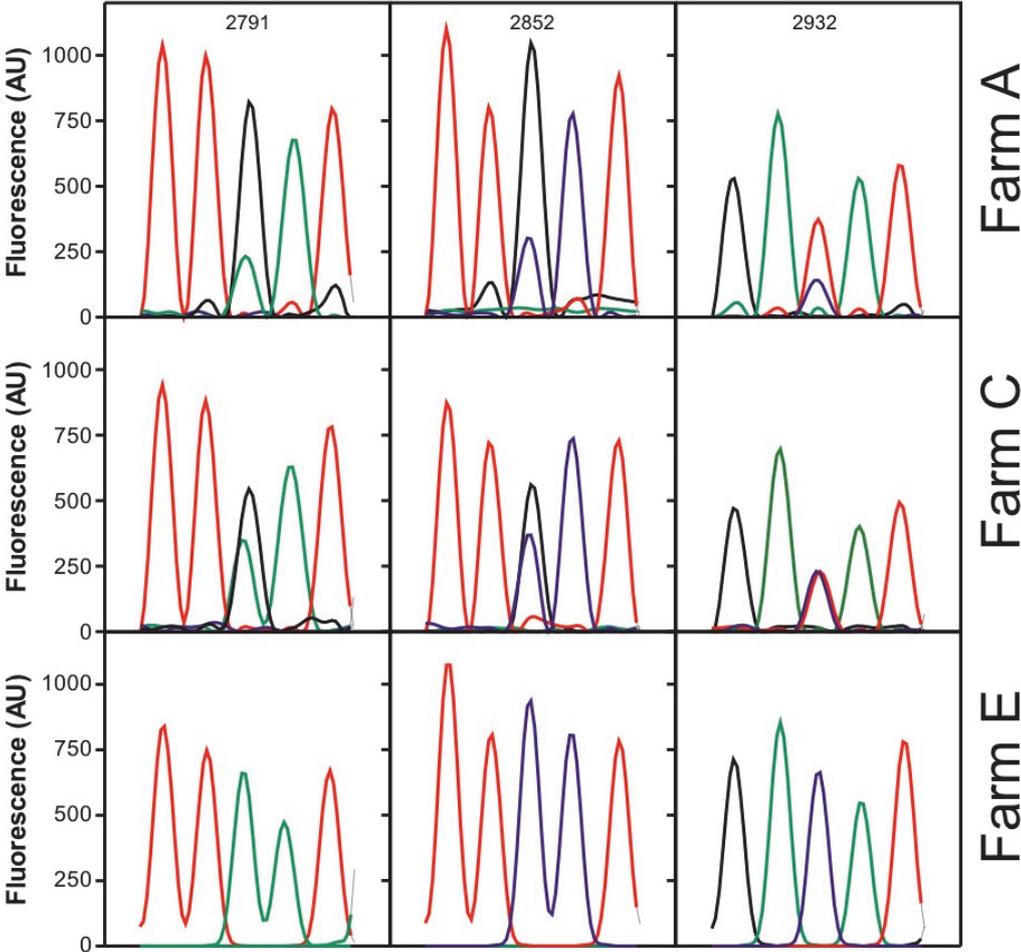


Figure S2

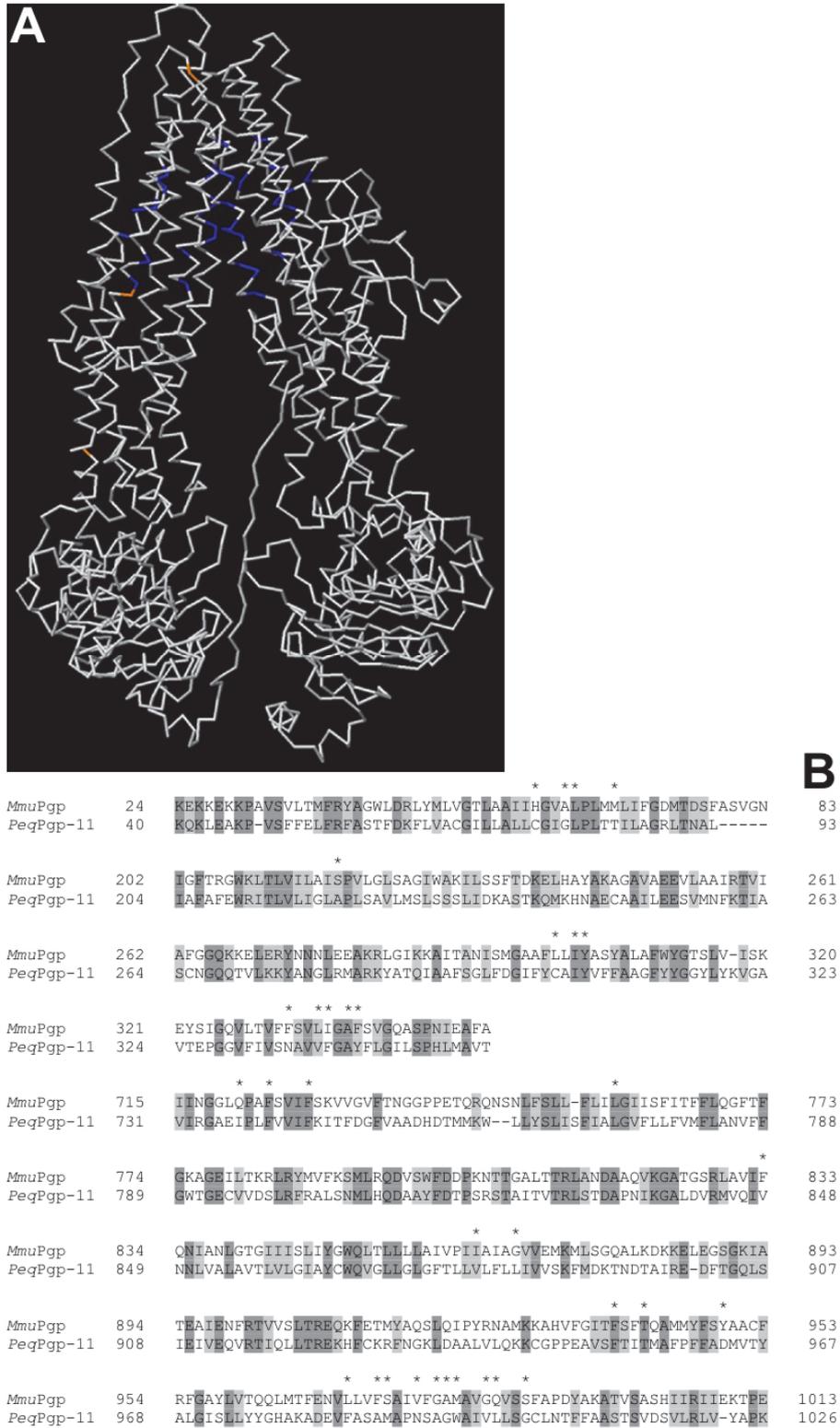


Figure S3

3.1 Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

Table S1. Primer sets used for RACE PCR and amplification of two full length sequences of *P. equorum* Pgps.

Gene	Primer	Sequence 5'- 3'	Annealing temperature (°C)
<i>PeqPgp-11</i>	<i>PeqPgp-11-5RACE-SP1</i>	ttg gta agg cag acg cga cgg atg agg aga t	55 °C
	<i>PeqPgp-11-5RACE-SP2</i>	ttg gag ttg tgc agc agg aac cag aat tgt tca a	59 °C
	<i>PeqPgp-11-5RACE-SP3</i>	tac gag tgc aca gga ggg aca gta tcg atc gac gg	60 °C
	<i>PeqPgp-11-3RACE-SP5</i>	cag cag gaa cca gaa ttg ttc aat ggg acg atc aa	
	<i>PeqPgp-11-3RACE-SP6</i>	gat cat tga gta ctg tca aat ggc caa cgc gca c	55 °C
	<i>PeqPgp-11-full-length-Sense</i> <i>PeqPgp-11-full-length-ASense</i>	ccc aag ttt gag gca atg tc tca gta cca ggc gta gtt cg	
<i>PeqPgp-16</i>	<i>PeqPgp-16-5RACE-SP1</i>	aag ata tga ccg acg agg aaa tgg aac g	55 °C
	<i>PeqPgp-16-5RACE-SP2</i>	aat acc att ggt gtt gtc tct cag gaa cc tgta ct	60 °C
	<i>PeqPgp-16-5RACE-SP3</i>	atg gca ttc caa tca aag aac tga acc tag gat g	
	<i>PeqPgp-16-3RACE-SP5</i>	ccg tct tgg taa aga aga tat gac cga cga gga a	
	<i>PeqPgp-16-3RACE-SP6</i>	gtg ttt gta aaa tgg cga atg cac aca att tca t	55 °C
	<i>PeqPgp-16-full-length-Sense</i> <i>PeqPgp-16-full-length-ASense</i>	cga cac act teg tgc tta aca g tgg att tca taa acg aga aag ata	

3 VERÖFFENTLICHUNGEN

Table S2. Primer sets used for amplification of PCR products compared by SeqDoC analysis.

Gene	Primer	Sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)
Pgp-11	Pgp-11-SeqDoC-1-F Pgp-11-SeqDoC-1-R	ccc aag ttt gag gca atg tc tgg aga taa agt tgg gct ca	596
	Pgp-11-SeqDoC-2-F Pgp-11-SeqDoC-2-R	gaa gtt tac tgc gac agg cgt gaa atc tgg cga tac	693
	Pgp-11-SeqDoC-3-F Pgp-11-SeqDoC-3-R	gtc atc gga aga ggg cat t atg ctg aaa gcg aaa tca cc	573
	Pgp-11-SeqDoC-4-F Pgp-11-SeqDoC-4-R	cgg ata ttg ctg ttg gat ga gta att cgt ggt gcc gag at	565
	Pgp-11-SeqDoC-5-F Pgp-11-SeqDoC-5-R	gcg agg tct gtg gca ttt at ggt act gcg atc agg gaa ga	584
	Pgp-11-SeqDoC-6-F Pgp-11-SeqDoC-6-R	ggt ttc acg ctc ctt gtt ct ctc agg gca tct aag ggt ca	598
	Pgp-11-SeqDoC-7-F Pgp-11-SeqDoC-7-R	cgc ttc tct tat ccg acc ag ttc ttc gat tca aca cgc ag	594
	Pgp-11-SeqDoC-8-F Pgp-11-SeqDoC-8-R	gcg gta cga ttc gtg aaa at tca gta cca ggc gta gtt cg	501
Pgp-16	Pgp-16-SeqDoC-1-F Pgp-16-SeqDoC-1-R	cga cac act tcg tgc tta aca g tca ggc gat tta acg aca aa	560
	Pgp-16-SeqDoC-2A-F Pgp-16-SeqDoC-2A-R	att ttc gca ctc gct ttc at taa agc agg tgc aat tgc tg	390
	Pgp-16-SeqDoC-2B-F Pgp-16-SeqDoC-2B-R	ggg tgg act tat tgg cct tc tat ggg agg tac cgt ggc ta	358
	Pgp-16-SeqDoC-3-F Pgp-16-SeqDoC-3-R	aat ggg tgt tgc att ttg gt gac gag gaa atg gaa cgt gt	581
	Pgp-16-SeqDoC-4-F Pgp-16-SeqDoC-4-R	tgg tgt tgt ctc tca gga acc gcc tat aaa tcg atc gcg aa	586
	Pgp-16-SeqDoC-5-F Pgp-16-SeqDoC-5-R	cat aga tga gtt gcg cga taa ctt aca act cgt ctt gcc acc	555
	Pgp-16-SeqDoC-6-F Pgp-16-SeqDoC-6-R	gac gtc tcg tct tcg ttt ga atc gaa gca ttg aac tgt gc	599
	Pgp-16-SeqDoC-7-F Pgp-16-SeqDoC-7-R	tcg cat gtg ctt atc gtt tc aga ggc tgc caa act tgc ta	590
	Pgp-16-SeqDoC-8-F Pgp-16-SeqDoC-8-R	gct cag gcg gta aat ttg ag tgg att tca taa acg aga aag ata	586

3.1 Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

Table S3. Primer pairs used for real-time PCR of *PeqPgp-11*, *PeqPgp-16* and reference genes *actin*, *gpd-1* and *18SrRNA*.

Gene	Accession number	Primer	Sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)
Pgp-11	JX308230	<i>PeqPgp-11</i> -qPCR-F <i>PeqPgp-11</i> -qPCR-R	gtc atc gga aga ggg cat t gtg aaa tct ggc gat acg gt	137
Pgp-16	JX308231	<i>PeqPgp-16</i> -qPCR-F <i>PeqPgp-16</i> -qPCR-R	gaa aag cga caa cat cac ga gag cat aga gtg gag ccg tc	120
Actin	unpublished data	<i>Peq-act1</i> -qPCR -F <i>Peq-act1</i> -qPCR -R	tcg ttt tta ggg gag gga tg aaa cac cga gca aaa tgg ag	137
gpd-1	unpublished data	<i>Peq-gpd1</i> -qPCR -F <i>Peq-gpd1</i> -qPCR -R	atc ggt tgt cga tct tac gg gac ttt gtt ggt gat tcg ca	152
18SrRNA	U94378	<i>Peq-18SrRNA</i> -qPCR-F <i>Peq-18SrRNA</i> -qPCR-R	atg gcc gtt ctt agt tgg tg tac agc cgc atg aag ttg ag	141

Table S4. Primer set for gender determination. Degenerated primers were generated from corresponding sequences of *Ascaris suum*, *C. elegans* and *C. briggsae*.

Gene	Primer	Sequence 5' - 3'	Annealing Temperature (°C)	Amplicon size (bp)
Vitellogenin-6	Peq-Vit-6-F Peq-Vit-6-R	cgm tay gag aag gtb ctt gcy ttg aag acm c tgc cwc gca aga tcc aac adv ttc tbn tsc	56	228

3.1 Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

Table S5 NCBI accession numbers and Worm Base ID for protein sequences used for maximum likelihood tree.

Name	Organism	GenBank accession no.	WormBase ID
<i>AsuMRP-1</i>	<i>Ascaris suum</i>	ADY40620	
<i>AsuMRP-3a</i>	<i>Ascaris suum</i>	ADY40644	
<i>AsuMRP-3b</i>	<i>Ascaris suum</i>	ADY40573	
<i>BmaMRP-3</i>	<i>Brugia malayi</i>	XP_001896434	
<i>BmaPgp-1</i>	<i>Brugia malayi</i>	XP_001900095	
<i>BmaPgp-2</i>	<i>Brugia malayi</i>	XP_001897744	
<i>CbrPgp-1</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002634978	BP:CBP17817
<i>CbrPgp-2</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002639421	BP:CBP33028
<i>CbrPgp-3</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002643979	BP:CBP26138
<i>CbrPgp-4</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002643978	BP:CBP2677
<i>CbrPgp-7</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002644094	BP:CBP25824
<i>CbrPgp-8</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002644095	BP:CBP34515
<i>CbrPgp-9</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002638613	BP:CBP25885
<i>CbrPgp-10</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_003117716	BP:CBP25360
<i>CbrPgp-11</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002629994	BP:CBP09377
<i>CbrPgp-12</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002645224	BP:CBP35051
<i>CbrPgp-13</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002645222	BP:CBP27772
<i>CbrPgp-14</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002645220	BP:CBP35857
<i>CbrPgp-CBG12969</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002630530	BP:CBP17602
<i>CelPgp-1</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_502413	WP:CE11932
<i>CelPgp-2</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_491707	WP:CE41207
<i>CelPgp-3</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_509901	WP:CE03818
<i>CelPgp-4</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001257143	WP:CE03308
<i>CelPgp-5</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001257116	WP:CE43003
<i>CelPgp-6</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001041287	WP:CE40818

3 VERÖFFENTLICHUNGEN

<i>Ce/Pgp-7</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_509812	WP:CE36668
<i>Ce/Pgp-8</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_509811	WP:CE31624
<i>Ce/Pgp-9</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_507487	WP:CE15714
<i>Ce/Pgp-10</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_509205	WP:CE40807
<i>Ce/Pgp-11</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_495674	WP:CE34788
<i>Ce/Pgp-12</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_510126	WP:CE03260
<i>Ce/Pgp-13</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_510127	WP:CE40253
<i>Ce/Pgp-14</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_510128	WP:CE0262
<i>DmeMDR-50</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAA16186	
<i>DmeMDR-49</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAA28679	
<i>DmeMDR-65</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAA28680	
<i>HcoPgp-2</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	AAC38987	
<i>MmuABCB-1b</i>	<i>Mus musculus</i>	NP_035205	
<i>MmuPgp</i>	<i>Mus musculus</i>	AAA39514	
<i>McaPgp-L</i>	<i>Mytilus californianus</i>	ABS83556	
<i>MgaPgp-L</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAX46411	
<i>OvoPgp-1</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>	AAD49436	
<i>OvoPgp</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>	AAX82635	
<i>OvoPgp-L</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>	AAD49563	
<i>PeqPgp-11</i>	<i>Parascaris equorum</i>	JX308230	
<i>PeqPgp-16</i>	<i>Parascaris equorum</i>	JX308231	
<i>PhuMRP-1</i>	<i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002425149	
<i>PhuMRP-2</i>	<i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002432260	
<i>PhuMRP-3</i>	<i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002426586	
<i>PhuMRP-4</i>	<i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002425021	
<i>PpaPgp-1</i>	<i>Pristionchus pacificus</i>		PP:PP30697
<i>PpaPgp-9</i>	<i>Pristionchus pacificus</i>		PP:PP30465
<i>SmaPgp-1,2,3</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	XP_002574196	

3.1 Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility

Table S6. Position of single-nucleotide-polymorphisms in *PeqPgp-11* detected by SeqDoC analysis.

Position in full-length-sequence of <i>PeqPgp-11</i>	Base-exchange	Amino acid	Chemical distance of amino acid change ^a
196	G → A	Ala → Thr	58
210	G → A	Leu	-
235	C → A	Leu → Ile	5
241	T → A	Leu → Met	15
250	A → G	Ile → Val	29
257	C → G	Ala → Gly	60
311	C → A	Ala → Glu	107
322	A → G	Thr → Ala	58
327	A → G	Gly	-
328	T → C	Tyr → His	83
355	A → G	Ile → Val	29
468	G → A	Gln	-
774	C → T	Asn	-
1069	G → T	Ala	-
1309	G → A	Gly/Ser → Ser	-
1363	G → A	Val	-
1392	A → T	Ser	-
1479	T → C	Asp	-
1527	T → C	His	-
2087	T → C	Leu → Ser	145
2433	T → C	Met → Thr	81
2586	T → C	Ile	-
2645	A → T	Leu/His → Leu	-
2791	G → A	Asp → Asn	23
2852	G → C	Cys → Ser	112
2874	T → C	Phe	-
2905	T → C	Leu/Phe → Leu	-
2932	T → C	Tyr → His	83
3855	A → G	Ser	-

3 VERÖFFENTLICHUNGEN

Table S7. Position of single-nucleotide-polymorphisms in *PeqPgp*-16 detected by SeqDoC analysis.

Position in full-length-sequence of <i>PeqPgp</i> -16	Base	Amino acid	Chemical distance of amino acid change ^a
1166	C → T	Pro → Leu	98
1239	T → C	Asp	-
2280	A → C	Ala	-
2782	A → G	Asn → Asp	23
2904	T → C	Arg	-
3524	G → C	Ser → Cys	112
3572	T → C	Val → Ala	64

^aGrantham R (1974) Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185: 862-864.

3.2 *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains

3.2 *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains

I.J.I. JANSSEN, J. KRÜCKEN, J. DEMELER, G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA

***Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains**

I. Jana I. Janssen, Jürgen Krücken, Janina Demeler, Georg von Samson-Himmelstjerna*
Institute for Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Germany

Corresponding Author: Tel.: +49 3083862311; fax: +49 3083862323
E-mail address: gvsamson@fu-berlin.de

3.2 *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains

Abstract

P-glycoproteins (Pgps) are members of the ABC transporter superfamily and are involved in detoxification mechanisms of single- and multicellular organisms. Their importance for survival of organisms in the presence of harmful drug concentrations has been widely studied in cancer cells but Pgp-dependent drug resistance of parasites has also been demonstrated. Ivermectin (IVM), a widely used anthelmintic in human and veterinary medicine, is a known substrate at least of mammalian Pgps and resistance against IVM is proposed to be associated with Pgps. The consequences of loss of Pgp function for the development of the model nematode *Caenorhabditis elegans* were analysed in the presence of IVM. Either strains missing only a single Pgp were used or Pgp activity generally was inhibited using verapamil (VPL). Loss-of-function of individual Pgp resulted in a statistically significant increase in IVM susceptibility in terms of impaired development with decreases in EC_{50} values between 1.5- and 4.3-fold. Absence of seven Pgps resulted in a higher impact on IVM susceptibility of *C. elegans* since it resulted in EC_{50} values decreased by 2.4- to 4.3-fold. This increase in IVM susceptibility was even more pronounced than that observed when Pgp function was blocked in general by VPL (approximately 2.5-fold). This study demonstrates clearly that Pgps are of importance for IVM detoxification in the model organism *C. elegans* and that some Pgps obviously have a higher impact than others.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, P-glycoprotein, Anthelmintic resistance, Ivermectin, Verapamil, Development assay

1. Introduction

Ivermectin (IVM) belongs to the macrocyclic lactones (ML) and is one of the most often used anti-parasitics in veterinary and human medicine. It shows efficacy against a large number of parasites and is not only used for treatment of nematode infections of the gastrointestinal tract, the lungs and of filarial infections, but is also administered to treat infestations with arthropods. IVM binds irreversibly to the ionotropic γ -aminobutyric acid-(GABA) receptor of vertebrates and avertebrates [1] and/or the glutamate-gated chloride channels (GluCl) of avertebrates [2,3]. In nematodes, the latter are more important targets than the GABA-gated chloride channels. Binding of IVM to the channel causes an irreversible opening which is followed by influx of chloride ions resulting in a flaccid paralysis due to the hyperpolarisation of the neuronal or muscular membranes [4]. In addition to paralysis of somatic muscles there are also strong effects on the pharynx muscles, thus, MLs affect both, motility and feeding. In the model nematode *Caenorhabditis elegans* several physiological functions are strongly inhibited by MLs including larval development [5] which is considered to occur as a consequence of starvation due to paralysis of the pharynx [6].

Similar to the previously observed development of resistance against benzimidazoles, several populations of gastrointestinal nematodes [7] but presumably also of certain filaria [8] have developed evasion mechanisms to MLs. Those allow the tolerance of IVM concentrations in resistant populations which are lethal for non-selected populations. Among others, transport activity of P-glycoproteins (Pgps) is discussed as a reason for resistance development (for review see [9]). By transferring xenobiotics from the cytoplasm across apical cell-membranes into the extracellular compartment, these well-conserved proteins are an important detoxification factor for most organisms. High Pgp activities are often found at epithelia acting as protective barriers (e.g. blood brain barrier, nematode intestinal epithelium) or having excretion function (e.g. hepatocyte epithelia, nematode excretory H-cells). In general, substrates are large and hydrophobic and are often secondary metabolites of bacteria, fungi or plants. Lack of Pgp function can result in intolerance against their substrates resulting e.g. in high IVM susceptibility in some dog breeds such as Collies [10] and in *mdr1a* deficient mice [11]. Moreover, chronic exposure to gradually increasing IVM concentrations can select for genetically stable *C. elegans* strains with significantly increased resistance to IVM even without mutagenesis [12]. Among other ABC transporters, *pgp-1* and *pgp-2* were significantly upregulated in *C. elegans* selected for increased IVM resistance. Drug resistance was inherited to the next worm generations even in the absence of drug pressure. Interestingly, high expression levels of *pgp-1* and *pgp-2* mRNAs partially declined after IVM withdrawal for 10 weeks but were restored again after re-exposure to IVM for two weeks.

The nematode *C. elegans* provides the opportunity to conduct different assays focusing on the viability, behaviour, survival, reproduction and development influenced by anthelmintics [13-16] and is therefore often used for screening of new drugs. Specific features which make this organism a highly feasible model compared to many other nematodes are its simple maintenance, its lack of pathogenicity and the fact that its life cycle is completed within 3 $\frac{1}{2}$ days [17]. Furthermore, the availability of a large number of genetically modified strains facilitates functional experiments using this nematode. For *C. elegans*, 15 Pgp encoding genes have been annotated in the genome sequence [18]; however, the sequence for Pgp-15 does not show a continuous open reading frame. This large number compared to mammalian organisms such as humans and mice, which have only two (*MDR1* and *MDR3*) and three Pgp genes (*mdr1a*, *mdr1b* and *mdr2*), respectively, may be due to the fact that nematodes such as *C. elegans* live in the soil where they are in permanent contact to several naturally occurring toxins. In contrast to vertebrates and insects they do not have any elaborate detoxifying

3.2 *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains

organs, but the large number of genes involved in these pathways (e.g. Pgps, cytochrome P450 enzymes) indicates the presence of a complex molecular detoxification systems. Despite intensive research using the *C. elegans* model in many different areas, information about the function of the individual Pgps is sparse, especially with regard to their contribution to drug susceptibility. This article describes the impact of the loss of single Pgps transporters and the consequences of the inhibition of all Pgps using verapamil (VPL) in *C. elegans* on larval development under different IVM concentrations.

2. Material and Methods

2.1 *C. elegans* strains

C. elegans wild-type Bristol N2 strain and Pgp deletion strains *NL132 pgp-1(pk17)IV*, *GH378 pgp-2(kx48)I*, *NL131 pgp-3(pk18)X*, *VC2159 pgp-4(gk1006)X*, *RB959 pgp-5(ok856)X*, *RB1047* deletion in *pgp-7* and *pgp-6(ok994)X*, *RB1916 pgp-8(ok2489)X*, *RB1045 pgp-10(ok991)X*, *VC26 pgp-12(gk19)X*, *RB894 pgp-13(ok747)X*, *RB2008 pgp-14(ok2660)X* and *RB1041 pgp-15(ok987)X* were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) at the University of Minnesota (St. Paul, USA). Mutant strains for *pgp-9* (tm0830) and *pgp-11*(tm0333) were provided by the National BioResource Project (Tokyo, Japan). The strains NL131, NL132 and GH378 had been out-crossed five times against N2 wild-type worms before use.

2.2. Development inhibition assay

Strains were raised at 20 °C in liquid medium as described previously [19] with the exception of adding 10.000 I.U. nystatin (Carl-Roth) per 100 ml medium. Worms were collected and briefly exposed to 12% sodium hypochlorite bleach, rapidly diluted and washed with M9 buffer to obtain eggs. After incubation at 20 °C over night, synchronised first stage larvae (L1) were obtained. The development inhibition assay was essentially conducted as described previously [20,21]. Approximately 100 synchronised L1 were added in 20 µl M9 buffer in every well of a 48-well microtiter plate already containing 158 µl S-Medium, 20 µl concentrated *Escherichia coli* (OP50) and 2 µl IVM (Sigma-Aldrich) dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). IVM was added in serial dilutions to obtain final concentrations ranging from 0.1 nM to 100 nM IVM and 1% DMSO. Controls contained 1% DMSO. At this concentration, no harmful effects of the vehicle on *C. elegans* were observed. In order to inhibit all Pgps simultaneously, (±)verapamil hydrochloride (Sigma-Aldrich, 99%) (VPL) was added to obtain final concentrations of 50 µM and 100 µM. Worms were left in the dark at 20 °C under constant shaking at 150 rpm. After a time period of 52-55 h in which L1 of the negative control were developed to L4 or adult worms, further development was stopped with Lugol's iodine and worms were differentiated according to their development stage. L1, L2 and L3 were scored as inhibited in their development and the L4 and adult worms were classified as developed. Development was calculated in percentage as number of L4 plus adults divided by number of all stages. Every concentration was set-up in triplicates and all experiments were repeated for at least two independent times. EC₅₀ values of the collected data were determined by four parameter logistic regression using GraphPad Prism 5.0.3 and compared using the extra sum of squares F test. All *p* values were corrected for multiple testing using the Bonferroni procedure. Differences with *p* values < 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Inhibition of Pgp transport activity by verapamil

Inhibition of all *C. elegans* Pgps at once was attempted by the use of VPL in two concentrations (50 and 100 μM , both without any effect on worms when used alone) in combination with IVM concentrations ranging from 10^{-10} M to 10^{-7} M. Development of synchronised L1 to L4 or adult worms was quantified after 52-55 h. Dose response curves were obtained by logistic regression (Fig. 1). Both VPL concentrations showed similar effects on the IVM susceptibility of the *C. elegans* strain N2 as the EC_{50} value was decreased by a factor of 2.5 and 2.6, respectively ($p < 0.0002$) (Table 1).

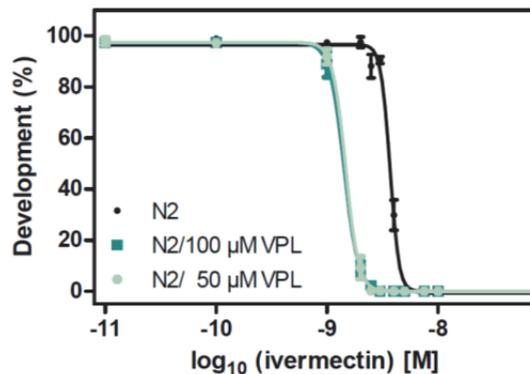


Fig. 1. Effects of verapamil on IVM susceptibility. First stage larvae (L1) of N2 wild-type *Caenorhabditis elegans* were incubated with different concentrations of IVM in the presence of 0 μM , 50 μM and 100 μM VPL. Percentages of development were calculated as fraction of L4 plus adult worms relative to all developmental stages.

Table 1

Effects of Pgp inhibition with verapamil (VPL) and loss of function of individual Pgps on susceptibility of *C. elegans* development to ivermectin.

Strain	Genotype	EC_{50} (95% CI ^a) [nM]	R^2 ^b	p value ^c	Fold change in EC_{50} vs. N2 ^d
N2	Wild-type	3.69 (3.58-3.81)	0.9858		
Inhibition of Pgp function using verapamil					
N2 (50 μM VPL)	Wild-type	1.47 (1.39-1.55)	0.9918	<0.0002	2.516
N2 (100 μM VPL)	Wild-type	1.42 (1.34-1.50)	0.9842	<0.0002	2.606
<i>pgp-1</i> -like group ^e					
NL132	<i>pgp-1</i>	1.22 (1.07-1.39)	0.9822	<0.0014	3.025
tm0830	<i>pgp-9</i>	1.30 (1.24-1.37)	0.9899	<0.0014	2.834
<i>pgp-2</i> -like group					
GH378	<i>pgp-2</i>	2.09 (2.06-2.12)	0.9907	<0.0014	1.765
<i>pgp-3</i> -like group					
NL131	<i>pgp-3</i>	1.54 (1.46-1.61)	0.9947	<0.0014	2.406
VC2159	<i>pgp-4</i>	2.25 (2.14-2.36)	0.9723	<0.0014	1.644
<i>pgp-5</i> -like group					
RB959	<i>pgp-5</i>	2.07 (2.04-2.10)	0.9787	<0.0014	1.787
RB1047	<i>pgp-6/7</i>	2.10 (2.05-2.16)	0.9572	<0.0014	1.756
RB1916	<i>pgp-8</i>	1.14 (0.86-1.51)	0.9477	<0.0014	3.237

3.2 *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual *P*-glycoprotein loss-of-function strains

<i>pgp-10</i> -like group					
<i>RB1045</i>	<i>pgp-10</i>	2.08 (2.03-2.13)	0.9716	<0.0014	1.776
<i>pgp-11</i> -like group					
<i>tm0333</i>	<i>pgp-11</i>	0.96 (0.87-1.06)	0.9319	<0.0014	3.835
<i>pgp-12</i> -like group					
<i>VC26</i>	<i>pgp-12</i>	1.26 (1.03-1.54)	0.9728	<0.0014	2.94
<i>RB2008</i>	<i>pgp-14</i>	0.86 (0.39-1.19)	0.9230	<0.0014	4.294
<i>RB894</i>	<i>pgp-13</i>	2.46 (2.36-2.56)	0.9266	<0.0014	1.504
<i>RB1041</i>	<i>pgp-15*</i>	3.28 (3.13-3.45)	0.9718	<0.0014	1.125

^a 95% confidence interval

^b Coefficient of determination

^c For significant differences in EC₅₀ value vs. EC₅₀ of N2 wild-type strain.

^d Ratio of EC₅₀ value of strain of interest divided by EC₅₀ of N2 strain.

^e Groups were defined according to the phylogenetic analysis of Prichard and Roulet [22].

^f *C. elegans pgp-15* is a pseudogene.

3.2. Characterisation of *C. elegans* strains lacking individual *Pgp* genes

In order to identify those *C. elegans* *Pgps* that are most efficiently able to decrease susceptibility to IVM, several strains, each lacking a single *Pgp* or in one case lacking two *Pgps* (*i.e.* *pgp-6* and *pgp-7*), were exposed to different concentrations of this drug or no drug in case of the control. In controls, development rates of the mutant strains did not differ significantly from the wild-type N2 strain (mean of 96.8%, SD = 2.2%) with the exception of the mutant strains of *pgp-8*, *pgp-14* and *pgp-11* ($p < 0.05$).

Each of the strains showed highly significant differences ($p < 0.0014$) in IVM susceptibility compared to the wild-type N2 strain (Table 1) as revealed by lower EC₅₀ values. Whereas loss of the *pgp-15* pseudogene resulted only in a minimal increase of susceptibility to IVM (EC₅₀ values 1.1-fold lower than N2) (Fig. 2), single and combined loss of other *Pgp* genes had stronger effects. *Pgps* were grouped phylogenetically according to an analysis by Prichard and Roulet [22] in order to identify if loss of any potentially important subgroups might correlate with IVM susceptibility (Fig. 2 and Table 1). Effects on EC₅₀ values were categorised as small (1.5-1.8-fold decrease in EC₅₀ value) and moderate (2.4-4.3-fold decrease). No differences were found by comparison of *pgp* loss-of-function strains within those two categories as indicated by overlapping confidence intervals (Fig. 3). In contrast, significant differences were available between those two categories (data not shown). Loss-of-function of *pgp-2* and *pgp-10* had small effects on IVM susceptibility. Within the group of *pgp-5*-like *Pgps* only loss of *pgp-8* resulted in a moderately decreased EC₅₀ value while mutations in the other three *Pgps* in this group had only small effects. A moderate increase in susceptibility was found for the *pgp-3* mutant, whereas loss of *pgp-4* which also belongs in this group had a small impact. The *pgp-12*-like group with three functional members contains one with small effects of mutations (*pgp-13*) and two with moderate effects (*pgp-12* and *pgp-14*) on IVM susceptibility. Finally, the *pgp-1*- and *pgp-11*-like groups contained only members with moderate effects on IVM susceptibility.

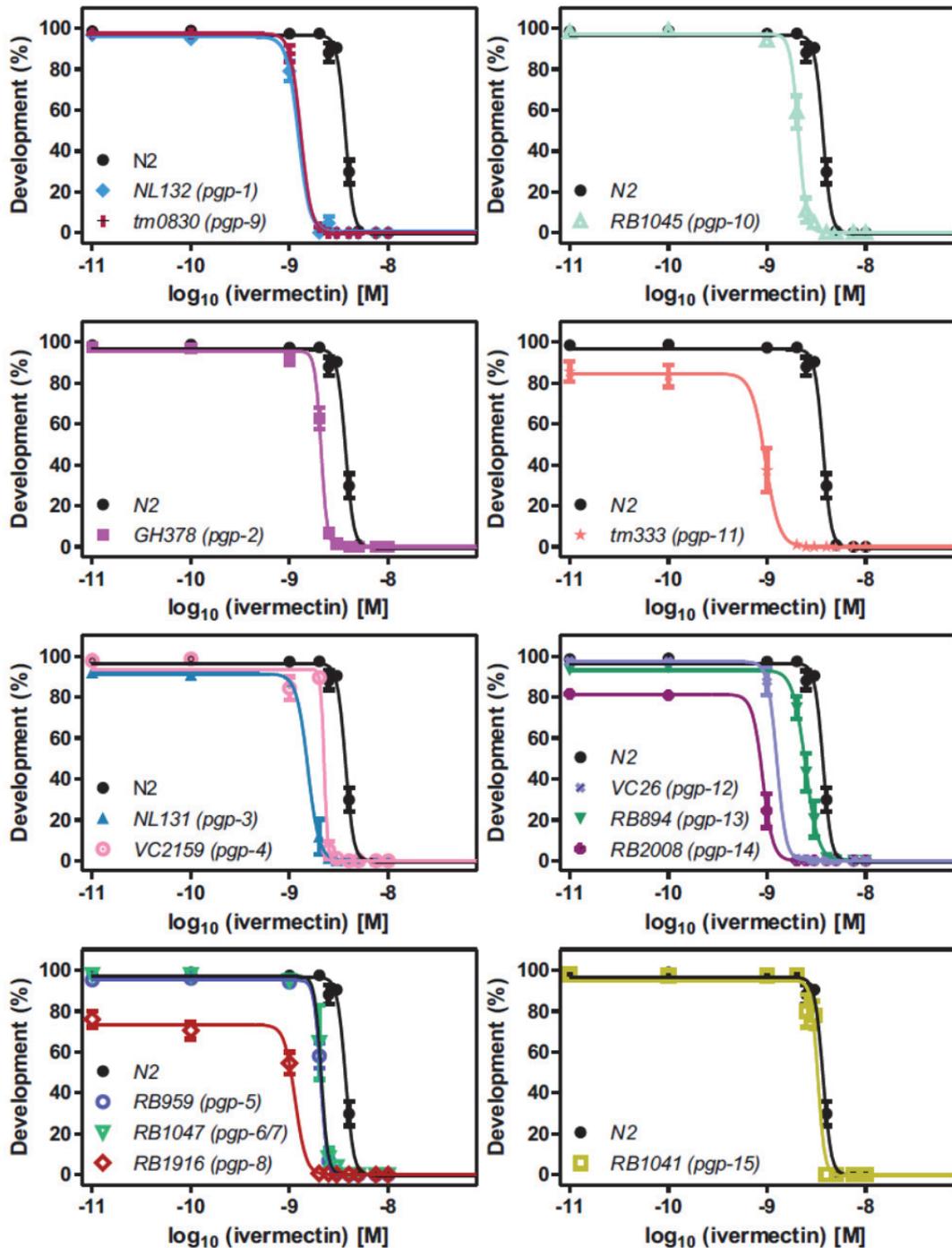


Fig. 2. Dose response curves to IVM of Pgp-deficient *Caenorhabditis elegans* strains in comparison to the N2 wild-type. Strain designation and affected Pgp genes are shown in the legend within the graphs. Effects of loss-of-function mutations in closely related Pgp genes are shown in the same diagram. Percentages of development were calculated as fraction of L4 plus adult worms relative to all developmental stages.

3.2 *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains

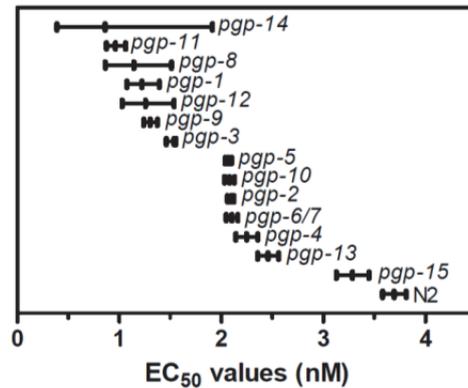


Fig. 3. Distribution of EC₅₀ values for development of different *Caenorhabditis elegans* strains in the presence of IVM. Strains were divided into two groups with different IVM-susceptibility (small and moderate).

4. Discussion

Several previous studies dealt with the involvement of ABC-transporters and particularly Pgps in the development of ML-resistance of nematodes and arthropods as this is an important concern not only in animal [23,24] but also in human healthcare [25,26]. For IVM, introduced in 1981 [1,27] and initially a highly potent drug, reports of reduced or even lost treatment efficacy become more frequent [28,29] and there is evidence that selection for IVM resistance can occur within only few generations [12,30,31]. James and Davey [12] suggest the involvement of Pgps, half transporters and MRPs in development of IVM resistance in *C. elegans*. However, the significance of individual Pgps in the process of ML-resistance development in *C. elegans* as well as parasitic nematodes is not understood yet.

The development assay described here offers the advantage of high discriminatory power allowing to detect also relatively small differences in drug susceptibility for the various Pgp loss-of-function strains examined. The R² obtained were excellent (all > 0.92). Due to the fact that for every IVM concentration at least 9 wells with approximately 100 stages per well were included, the statistical power of this type of assay is much better than that of many assays measuring individual worm movements (e.g. velocity, body bends, trashing) or feeding/pumping rates which can usually only be done for a few worms per concentration. Another advantage of the assay is that it does not rely on any bacto agar since the distribution of highly hydrophobic compounds such as IVM in not completely defined, agar-based, semi-solid media might be heterogeneous. The fact that substances have to be dissolved in agar at a temperature of at least 65 °C might particularly influence the chemical integrity of the substance tested. Thus, quantitative analysis of the development of *C. elegans* in a liquid assay is a suitable tool to study the effects of MLs on nematodes as completion of the life cycle is dependent on food intake, a feature which is strongly affected by IVM. Additionally, this assay provides the opportunity to observe IVM induced effects over a longer period, as almost the whole development of *C. elegans* (L1 to adult) has to be completed. This prevents misinterpretation of results due to transient effects of drugs.

The effect of VPL on IVM susceptibility during development of *C. elegans* was surprisingly low. The approximately 2.5-fold decrease in EC₅₀ is much lower than the 19 to 77-fold decrease in the EC₉₉ reported for different *Haemonchus contortus* isolates in a larval feeding inhibition assay [32] or the 245-fold effects in a larval development assay reported for *Cooperia oncophora* isolates [33]. The reason for the low efficacy of VPL in the *C. elegans* development assay remains to be identified. Since several of the individual Pgp loss-of-

function mutations showed stronger effects on IVM susceptibility than the potential Pgp-inhibitor VPL, it is nevertheless likely that Pgps are involved in modulation of IVM susceptibility as measured in nematode development. It can furthermore be concluded that VPL racemate used here is not a useful inhibitor for Pgps in *C. elegans*, at least in the described development assay. Although the use of the pure R(+) isomer might decrease potential side effects from action as Ca²⁺ channel blocker, the effects of the racemate were so small that the comparatively expensive pure enantiomer was not tested in addition.

The actual impact of individual Pgps is still unclear, partly due to the large number of paralogs present in nematode genomes. Only two studies, both in *C. elegans*, have been conducted that compared the ability of different Pgps to modulate ML susceptibility [34,35], but none involved all Pgp family members in their behaviour assays. Results of experiments regarding IVM susceptibility in *C. elegans* involving the analysis of Pgp-deficient strains or RNAi experiments as well as information regarding tissue-specific expression are summarised in Supplementary Table A1. The aim of the present study was to systematically analyse the effect of loss of all individual Pgps encoded in the *C. elegans* genome.

All of the analysed strains with loss-of-function alleles of Pgp genes showed increased susceptibility to IVM in terms of a significantly decreased EC₅₀ value. Surprisingly, this was also the case for the *pgp-15* knock-out strain although this gene is not functional in the wild-type N2 strain as the open reading frame is interrupted due to deletion of two basepairs. Two explanations for the very small increase in susceptibility (1.1-fold decreased EC₅₀) measured in the *pgp-15(ok987)* strain are possible. First, the strain might harbour another, unknown, mutation elsewhere in its genome which slightly increases IVM susceptibility and secondly, the ~2.2 kb deletion in the *pgp-15(ok987)* gene might have some effects on the expression of the *pgp-12/13/14* genes which are located adjacent to the *pgp-15* gene on the *C. elegans* X chromosome.

Herein, a moderate increase of IVM susceptibility was observed after loss-of-function of seven Pgps in *C. elegans*: *pgp-14*, *pgp-11*, *pgp-8*, *pgp-1*, *pgp-12*, *pgp-9* and *pgp-3*. With the exception of the *pgp-1*-like group there was no correlation between phylogeny and impact on IVM susceptibility. Absence of the phylogenetically closely related genes *pgp-1* and *pgp-9* showed similar effects on the development rate under IVM exposure. Investigations regarding their expression in IVM resistant strains revealed for both genes an increase after IVM contact [34]. In parasitic nematodes *pgp-1* has been reported to be expressed at significantly decreased levels in a resistant *H. contortus* population compared to a susceptible one, whereas *pgp-9* has been reported to be constitutively overexpressed or inducible by MLs in several independent studies in *H. contortus* and *Teladorsagia circumcincta* [22,24,36].

For the IVM detoxification in *C. elegans*, the function of Pgp-11 and Pgp-14 appears to be of particular importance. Our results for Pgp-14 confirm recent investigations for this transporter, which also suggest its participation in IVM resistance. After IVM exposure it was found that *pgp-14* mRNA is significantly over-expressed in *C. elegans* strains either selected for IVM resistance or showing reduced susceptibility to IVM due to point mutations in the three GluCl α -subunits *avr-14*, *avr-15* and *glc-1* [34,35]. For the latter strain increased expression of *pgp-11* mRNA was also observed. In contrast, no evidence for increased *pgp-14* expression was observed by Williamson *et al.* [36]. For *pgp-11* mRNA, however, increased expression was found in IVM resistant *H. contortus* after IVM treatment *in vivo* [22]. In *C. oncophora*, 3-5-fold increased *pgp-11* expression was recently described after both treatment of adult worms with MOX or IVM *in vivo* and exposure of L3 to IVM *in vitro* [37]. It is also likely that Pgp-12 contributes in IVM detoxification, as the mutant strain did show both, an increased IVM susceptibility in our assays and a decreased velocity in *pgp-12* deficient worms as well as an increased expression in wild-type *C. elegans* after IVM exposure [34,35].

3.2 *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual *P*-glycoprotein loss-of-function strains

One study showed more than 4-fold increased expression of *pgp-12* mRNA in IVM resistant *H. contortus* but this difference was not significant due to high variability between replicates [36]. No results from other studies, neither regarding *C. elegans* nor parasitic nematodes, are available for *pgp-8* except for the fact that expression levels did not change after short term IVM exposure in *C. elegans*. Additionally, *H. contortus* *pgp-2*, *pgpC* and *pgpD* have been described to be either constitutively overexpressed and overexpressed and further inducible by ML treatment *in vivo* [22]. *H. contortus* *pgpC* is the orthologue of *pgp-3* and *-4* in *C. elegans* and was therefore termed *pgp-3* in recent references [38]. The *H. contortus* *pgpD* cDNA and its *C. oncophora* ortholog have recently been named *pgp-4* and *pgp-16*, respectively. Indeed, Blast analysis identified *pgp-4* as the closest relative in the *C. elegans* genome [39]. However, phylogenetic analysis revealed that it is not an ortholog of *pgp-4* but of the *Caenorhabditis briggsae* CBG12969 cDNA which has no orthologue encoded in the *C. elegans* genome [22,38]. Any potential involvement in IVM susceptibility of *pgp-16* can only be investigated in *C. elegans* after generation of transgenic worms.

Due to the fact that the Pgp paralogs are expressed in different *C. elegans* tissues it can be expected that loss of different individual Pgps will not affect the various physiological functions (motility, pharyngeal pumping, egg laying or development) in the same way. Comparison of results between different studies is often difficult, as different assays support different conclusions. There are obviously three major reasons that can probably explain these heterogeneous results: (i) different effects of RNAi and loss-of-function mutations, (ii) different assay systems targeting different functional systems such as pharyngeal pumping, velocity of movement, egg production and development rate and (iii) different time-points after IVM exposure. While Yan et al. [35] used RNAi, both Ardelli and Prichard [34] and the present study used strains with loss-of-function mutations. Moreover, both previous studies analysed exclusively early responses to IVM and did not use development as a parameter of a late, irreversible response. Kinetics of nematode responses to MLs are highly variable within the first 24 h of incubation, ranging from hyperactivity over reversible to irreversible paralysis, depending on both time-point and the drug used [5,40-42]. Therefore, comparisons of assay results using different time-points are difficult. Interestingly, dose response curves obtained in the present study were extremely steep with Hill slopes between -26.54 and -6.16 (data not shown) for most strains. There was basically a critical IVM concentration which determined whether most worms reached the adult-stage or not. This is in marked contrast to results obtained in the larval developmental assay using parasitic trichostrongylid nematodes [32,33,43] which usually show much lower Hill slopes. Since SD values for individual concentrations were also rather low and R^2 values are close to 1, the simplest explanation is that *C. elegans* strains are basically clones [44] whereas genetic diversity in trichostrongylid populations is considered to be tremendous [45,46]. It is therefore not unexpected that individual *C. elegans* from the same strain respond very similarly.

Although IVM is known to influence the pharyngeal pumping rate [5] and to induce gene expression patterns correlating with starvation [47], exposure to IVM did not result in development of dauer larvae at the end of the incubation period. This pathway is activated under poor environmental conditions such as starvation and overcrowding. Similar observations after the administration of aldicarb [48] allowed to conclude that dauer larvae are formed primarily when starvation is induced slowly.

The fact that most of the *C. elegans* strains used here were not out-crossed against the N2 wild-type strain has to be taken into account when interpreting the data. During chemical mutagenesis, multiple genes can be slightly changed or even destroyed in the same genome. Of course the mutations in genes other than the target Pgp site might also contribute to changes in IVM susceptibility. Therefore, some uncertainty regarding the validity of data for

individual Pgps remains. Random mutations in the background would be expected to lead to both, increased or decreased susceptibility to IVM. Since only strains with increased susceptibility were found, random effects are overall probably rather small. Considering the overall data set and the aim to identify candidate Pgp genes for further analysing their involvement in ML detoxification, there is still an important gain of information: First, Pgps for which only small effects were observed in the present study should not be prioritised in future functional studies since the simultaneous presence of two balancing mutations that result in only small changes is quite unlikely. Secondly, Pgp inhibition through VPL and loss-of-functions in Pgp genes in *C. elegans* result in significantly smaller changes in EC₅₀ values than expected from previous studies using VPL in parasitic nematodes. Thirdly, many of the Pgps identified in the present study were already previously implicated in ML resistance in parasitic trichostrongylids. These are candidate genes that should be prioritised in the near future. A few transporters (e.g. Pgp-2) are remaining where results are contradictory and which should therefore be kept in mind. Finally, overall data suggest that overexpression of Pgps and/or changes in their primary structure might have stronger effects than loss of function of individual Pgps.

In conclusion, this is the first study comparing the complete Pgp repertoire of a nematode regarding their potential involvement in IVM susceptibility. Although the results are of course not completely transferable to any parasitic nematode, they at least help to identify candidate Pgp family members that should be prioritised for further analysis in parasitic nematodes for which analysis of the complete repertoire is not easily achievable. Moreover, the results strongly indicate that IVM susceptibility can be modulated by most nematode Pgps although there are significant differences between paralogs that cannot be predicted by their phylogenetic relationship.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (SA973/3-1) and internal funding from the Freie Universität Berlin. Some strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). The authors would also like to thank Shohei Mitani (National Bioresource Project) for kindly providing *C. elegans* strains *tm0830* and *tm0333*.

Appendix A. Supplementary material

Table S1. Comparison of IVM induced effects on the behaviour and the mRNA level of *C. elegans*.

3.2 *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains

References

1. Campbell WC (1985) Ivermectin: an update. *Parasitol Today* 1: 10-16.
2. Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK, Paress PS, Van der Ploeg LH, et al. (1994) Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371: 707-711.
3. Arena JP, Liu KK, Paress PS, Schaeffer JM, Cully DF (1992) Expression of a glutamate-activated chloride current in *Xenopus* oocytes injected with *Caenorhabditis elegans* RNA: evidence for modulation by avermectin. *Brain Res Mol Brain Res* 15: 339-348.
4. Dent JA, Davis MW, Avery L (1997) *avr-15* encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 16: 5867-5879.
5. Ardelli BF, Stitt LE, Tompkins JB, Prichard RK (2009) A comparison of the effects of ivermectin and moxidectin on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Vet Parasitol* 165: 96-108.
6. Gill JH, Redwin JM, van Wyk JA, Lacey E (1995) Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*--effects of ivermectin resistance. *Int J Parasitol* 25: 463-470.
7. Kaplan RM (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20: 477-481.
8. Prichard RK (2005) Is anthelmintic resistance a concern for heartworm control? What can we learn from the human filariasis control programs? *Vet Parasitol* 133: 243-253.
9. Lespine A, Ménez C, Bourguinat C, Prichard RK (2012) P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *Int J Parasitol: Drug Drug Resist* 2: 58-75.
10. Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11: 727-733.
11. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, et al. (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77: 491-502.
12. James CE, Davey MW (2009) Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol* 39: 213-220.
13. James CE, Davey MW (2007) A rapid colorimetric assay for the quantitation of the viability of free-living larvae of nematodes in vitro. *Parasitol Res* 101: 975-980.
14. Simpkin KG, Coles GC (1981) The Use of *Caenorhabditis elegans* for Anthelmintic Screening. *J Chem Tech Biotechnol* 31: 66-69.
15. Link EM, Hardiman G, Sluder AE, Johnson CD, Liu LX (2000) Therapeutic target discovery using *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacogenomics* 1: 203-217.
16. Jorgensen EM, Mango SE (2002) The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Genet* 3: 356-369.
17. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94.
18. Sheps JA, Ralph S, Zhao Z, Baillie DL, Ling V (2004) The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol* 5: R15.
19. Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*: 1-11.

20. Menez C, Mselli-Lakhal L, Foucaud-Vignault M, Balaguer P, Alvinerie M, et al. (2012) Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line. *Biochem Pharmacol* 83: 269-278.
21. Hu Y, Xiao SH, Aroian RV (2009) The new anthelmintic tribendimidine is an L-type (levamisole and pyrantel) nicotinic acetylcholine receptor agonist. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e499.
22. Prichard RK, Roulet A (2007) ABC transporters and beta-tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology* 134: 1123-1132.
23. Xu M, Molento M, Blackhall W, Ribeiro P, Beech R, et al. (1998) Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol Biochem Parasitol* 91: 327-335.
24. Dicker AJ, Nisbet AJ, Skuce PJ (2011) Gene expression changes in a P-glycoprotein (Tci-pgp-9) putatively associated with ivermectin resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol* 41: 935-942.
25. Ardelli BF, Guerriero SB, Prichard RK (2005) Genomic organization and effects of ivermectin selection on *Onchocerca volvulus* P-glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol* 143: 58-66.
26. Tompkins JB, Stitt LE, Morrisette AM, Ardelli BF (2011) The role of *Brugia malayi* ATP-binding cassette (ABC) transporters in potentiating drug sensitivity. *Parasitol Res* 109: 1311-1322.
27. Geary TG (2005) Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends Parasitol* 21: 530-532.
28. Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC (2004) Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol* 20: 469-476.
29. Shoop WL (1993) Ivermectin resistance. *Parasitol Today* 9: 154-159.
30. Coles GC, Rhodes AC, Wolstenholme AJ (2005) Rapid selection for ivermectin resistance in *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 129: 345-347.
31. van Wyk JA, Malan FS (1988) Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, radoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Vet Rec* 123: 226-228.
32. Bartley DJ, McAllister H, Bartley Y, Dupuy J, Menez C, et al. (2009) P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 136: 1081-1088.
33. Al Gusbi S (2011) Analysis of putative inhibitors of anthelmintic resistance mechanisms in cattle gastrointestinal nematodes [PhD-Thesis]. Berlin: Freie Universität Berlin. 154 p.
34. Ardelli BF, Prichard RK (2012) Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Vet Parasitol* S0304-4017.
35. Yan R, Urdaneta-Marquez L, Keller K, James CE, Davey MW, et al. (2012) The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Vet Parasitol* 190: 519-529.
36. Williamson SM, Storey B, Howell S, Harper KM, Kaplan RM, et al. (2011) Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 180: 99-105.
37. De Graef J, Demeler J, Skuce P, Mitreva M, von Samson-Himmelstjerna G, et al. (2013) Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant *Cooperia oncophora*

3.2 *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains

- isolate following in vivo and in vitro exposure to macrocyclic lactones. *Parasitology*: 1-10.
38. Demeler J, Krucken J, Aligusbi S, Ramunke S, De Graef J, et al. (2013) Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Mol Biochem Parasitol*.
 39. Williamson SM, Wolstenholme AJ (2012) P-glycoproteins of *Haemonchus contortus*: development of real-time PCR assays for gene expression studies. *J Helminthol* 86: 202-208.
 40. Geary TG, Sims SM, Thomas EM, Vanover L, Davis JP, et al. (1993) *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. *Exp Parasitol* 77: 88-96.
 41. Gill JH, Redwin JM, van Wyk JA, Lacey E (1991) Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 21: 771-776.
 42. Gill JH, Kerr CA, Shoop WL, Lacey E (1998) Evidence of multiple mechanisms of avermectin resistance in *haemonchus contortus*--comparison of selection protocols. *Int J Parasitol* 28: 783-789.
 43. Adamson P, Andreopoulos C, Arms KE, Armstrong R, Auty DJ, et al. (2008) Measurement of neutrino oscillations with the MINOS detectors in the NuMI beam. *Phys Rev Lett* 101: 131802.
 44. Barriere A, Felix MA (2005) Natural variation and population genetics of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*: 1-19.
 45. Otsen M, Hoekstra R, Plas ME, Buntjer JB, Lenstra JA, et al. (2001) Amplified fragment length polymorphism analysis of genetic diversity of *Haemonchus contortus* during selection for drug resistance. *Int J Parasitol* 31: 1138-1143.
 46. Prichard R (2001) Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol* 17: 445-453.
 47. Laing ST, Ivens A, Butler V, Ravikumar SP, Laing R, et al. (2012) The transcriptional response of *Caenorhabditis elegans* to Ivermectin exposure identifies novel genes involved in the response to reduced food intake. *PLoS One* 7: e31367.
 48. Cassada RC, Russell RL (1975) Dauerlarva, a Post-Embryonic Developmental Variant of Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 46: 326-342.

3 VERÖFFENTLICHUNGEN

Table S1: Comparison of different *C. elegans* P-glycoproteins

	Expression site	Assay	Yan et al.^a	Ardelli et al.^b	Janssen et al.
Pgp-1	Intestine ^{c,d,e} , pharynx ^c	mRNA level	↑ [*]	↑(0.5 h) ↔(1.5-2.5 h) **	
		egg production velocity pharyngeal pump. development ^{****}			moderate
Pgp-2	Pharynx ^{e,g,h} ,	mRNA level	↑ [*]	↔(0.5-2.5 h) **	
	intestine ^{g,h,i} , nervous system ^{g,h,k}	egg production velocity	↔ ↔(1.5 h)	↑(0.5 h) ↓(1.5-2.5 h)	
		pharyngeal pump. development ^{****}	↓(5,15,20 ng/ml)		small
Pgp-3	Intestine ^{c,d,e,f,g,h} , reproductive system ^{g,h} , vulval muscle ^{g,h} , excretory cell ^{e,e,f,g,h} , pharynx ^c	mRNA level	↔ [*]	↔(1.5-2.5 h) **	
		egg production velocity	↔ ↑(15ng/ml)(1.5 h)		
		pharyngeal pump. development ^{****}	↔		Small
Pgp-4	Body wall muscle ^{g,h} , nervous system ^{g,h} , excretory cell ^{e,f,g,h}	mRNA level	↑ [*]	↔(0.5 h) ↑(1.5- 2.5 h) **	
		egg production velocity	↓ (15, 20ng/ml) ↑ (20ng/ml) (1.5 h)	↑(0.5 h) ↓(2.0-2.5 h)	
		pharyngeal pump. development ^{****}	↑ (15 ng/ml)		Small
Pgp-5	Intestine ^e	mRNA level	↔ [*]	↔(0.5-1.5 h) ↑(2.5 h) **	
		egg production velocity	↔ ↔(1.5 h)	↑(0.5 h) ↓(1.5-2.5 h)	
		pharyngeal pump. development ^{****}	↓ (0, 5ng/ml)		Small
Pgp-6	Pharynx ^{g,h} , intestine ^{e,g,h} , amphids ^e , unidentified cells in head ^{g,h}	mRNA level		↔(0.5 h)	
		egg production velocity		↑(0.5-1.0 h) ↓(1.5-2.5 h)	
		pharyngeal pump. development ^{****}			Small ^{***}

3.2 *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains

Pgp-7	Intestine ^{g,h} , rays of adult male tail ^e	mRNA level egg production velocity pharyngeal pump. development ^{****}	↔(0.5 h) ↑(1.5- 2.5 h)** ↑(1.0-1.5 h) ↓(2.5 h)	Small ^{***}
Pgp-8	Head neurons ^e	mRNA level egg production velocity pharyngeal pump. development ^{****}	↔(0.5-2.5 h) **	Moderate
Pgp-9	Nervous system ^{g,h} , intestine ^{e,g,h} pharynx ^e	mRNA level egg production velocity pharyngeal pump. development ^{****}	↑(0.5 h) ↔(1.5- 2.5 h) **	Moderate
Pgp-10	Hypodermis ^{g,h} , Intestine ^{e,g,h}	mRNA level egg production velocity pharyngeal pump. development ^{****}	↔ (0.5-2.5 h) **	Small
Pgp-11	Intestine ^{e,g,h} , rectal gland cells ^{g,h} , excretory cell ^{e,g,h}	mRNA level egg production velocity pharyngeal pump. development ^{****}	↑(0.5-2.5 h) **	Moderate
Pgp-12	Excretory cell ^{e,f,g,h,l} , intestine ^{g,h} , hypodermis ^{g,h} , pharynx ^{g,h} , unidentified cells in head and tail ^{g,h}	mRNA level ↑ [*] egg production velocity pharyngeal pump. development ^{****}	↑(0.5 h) ↔(1.5-2.5 h) ** ↓(2.0-2.5 h)	Moderate
Pgp-13	Intestine ^{e,f} , amphids ^{e,f}	mRNA level egg production velocity pharyngeal pump. development ^{****}	↑(0.5-1.5 h) ↔(2.5 h) ** ↑(0.5-1.0 h) ↓(2.0-2.5 h)	Small

3 VERÖFFENTLICHUNGEN

Pgp-14	Pharynx ^{e,f,g,h}	mRNA level	↑*	↑(0.5- 2.5 h) **	
		egg production velocity pharyngeal pump. development****			Moderate
Pgp-15	Head and tail neurons ^e	mRNA level		↑(0.5- 2.5 h) **	
		egg production velocity pharyngeal pump. development****			small

↑: indicates a significant increase in Pgp-expression or worm activity; ↓: indicates a significant decrease in Pgp-expression or worm activity; ↔: indicates no significant difference between IVM resistant and N2 Bristol, the Pgp knock-down and the control group or the Pgp knock-out and the N2 Bristol strain, respectively. Numbers in brackets represent IVM exposure times and used IVM-concentrations, respectively. Pgp knock-down worms were constructed by RNAi, Pgp knock-down worms were mutagenised. *Comparison of expression rates after IVM exposition between an IVM selected strain relative to the N2 strain and **an IVM resistant strain containing point mutations in the GluCl α subunits to the N2 strain. ***Gene knock-out for *pgp-6* and *-7* was investigated in one strain. ****Results of the development assay were categorised in two groups ranging from 1.5-1.8-fold decreased EC₅₀ (small) and 2.4-4.3-fold decreased EC₅₀ (moderate).

^aYan, R., Urdaneta-Marquez, L., Keller, K., James, C.E., Davey, M.W., Prichard, R.K., 2012. The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Vet. Parasitol.* 190, 519-529.

^bArdelli, B.F., Prichard R.K., 2012. Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Vet. Parasitol.* S0304-4017.

^cBroeks, A., Janssen H.W., Calafat J., Plasterk R.H., 1995. A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins. *EMBO J.* 14, 1858-1866.

^dLincke, C.R., Broeks, A., The, I., Plasterk, R.H., Borst, P., 1993. The expression of two P-glycoprotein (*pgp*) genes in transgenic *Caenorhabditis elegans* is confined to intestinal cells. *EMBO J.* 12, 1615-1620.

^eZhao, Z., Sheps, J.A., Ling, V., Fang, L.L., Baillie D.L., 2004. Expression analysis of ABC transporters reveals differential functions of tandemly duplicated genes in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 344, 409-417.

^fZhao, Z., Thomas, J.H., Chen, N., Sheps, J.A., Baillie, D.L., 2007. Comparative genomics and adaptive selection of the ATP-binding-cassette gene family in *caenorhabditis* species. *Genetics* 175, 1407-1408.

^gHunt-Newbury, R., Viveiros R., Johnsen, R., Mah, A., Anastas, D., Fang, L., Halfnight, E., Lee, D., Lin, J., Lorch, A., McKay, S., Okada H.M., Pan, J., Schulz A.K., Tu, D., Wong, K., Zhao, Z., Alexeyenko, A., Burglin, T., Sonnhammer, E., Schnabel, R., Jones, S.J., Marra, M.A., Baillie D.L., Moerman D.G., 2007. High-throughput in vivo analysis of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 5, e237.

^hMcKay, S.J., Johnsen, R., Khattra, J., Asano, J., Baillie, D.L., Chan, S., Dube, N., Fang, L., Goszczynski, B., Ha, E., Halfnight, E., Hollebakk, R., Huang, P., Hung, K., Jensen, V., Jones, S.J., Kai, H., Li, D., Mah, A., Marra, M., McGhee, J., Newbury, R., Pouzyrev, A., Riddle, D.L., Sonnhammer, E., Tian, H., Tu, D., Tyson, J.R., Vatcher, G., Warner, A., Wong, K., Zhao, Z., Moerman, D.G., 2003. Gene expression profiling of cells, tissues and developmental stages of the nematode *C. elegans*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 68, 159-169.

ⁱSchroeder, L.K., Kremer, S., Kramer, M.J., Currie, E., Kwan, E., Watts J.L., Lawrenson, A.L., Hermann, G.J., 2007. Function of the *Caenorhabditis elegans* ABC Transporter PGP-2 in the Biogenesis of a Lysosome-related Fat Storage Organelle. *Mol. Biol. Cell.* 18, 995-1008.

^jNunes, F., Wolf, M., Hartmann J., Paul R.J., 2005. The ABC transporter PGP-2 from *Caenorhabditis elegans* is expressed in the sensory neuron pair AWA and contributes to lysosome formation and lipid storage within the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 862-871.

^kZhao, Z., Fang, L., Chen, N., Johnsen, R.C., Stein, L., Baillie, D.L., 2005. Distinct regulatory elements mediate similar expression patterns in the excretory cell of *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 280, 38787-94.

4 DISKUSSION

Trotz einer meist niedrigeren Prävalenz als z. B. bei der BZ-Resistenz der kleinen Strongyliden, stellt die seit mehr als 10 Jahren zu beobachtende ML-Resistenz bei *P. equorum* aufgrund der hohen Pathogenität dieses Parasiten eine nicht zu unterschätzende Gefahr in der Pferdehaltung dar. Um das weitere Fortschreiten dieser Entwicklung zu unterbinden bzw. zu verlangsamen, ist die Entwicklung molekularer Tests für die Resistenzdiagnostik zu einem Zeitpunkt, an dem der Anteil der entsprechenden Allelfrequenzen noch gering ist, von entscheidender Bedeutung (Prichard, 1990). So ist beispielsweise von Arthropoden bekannt, dass die Stabilität der Resistenz in einer Population, die nicht unter Selektionsdruck steht, direkt mit dem Anteil resistenter Individuen in Zusammenhang steht (Bielza et al., 2008). Aus diesem Grund ist die Kenntnis der biochemischen und molekularen Zusammenhänge die Voraussetzung dafür, eine phänotypische Ausprägung der Anthelminthikaresistenz zu verhindern und den Wirksamkeitsverlust einer ganzen Wirkstoffklasse zu vermeiden. Da entsprechende *in vivo*- und *in vitro*-Testverfahren insbesondere bei der equinen Resistenzdiagnostik gegenüber MLs nicht verfügbar sind oder mangels geeigneter Validierung deutliche Schwächen aufweisen, kommt der Entwicklung molekularer Methoden eine große Bedeutung zu (Coles et al., 2006). Bisher ist es noch nicht gelungen, spezifische genetische Veränderungen in Genen der ABC-Transporter, die sich für die Verwendung als Marker bei ML-Resistenz eignen, zu identifizieren (Wolstenholme & Kaplan, 2012).

4.1 Identifizierung und Charakterisierung von P-Glykoproteinen des Pferdespulwurms *P. equorum*

Die Identifizierung entsprechender Sequenzen und deren phylogenetische Einordnung stellt die Grundlage der weiteren Untersuchungen zur Bedeutung der *Parascaris*-Pgps im Resistenzgeschehen gegenüber MLs dar. Innerhalb der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz konnten Pgp-typische, konservierte Motive bestimmt werden, die für eine Zugehörigkeit zu der Familie der ABC-Transporter sprechen.

4.1.1 Identifizierung zweier *P. equorum* Pgps

ABC-Transporter, zu denen auch die Pgps gehören, sind in allen drei Regna zu finden. Ihre Entstehung wird auf eine Zeit von vor mehr als 3 Milliarden Jahren zurückdatiert (Saier et al., 1998). Verfügbare Einträge in den Datenbanken zu den Pgps von Nematoden konzentrieren sich weitgehend auf die der Gattung *Caenorhabditis* (u. a. *C. elegans*, *C. briggsae*; www.wormbase.org). Bei parasitischen Nematoden dominieren die entsprechenden Homologe der Trichostrongyliden (*H. contortus*, *C. oncophora*, *T. circumcincta*) (Dicker et al., 2011; Williamson & Wolstenholme, 2012; De Graef et al., 2013b; Demeler et al., 2013) und der kleinen Strongyliden des Pferdes (Drogemüller et al., 2004). Des Weiteren sind Sequenzen dreier Filarienarten (*O. volvulus*, *B. malayi*, *D. immitis*) bekannt (Huang & Prichard, 1999; Ardelli et al., 2010; Bourguinat et al., 2011c). Für die Familie der Askariden wurden im Rahmen der Illumina-Sequenzierung des Transkriptom mehrere homologe Sequenzen von *A. suum* identifiziert (Acc. No.: ADY40818; ADY40776). Trotz der bekannten Resistenzproblematik bei *P. equorum* und einer beobachteten Korrelation zwischen der Aktivität der Pgps und ML-Resistenz bei anderen Nematoden waren zu Beginn der Arbeit keine entsprechenden Einträge für *Parascaris* in den Datenbanken hinterlegt.

Die Verwendung von degenerierten Primern nach Sangster et al. (1999) und die anschließende *Rapid Amplification of cDNA-Ends* (RACE)-PCR ermöglichte die Ermittlung der vollständigen kodierenden Sequenzen zweier *pgp*-Homologe für *P. equorum* und stellte somit die erste Information zu *Multidrug*-Transportern für diesen Parasiten dar. Die Translation der Nukleotidsequenzen führte zu Polypeptiden mit einer Länge von 1285 bzw. 1284 Aminosäuren. Ähnliche Größenangaben sind auch in der Literatur zu finden (Zhou, 2008). Die deduzierte molare Masse der beiden identifizierten Proteine von *P. equorum* beträgt ohne Zuckeranteil 141,05 bzw. 139,45 kDa und entspricht damit ebenfalls den Größen von Pgps anderer Nematoden (Huang & Prichard, 1999). Angaben höherer molarer Massen resultieren aus der starken posttranslationalen Modifikation wie der Glykosylierung und Phosphorylierung, welche die Pgps erfahren (Endicott & Ling, 1989). Im Bereich der untranslatierten Region des 5'-Endes findet sich bei ersterer Sequenz eine *Spliced-Leader*-Sequenz des SL1-Typs. Die hiermit verbundene Form der RNA-Prozessierung (*trans-Splicing*) ist im Stamm der Nematoden weit verbreitet (Blaxter & Liu, 1996).

Die phylogenetische Einordnung in die Pgp-Sequenzen von *C. elegans* zeigte die größten Ähnlichkeiten mit der Aminosäuresequenz des Pgp-11 von *C. elegans*, daher die Bezeichnung als *PeqPgp-11*; der Vergleich mit bekannten Pgp-Sequenzen parasitischer Nematoden ergab außerdem eine hohe Übereinstimmung mit den als Pgp und Pgp-1 bezeichneten komplementären DNAs (cDNAs) von *O. volvulus*. Sowohl die Sequenzen von *C. elegans* als auch die von *O. volvulus* wurden bereits mit ML-Resistenz in Verbindung gebracht (Prichard & Roulet, 2007; Ardelli & Prichard, 2013). Für die zweite Sequenz (*PeqPgp-16*) war eine eindeutige Zuordnung innerhalb des *C. elegans* Proteoms nicht möglich, da ähnlich hohe Übereinstimmungen mit dem Pgp-4 und Pgp-3 von *C. elegans* bzw. *C. briggsae* vorlagen.

4.1 Identifizierung und Charakterisierung von P-Glykoproteinen des Pferdespulwurms *P. equorum*

Pgp-3 von *C. elegans* wurde schon früh für die Entgiftung von Colchicin und Chloroquin sowie von bakteriellen Toxinen verantwortlich gemacht (Broeks et al., 1995). Die Bedeutung von Pgp-4 für den IVM-Transport wurde dagegen erst kürzlich publiziert (Yan et al., 2012; Ardelli & Prichard, 2013). Die höchste Ähnlichkeit der hier detektierten Sequenz zeigte sich jedoch bei dem Vergleich mit dem *C. briggsae* Pgp CBG-12969, das derzeit einer Nomenklatur entsprechend der anderen *Caenorhabditis*-Pgps sowie einer näheren Bestimmung seiner Funktion entbehrt.

Im Rahmen dieser Berechnungen wurde außerdem das enge verwandtschaftliche Verhältnis zwischen den Homologen von *A. suum* und *P. equorum* deutlich, welches aufgrund der Tatsache, dass beide derselben monophyletischen Gruppe entstammen, nicht weiter verwundert (Nadler, 1987a). Eine nähere Charakterisierung der homologen *A. suum*-Sequenzen insbesondere in Hinblick auf ihre Beteiligung an der Anthelminthikaresistenz erfolgte bisher jedoch noch nicht.

4.1.2 Charakterisierung von *PeqPgp-11* und *PeqPgp-16*

ABC-Transporter treten in Abhängigkeit von ihrer Funktion und ihres Vorkommens bei Pro- oder Eukaryoten als Im- oder Exporter bzw. als Mono-, Di- oder Tetramer auf (Jones & George, 2005). Bei vielen eukaryotischen ABC-Transportern, so auch den Pgps, handelt es sich um eine einzelne Polypeptidkette mit vier Domänen (Hollenstein et al., 2007).

Unter Zuhilfenahme des frei zugänglichen *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) war die Vorhersage funktioneller Domänen und somit auch die Bestimmung konservierter Strukturen der Pgps möglich (Altschul et al., 1990). Diese sind sowohl an der Substratbindung und dem -transport als auch an der energetischen Versorgung des Transportvorgangs beteiligt. Der Aufbau von Pgps sieht zwei Transmembran (TM)-Regionen und zwei zytoplasmatische NBDs vor. Die bei zahlreichen ATPasen hochkonservierten NBDs sind essentiell für den energieabhängigen Transport der Pgp-Substrate. Sie sind stark hydrophil und an der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Membran gelegen (Higgins, 1992). Jede dieser Domänen enthält zwei kurze Peptidmotive, das Glycin-reiche *Walker-A-Motiv* (GxxGxGKS/T, x entspricht einem beliebigen Rest; *PeqPgp-11*: 426-433/1079-1086; *PeqPgp-16*: 428-435/1079-1086) und das *Walker-B-Motiv* (ΦΦΦΦDE, Φ entspricht einer hydrophoben Aminosäure; *PeqPgp-11*: 550-555/1203-1208; *PeqPgp-16*: 552-557/1203-1208) (Walker et al., 1982). Beide Motive sind bei vielen Nukleotid-bindenden Proteinen zu finden. Sie sind Teil der ATP-Bindungstasche und an der ATP-Hydrolyse beteiligt (Sangster, 1994; Zhou, 2008). Andere konservierte Motive, wie das ABC-Transporter *Signature-Motiv* (LSGGQ; *PeqPgp-11*: 530-539/1183-1192; *PeqPgp-16*: 532-541/1183-1192), der *D-Loop* (SALD; *PeqPgp-11*: 558-561/1211-1214; *PeqPgp-16*: 560-563/1211-1214), *H-Loop* (His-Rest; *PeqPgp-11*: 582-588/1235-1241; *PeqPgp-16*: 584-590/1235-1241) und *X-Loop* (TxVGE_xG; *PeqPgp-11*: 521-527/1174-1180; *PeqPgp-16*: 523-529/1174-1180) sind dagegen spezifisch für ABC-Transporter (Hyde et al., 1990; Lawson et al., 2008). Schließlich finden sich bei ABC-Transportern ebenfalls in Umgebung des *Walker-A-Motivs* ein *A-Loop* (unveränderlicher Tyrosinrest; *PeqPgp-11*: 400/1053; *PeqPgp-16*: 402/1053) sowie ein *Q-Loop* (VSQEP; *PeqPgp-11*: 471-474/1124-1127; *PeqPgp-16*: 473-476/1124-1127) pro NBD, die beide durch einen hoch konservierten Rest gekennzeichnet sind (Lawson et al., 2008).

Neben den NBDs sind die TM-Regionen eine weitere wichtige funktionelle Einheit der ABC-Transporter. Jede der beiden TM-Regionen setzt sich aus sechs TMHs zusammen, die die Membran durchziehen und die Grundlage des Transportweges darstellen (Lage, 2003). Insbesondere die TMH5 und TMH6 sowie die TMH11 und TMH12 werden für die

4 DISKUSSION

Substratspezifität verantwortlich gemacht (Zhou, 2008). Sie sind daher im Gegensatz zu den NBDs in ihrer Primärsequenz und ihrem Aufbau variabel (Hollenstein et al., 2007). Für *PeqPgp-11* konnten Bereiche mit einer Länge von insgesamt 286 (Position 63-348) bzw. 297 Aminosäuren (Position 723-1019) als TM-Regionen identifiziert werden, für *PeqPgp-16* lagen diese bei 288 (Position 60-347) bzw. 285 Aminosäuren (Position 721-1005).

Wie in dem dreidimensionalen Modell von *PeqPgp-11* dargestellt, befindet sich das Protein im Nukleotid-ungebundenen Zustand in einer zelleinwärts gerichteten Konformation. Der Zugang für hydrophobe Moleküle wird von den TMHs gebildet. Die Voraussetzung für die Substraterkennung und -bindung durch die Pgps ist die Assoziation des Substrats mit dem inneren Blatt der Zellmembran (Higgins, 2007; Aller et al., 2009). Im Gegensatz zum murinen Pgp zeigt das *C. elegans* Pgp-1 nur eine laterale Öffnung in der Membran für den Eintritt von Substraten. Eine zweite Öffnung, die sich z. B. bei der Maus zwischen der TMH4 und TMH6 befindet, wird bei *C. elegans* durch eine Haarnadelstruktur versperrt (Jin et al., 2012). Die Aufklärung der Frage, welches Modell mit dem von *P. equorum* übereinstimmt, bleibt weiterführenden strukturellen Untersuchungen überlassen.

Der Zutritt von Substraten aus dem Zytoplasma ist zwar theoretisch möglich, gilt aber als unwahrscheinlich. Dies hat möglicherweise auch Auswirkungen auf das Substratspektrum, da somit insbesondere hydrophobe Moleküle, die mit dem inneren Blatt der Zellmembran interagieren, transportiert werden (Higgins & Gottesman, 1992; Higgins & Linton, 2004). Des Weiteren erwies sich die Bindungstasche humaner Pgps als ausreichend groß (6000 Å²) für die gleichzeitige Aufnahme zweier Moleküle (Tris-(2-maleimidoethyl)amin und VPL) (Loo et al., 2003; Sharom, 2011).

4.2 Expressionsorte von *Peqpgp-11* und *Peqpgp-16* bei adulten Würmern

Die Untersuchung verschiedener Gewebe adulter Pferdespulwürmer auf ihre Expression von *pgp-11* mRNA ergab eine signifikant höhere Expression im Darm im Vergleich zu dem ebenfalls untersuchten Hautmuskelschlauch und dem Uterus. Ein ähnliches Muster zeigt auch *C. elegans* mit der Expression dieses Gens im Darm und der H-Zelle (McKay et al., 2003; Zhao et al., 2004).

Für *pgp-16* von *P. equorum* wurde der Hautmuskelschlauch als das Organsystem mit der höchsten Expression identifiziert. Dieser enthält neben der Hypodermis auch die ebenfalls für die Fortbewegung der Nematoden unerlässliche Längsmuskulatur sowie das Exkretionssystem (H-Zelle) und den dorsalen und ventralen Nervenstrang. Auch für dieses *Pgp* sind deutliche Übereinstimmungen mit den für *C. elegans* publizierten Ergebnissen zu finden: Für *pgp-4* wurde die Expression im Exkretionssystem nachgewiesen (McKay et al., 2003; Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2007). Zusätzlich wurde sie auch in der Längsmuskulatur der Körperwand sowie im Nervensystem beschrieben (McKay et al., 2003). Bei *pgp-3* wird bei *C. elegans* neben der H-Zelle und dem Darm auch das Reproduktionssystem als Expressionsort erwähnt (Lincke et al., 1993; Broeks et al., 1995; McKay et al., 2003; Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2007). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Konservierung der *Pgp*-Sequenzen, die zwischen den Arten zu finden ist (Endicott & Ling, 1989), auch auf die Expressionsorte auszuweiten ist. Des Weiteren wird durch die Konzentration der Expression auf Strukturen mit ausscheidender bzw. aufnehmender Funktion die Bedeutung der *Pgps* bei der Entfernung endo- und exogener Stoffe aus dem Organismus verdeutlicht (Zhou, 2008).

4.3 Qualitativer und quantitativer Vergleich zwischen Pgps von *P. equorum* Populationen unterschiedlicher ML-Suszeptibilität und unterschiedlichen Entwicklungsstadiums

Für die Identifizierung Anthelminthika-assoziiierter SNPs bestehen zwei Herangehensweisen: Zum einen kann das gesamte Genom auf SNPs untersucht werden. Hierdurch können auch beteiligte Gene, die bisher noch nicht mit Resistenz in Zusammenhang gebracht wurden, bestimmt werden. Die Verfolgung dieses Ansatzes empfiehlt die Kenntnis des Genoms, das bei vielen Organismen wie z. B. *P. equorum* nicht vorliegt. Daher konzentrieren sich die meisten Untersuchungen auf bestimmte Kandidatengene, die in Verdacht stehen, einen Beitrag zur Resistenz zu leisten (von Samson-Himmelstjerna & Blackhall, 2005). Potenzielle Kandidatengene in Hinblick auf ML-Resistenz sind die Pgps. Diese können entweder durch eine Überexpression (Xu et al., 1998; James & Davey, 2009; Dicker et al., 2011) oder durch die Veränderung ihrer Primärstruktur, die mit einem gesteigerten Substrattransport einhergeht (Fung & Gottesman, 2009), zu Resistenzen führen. Beide Möglichkeiten wurden für die ermittelten Pgps durch den Vergleich der Sequenzen verschiedener *P. equorum*-Populationen überprüft. Neben der Aufklärung grundsätzlicher Resistenzmechanismen stellt dies außerdem noch die Möglichkeit zur Evaluierung potenzieller Resistenzmarker für deren spätere Nutzung in der Resistenzdiagnostik dar (Beech et al., 2011). Wie groß das Interesse ist, das der Generierung neuer Resistenzmarker entgegengebracht wird, lässt sich an der Einberufung eines in regelmäßigen Abständen abgehaltenen Treffens verschiedener Arbeitsgruppen erkennen, bei dem neue Erkenntnisse hinsichtlich der Resistenz-assoziierten SNPs zusammengetragen werden (Consortium for Anthelmintic Resistance SNPs, CARS) (Prichard, 2007). Ein populäres Beispiel für die Anwendung stellen auch Methoden mit hoher Durchsatzrate zur Typisierung von SNPs bei *Plasmodium* spp. dar. Diese erlauben die Identifizierung suszeptibler Populationen, obwohl die mit dem Resistenzgeschehen einhergehenden Mechanismen häufig noch ungeklärt sind (Hayton & Su, 2008).

Die Bestimmung derartiger Marker wäre insofern bei *P. equorum* von großem Interesse, als dass derzeit keine validierten *in vivo*- oder *in vitro*-Tests zur Verfügung stehen; ein Umstand, der auch auf andere Askariden übertragbar ist. Die einzige Möglichkeit der Resistenzdiagnostik bei *P. equorum* stellt der FECRT dar, für dessen Durchführung allerdings keine Richtlinien durch die WAAVP herausgegeben wurden (Reinemeyer, 2009).

4.3.1 Qualitative Untersuchung der *Peqppg-11* und *Peqppg-16*-Transkripte: Pgp-Sequenzvergleich und Identifizierung von SNPs mittels SeqDoC-Analyse

Für die molekularbiologische Detektion Resistenz-assoziiierter Veränderungen von Kandidatengenen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung: Anwendung finden in diesem Zusammenhang die Untersuchung auf Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Blackhall et al., 1998a) sowie diagnostische PCR-Verfahren (Garg & Yadav, 2009; Rufener et al., 2009), die *High-Resolution-Melt*-Analyse (Li et al., 2012) oder auch die Untersuchung auf Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) (Blackhall et al., 1998b; Blackhall et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden SNPs durch die Sequenzierung und den anschließenden Vergleich der Sequenzen mit Hilfe der *Sequence-Difference-of-Chromatograms* (SeqDoC)-Analyse detektiert. Das SeqDoC-Programm, bei dem es sich um eine Web-basierte und frei zugängliche Anwendung handelt, ermöglicht den direkten Vergleich mehrerer DNA-Sequenzen. Hierdurch kann der Austausch, die Insertion und die Deletion einzelner Basen detektiert werden (Crowe, 2005). Auf diese Weise konnten

4.3 Qualitativer und quantitativer Vergleich zwischen Pgps von *P. equorum* Populationen unterschiedlicher ML-Suszeptibilität und unterschiedlichen Entwicklungsstadiums

sowohl kodierende als auch nicht kodierende SNPs innerhalb der beiden Pgp-Sequenzen von *P. equorum* ermittelt werden. Zusätzlich bietet die Evaluierung eines Pyrosequenzierungsverfahrens, gesetzt den Fall die SNPs erweisen sich auch in anderen Populationen als Resistenz-assoziiert, die Möglichkeit, zukünftig weitere *P. equorum*-Populationen schnell und vergleichsweise kostengünstig auf die entsprechenden Veränderungen zu untersuchen.

Bei SNPs handelt es sich um genetische Unterschiede zwischen Individuen, die die Grundlage der genetischen Vielfalt innerhalb einer Population reflektieren. Sie können auch durch Genmutation infolge einer Arzneimittelanwendung auftreten (James et al., 2009); eine Aminosäuresubstitution infolge eines SNPs innerhalb der Bindungsstelle kann hierbei aufgrund veränderter Affinitäten die Wirksamkeit eines Stoffes modifizieren (Jin et al., 2012). Dies wurde bisher hauptsächlich für Arzneimittelrezeptoren nachgewiesen (z. B. β -Tubulin), konnte aber ebenso für Effluxsysteme wie die hochkonservierten Pgps bei Säugern gezeigt werden (Jeong et al., 2007; Sauna et al., 2007; Zhou, 2008; Fung & Gottesman, 2009). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen einer Aminosäuresubstitution und der veränderten Interaktion mit IVM konnte bereits für das ebenfalls zu den ABC-Transportern gehörende BCRP (ABCG2) hergestellt werden. Hier erwies sich ein Aminosäureaustausch (Tyr581Ser) als entscheidend in der Modifikation der Inhibitoreigenschaft des IVM (Real et al., 2011). Auch bei den Helminthen verdichten sich die Hinweise darauf, dass Resistenzen nicht unbedingt die Folge von Veränderungen des eigentlichen Wirkstoffziels sind, sondern aufgrund von Abweichungen im Wirkstofftransport oder -metabolismus entstehen (Cvilink et al., 2009). Bisher konnten allerdings in erster Linie Zusammenhänge zwischen der Zunahme der pgp-Expression und dem Auftreten von ML-Resistenz festgestellt werden (Lespine et al., 2012).

Dass die Selektion durch IVM auch strukturelle Auswirkungen für Pgps hat, zeigten Untersuchungen an Filarien und Trichostrongyloiden von human- und veterinärmedizinischer Bedeutung. Unter Einbeziehung von 28 genetischen Markern, die sich über das gesamte *pgp* erstreckten, konnte bei *O. volvulus* nach der Behandlung der Patienten mit IVM eine Abnahme der genetischen Diversität sowie die Zunahme an Markern, die sich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befanden, gezeigt werden (Ardelli et al., 2005; Ardelli et al., 2006b). Der Einsatz von IVM schien außerdem das Auftreten bestimmter Allele zu forcieren. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für ein Pgp-ähnliches Gen (Half-Transporter) erzielt. Zusätzlich wurden hier zwischen der TMH4 und TMH5 SNPs gefunden, deren Evaluierung als Resistenzmarker allerdings noch aussteht (Ardelli et al., 2006a; Bourguinat et al., 2008). Auch bei *H. contortus* wurden Unterschiede zwischen den Allelen IVM-resistenter und -suszeptibler Stämme gefunden (Blackhall et al., 1998a; Le Jambre et al., 1999; Sangster et al., 1999). Der Vergleich von Teilbereichen des *pgp-9* eines resistenten und eines suszeptiblen Isolates von *T. circumcincta* offenbarte zahlreiche Polymorphismen, deren Bedeutung bisher nicht näher bestimmt wurde (Dicker et al., 2011). Schließlich gelang es Bourguinat et al. *in vivo* (2011a) und *in vitro* (2011b) einen Zusammenhang zwischen einem bestimmten Pgp-Genotyp und der ML-Resistenz bei *D. immitis* herzustellen. Neben diesen nicht-synonymen SNPs sollten aber die synonymen nicht von den Untersuchungen ausgeschlossen werden. Für das humane Pgp wurde beispielsweise eine veränderte Substrat-/Inhibitor-Interaktion festgestellt, die mit dem Haplotyp C3435T (Ile1145Ile) einhergeht (Kimchi-Sarfaty et al., 2007). Als Ursache wird u. a. die Möglichkeit diskutiert, dass durch den Nukleotidaustausch ein seltenes Codon an die Position des häufigen tritt, wodurch es zu einer Veränderung der mRNA-Struktur kommt. Entweder durch die Beeinflussung der co-translationalen Faltung oder durch die geringere Verfügbarkeit von

transfer-RNA für dieses Codon wird schließlich auch das Fortschreiten der Ribosomentätigkeit unterbrochen (Fung & Gottesman, 2009).

Die Untersuchung der cDNA von *pgp-16* der Eier verschiedener *P. equorum*-Populationen führte zu der Detektion von nur wenigen, größtenteils synonymen SNPs. Ferner war es nicht möglich, einen Zusammenhang zwischen der verringerten ML-Wirksamkeit im Rahmen der Behandlungen der *Parascaris*-Infektionen und dem Auftreten einer bestimmten Mutation herzustellen. Dieses Ergebnis und die im folgenden Kapitel diskutierten Resultate der Expressionsraten sprechen gegen eine Beteiligung von *pgp-16* an der Resistenz gegenüber MLs in den untersuchten *P. equorum*-Populationen.

Im Gegensatz dazu sind die für *Pgp-11* gewonnenen Daten äußerst vielversprechend. Der Vergleich der Sequenzen, die von sechs Populationen unterschiedlicher ML-Suszeptibilität gewonnen wurden, offenbarte 29 SNPs, von denen 14 den Austausch einer Aminosäure zur Folge hatten. Diese konzentrierten sich größtenteils auf den Bereich der TMH1 und TMH2. Drei weitere Aminosäuresubstitutionen, die sich in einem Abschnitt befinden, der weniger als 50 Aminosäuren umfasst, verdienen jedoch besondere Beachtung: Das Auftreten dieser Polymorphismen steht in enger Abhängigkeit mit der zuvor beobachteten verringerten ML-Wirksamkeit bei *P. equorum*-Infektionen. Dies wurde besonders bei den Sequenzen der *pgp-11* cDNAs der intermediären Populationen (Gestüt C und D) erkennbar, bei denen sich das Vorkommen der identifizierten SNPs im Vergleich zu den suszeptiblen Populationen z. T. bereits verdoppelt hatte und daher die Dynamik der einsetzenden Resistenzentwicklung in diesen Populationen verdeutlicht. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Populationen mit ausbleibender ML-Wirksamkeit (Gestüt B2 und E) an allen drei Positionen ausschließlich die substituierte Aminosäure (Anmerkung: Eine erneute Untersuchung mit Proben, die nach einer zweijährigen Pause im Betrieb E entnommen wurden, bestätigte die ursprünglich für diesen Betrieb erhobenen Ergebnisse).

Alle drei Polymorphismen befinden sich in der TMH11 oder flankieren diese. Diese bildet gemeinsam mit der TMH12 den *Hotspot* IIA, der neben *Hotspot* I (TMH1, TMH5, TMH6) und *Hotspot* IIB (TMH9) des humanen bzw. murinen *Pgp* als Bereich von Mutationen, die die Substratspezifität des Proteins beeinflussen, verantwortlich gemacht wird (Shilling et al., 2006). Bei dem direkten Vergleich der einzelnen TMHs zwischen dem murinen *Pgp* und einem Homolog von *C. elegans* (*Pgp-1*) wurde hier eine hohe Deckungsgleichheit zwischen den beiden Sequenzen gefunden; ein Umstand, der nicht auf alle TMHs übertragbar ist: Bei starken Abweichungen zwischen den Spezies kommt es durch die im Rahmen der Verschiebungen erforderlichen Korrekturen zu Schwierigkeiten in der Vorhersage Substratbindender Aminosäuren und der genauen Bestimmung der Schnittstelle zwischen NBDs und TM-Regionen (Jin et al., 2012).

Nach der Einteilung von Grantham (1974), die sich an dem chemischen Unterschied zwischen Aminosäuren orientiert (Minimalwert: 5; Maximalwert 215), ist der hier beobachtete Wechsel von Asparaginsäure zu Asparagin (Asp931Asn) vergleichsweise gering (23). Auch der Hydrophathie-Index (Kyte & Doolittle, 1982), der sich aus den hydrophoben und -philen Eigenschaften der Seitenketten zusammensetzt, ändert sich nicht (beide -3,5). Der Wechsel von Cystein zu Serin (Cys951Ser) geht dagegen mit einer deutlichen chemischen Abweichung einher (112) und auch der Hydrophathie-Index unterscheidet sich prägnant (2,5 zu -0,8). Die Substitution befindet sich unmittelbar neben einer bereits für ein humanes *Pgp* (ABC1) in der TMH11 lokalisierten Substratbindungsstelle (Phe942) (Loo & Clarke, 2000; Loo & Clarke, 2001). Der Nachweis für die Bedeutung dieses Restes für die Substratbindung wurde u. a. durch den Gebrauch von Dibromobiman nach der Cystein-Mutagenese erbracht (Loo & Clarke, 1999). Des Weiteren konnte im Rahmen der gerichteten Mutagenese (Phe942Ala) eine veränderte ATPase-Aktivität unter Anwesenheit verschiedener *Pgp*-

4.3 Qualitativer und quantitativer Vergleich zwischen Pgps von *P. equorum* Populationen unterschiedlicher ML-Suszeptibilität und unterschiedlichen Entwicklungsstadiums

Substrate gezeigt werden (Loo & Clarke, 1999). Der Sequenzabgleich mit dem murinen Pgp offenbarte außerdem die unmittelbare Nachbarschaft zu einer spontanen Mutation (Ser939Phe), die zu einer bis zu 30fachen Resistenz gegenüber Colchicin und Doxorubicin führte (Gros et al., 1991). Die Alaninmutagenese weiterer Aminosäurereste in diesem Bereich führte z. T. zu einer 2- bis 3fachen Abnahme der Resistenz gegenüber den genannten Verbindungen (Hanna et al., 1996). Die Beurteilung, inwiefern dieser Aminosäureaustausch tatsächlich mit einer Resistenzentwicklung bei *P. equorum* in Zusammenhang steht, ist an dieser Stelle rein spekulativ, da die hier erhobenen Daten deskriptiver Natur sind und bleibt daher weiteren experimentellen Arbeiten vorbehalten.

Der Austausch von Tyrosin zugunsten des Histidins (Tyr978His) hat eine moderate Veränderung (83) der chemischen Eigenschaften zur Folge. Durch den Wechsel einer aromatischen Seitenkette in eine basische Seitenkette kommt es zu einem Anstieg der hydrophilen Eigenschaften (Hydrophathie-Index von -1,3 zu -3,2). Die betroffene Aminosäure befindet sich im extrazellulären Bereich am Übergang von der TMH11 zur TMH12. Das *Alignment* zwischen den Aminosäuresequenzen von *PeqPgp-11* und dem murinen Pgp (ABCB1) zeigt hier zwar keine unmittelbare Nachbarschaft zu bereits bekannten Bindungsstellen wie in dem zuvor geschilderten Fall (Aller et al., 2009); nichtsdestotrotz ist die größte Ansammlung an Aminosäuren, die mit der Bindung verschiedener Pgp-Substrate bei ABCB1 in Verbindung gebracht werden, in der Primärstruktur in einem Abstand von sechs Aminosäuren zu finden.

Transmembranhelices, insbesondere die TMH11, besitzen im Allgemeinen eine hohe Dichte an Aminosäuren, deren Seitenketten als Donatoren für Wasserstoffbrückenbindungen dienen. Während die nicht-reaktiven Reste dem hydrophoben Anteil der Membran zugewandt sind, stellen die Aminosäurereste mit den reaktiven Wasserstoffbindungsstellen die Substratbindungsstelle dar (Seelig et al., 2000). Bei den Substituenten Asparagin und Serin handelt es sich jeweils um Wasserstoff-Donatoren, die entsprechend mit Wasserstoff-Akzeptoren in Wechselwirkung treten können. Die Stärke der Bindung steigt mit der Anzahl der Akzeptoren des Substrates an, u. a. ein Grund, weswegen es sich bei IVM um ein gutes Pgp-Substrat handelt (Seelig, 1998). Histidin besitzt neben seiner Eigenschaft als Wasserstoff-Donator eine aromatische Seitenkette, die der Stabilisierung bei der Bindung von Liganden mit einer kationischen oder aromatischen funktionellen Einheit dient (Shilling et al., 2006).

Vergleichspopulationen, die im Rahmen von Kandidatengenanalysen untersucht werden, können entweder aus einer experimentellen Infektion mit nachfolgender Selektion auf Anthelminthikaresistenz hervorgehen oder aus dem Feld isoliert werden (Prichard et al., 2007). Suszeptible und resistente Linien, die durch eine experimentelle Infektion und Selektion gewonnen wurden, besitzen wegen des gemeinsamen Ursprungs denselben genetischen Pool. Daher können Unterschiede zwischen den Linien i. d. R. direkt auf die Resistenzselektion zurückgeführt werden, wodurch die Gefahr des Auftretens anderer Unterschiede im Genom, wie sie zwischen zwei vollständig unabhängigen Isolaten zu finden sind, verringert wird (Gilleard & Beech, 2007). Derartige Abweichungen finden sich insbesondere dann, wenn es sich um Populationen unterschiedlichen geographischen Ursprungs handelt (Troell et al., 2006). Es müssen aber auch die Probleme bei der Verwendung experimentell generierter Isolate berücksichtigt werden: Zum einen besteht die Gefahr des *bottleneck*-Effekts innerhalb der Population (Gilleard & Beech, 2007). Dieser kann durch den Einsatz einer ausreichend großen Population, die Generierung und den Vergleich mehrerer Linien sowie die begleitende Untersuchung von Kontrollgenen, die vom Selektionsprozess ausgeschlossen sind, verhindert bzw. überwacht werden (Blackhall et al., 1998a; Blackhall et al., 2003). Zum anderen können Veränderungen, die nicht mit der

Anthelminthikaselektion in Zusammenhang stehen aber dennoch Auswirkungen auf die Biologie des Parasiten haben, hervorgerufen werden. So können z. B. kurze Intervalle zwischen den einzelnen Passagen eine Selektion von Individuen mit einer verkürzten Entwicklungszeit hervorrufen (Gilleard & Beech, 2007). Bei der hier vorgestellten Arbeit wurde auf die Generierung experimentell selektierter Linien u. a. aus Tierschutz-, sowie organisatorischen und finanziellen Gründen verzichtet und auf verschiedene Feldisolate zurückgegriffen. Dies stellt die beste Möglichkeit dar, die im Feld relevanten Veränderungen zu untersuchen. Im Gegensatz zu anderen parasitischen Nematoden wie z. B. *Dictyocaulus viviparus* (Höglund et al., 2004) oder den hochdiversen Trichostrongyliden (Blouin, 1998; Braisher et al., 2004; Troell et al., 2006) besteht bei *P. equorum* aufgrund einer außerordentlich hohen globalen Homogenität eine vergleichsweise geringe Gefahr, dass durch eine genetische Differenzierung zwischen einzelnen Subpopulationen nicht Resistenz-assoziierte genetische Unterschiede detektiert werden. Der geringe Grad an genetischer Differenzierung wird als Folge eines hohen Genflusses sowie einer geringen Mutationsrate angesehen (Tydén et al., 2013). Dies scheint ein generelles Charakteristikum der Askariden zu sein, wie bereits Untersuchungen bei *A. suum* und *Ascaridia galli* zeigten (Nejsum et al., 2005; Höglund et al., 2012).

Neben Eiern wurden auch andere Entwicklungsstadien in die Untersuchung miteinbezogen. Die SeqDoC-Analyse präadulte Spulwürmer ergab, dass die bei den Eiern zu beobachtenden Veränderungen der Primärstruktur auch hier zu finden waren. Während eine zufällig entnommene Probe aus dem Schlachthof Allelfrequenzen aufwies, die auch bei den suszeptiblen Populationen ermittelt wurden, zeigte eine Gruppe von Würmern, die nach der Entwurmung einen resistenten Phänotyp aufwies, hinsichtlich der Frequenz der drei ermittelten SNPs deutliche Übereinstimmungen mit dem intermediären Phänotyp der untersuchten Eipopulationen.

Sollte sich auch nur ein Teil dieser Aminosäuresubstitutionen in weiterführenden Untersuchungen für die Nutzung als genetischer Resistenzmarker eignen, würde dies die Kontrolle des weiteren Resistenzgeschehens bei *P. equorum* erheblich erleichtern und die Identifizierung entsprechender Populationen zu einem frühen Zeitpunkt, an dem die genetischen Veränderungen noch nicht zu einem signifikanten Behandlungsversagen geführt haben, ermöglichen (Gilleard & Beech, 2007). Dennoch müssen zum gegenwärtigen Zeitpunkt auch die Einschränkungen bei der Evaluierung berücksichtigt werden. Bei *C. elegans* führte beispielsweise erst die gleichzeitige Mutation von drei Genen, die zwar alle für GluCl- α -Untereinheiten kodieren, aber auf unterschiedlichen Wegen an der IVM-Suszeptibilität beteiligt sind, zu einem erhöhten Resistenzlevel (Dent et al., 2000). Ein resistenter Phänotyp kann außerdem aufgrund der Wirkung verschiedener Mechanismen auch in Abwesenheit eines bestimmten SNPs beobachtet werden, so dass die Übertragbarkeit resistenzassoziiierter SNPs zwischen den Spezies ebenfalls nicht immer gegeben ist. Der für *H. contortus* identifizierte SNP des β -Tubulins (Phe200Tyr), der bei dieser Spezies mit einer BZ-Resistenz einhergeht, konnte z. B. nicht für die Bestimmung des Resistenzstatus bei Hakenwürmern eingesetzt werden (Albonico et al., 2004).

Zusätzlich zu diesen zunächst deskriptiven Untersuchungen ist auch die funktionelle Überprüfung der Bedeutung der detektierten Mutation an der Ausbildung eines resistenten Phänotyps erforderlich. Ein Zusammenhang kann erst dann sicher hergestellt werden, wenn sowohl der funktionelle Nachweis als auch der Feldnachweis vorliegen. Als bekanntes Beispiel für die erfolgreiche Kandidatengenanalyse bei parasitischen Nematoden ist auch hier wieder die Evaluierung von Resistenzmarkern innerhalb der β -Tubulin kodierenden Gene zu nennen (von Samson-Himmelstjerna et al., 2009). Bei den MLs gestaltet sich die Situation bisher dagegen schwieriger. Die Untersuchung von GluCl α s ermöglichte zwar die

4.3 Qualitativer und quantitativer Vergleich zwischen Pgps von *P. equorum* Populationen unterschiedlicher ML-Suszeptibilität und unterschiedlichen Entwicklungsstadiums

Identifizierung mehrerer scheinbar mit IVM-Resistenz in Zusammenhang stehender Mutationen (Njue et al., 2004); deren Vorkommen konnte bei anderen IVM-resistenten Trichostrongyloiden-Populationen jedoch nicht nachgewiesen werden (El-Abdellati et al., 2011).

4.3.2 Quantifizierung der SNPs mittels Pyrosequenzierung

Die quantitative Pyrosequenzierung erlaubt das Screening nach spezifischen Polymorphismen in einer großen Anzahl individueller Parasiten und ermöglicht außerdem die Quantifizierung unterschiedlicher Allele in einer gepoolten DNA-Probe. Diese Vorgehensweise hat sich bereits bei der Detektion von SNPs im Fall der BZ-Resistenz bewährt (Diawara et al., 2009; von Samson-Himmelstjerna et al., 2009). Eine Einschränkung besteht darin, dass nur ein relativ kurzer DNA-Abschnitt auf SNPs untersucht werden kann (Beech et al., 2011). Daher eignet sich diese Methode in erster Linie bei der Untersuchung von Populationen auf das Auftreten bereits bekannter SNPs. Sofern sich die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten SNPs auch in weiteren *P. equorum*-Populationen wiederfinden sollten, könnten auf diese Weise betroffene Pferdebestände zukünftig leicht auf den Resistenzstatus der vorkommenden *P. equorum*-Population überprüft werden.

Die Pyrosequenzierung erfordert zunächst die Amplifikation des den SNP tragenden Genabschnittes. Als Template wurde hier neben der cDNA von fünf der sechs bereits für die SeqDoC-Analyse verwendeten *P. equorum*-Populationen (für Population B bestand kein ausreichendes Probenvolumen) auch die Plasmid-DNA eines Allels mit bzw. eines ohne die drei Substitutionen in einer seriellen Verdünnungsreihe (0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 100:0) eingesetzt (Janssen et al., unveröffentlicht). Dieser Ansatz diente der Überprüfung von Reproduzierbarkeit und Genauigkeit des Tests (von Samson-Himmelstjerna & Blackhall, 2005) und belegte außerdem die hohe Sensitivität, mit der dieses Verfahren im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung einhergeht. Auf diese Weise konnte ein entsprechender Assay für zwei der drei ermittelten SNPs (Codon 931 und Codon 951) von *PeqPgp-11* etabliert werden. Sie zeigten in drei voneinander unabhängigen Untersuchungen eine hohe Korrelation zwischen den rechnerisch und experimentell ermittelten Werten. Die Grenzen dieses Verfahrens offenbaren sich dagegen im Bereich niedriger Allelfrequenzen (y-Achsenabschnitt $\beta = 10,4$ bzw. 7), deuten aber dennoch auf eine höhere Sensitivität als die des FECRT hin (Martin et al., 1989). Für die Detektion des SNPs im Bereich des Codons 978 konnte mit Hilfe dieses Verfahrens bisher noch keine zufriedenstellende Sensitivität erzielt werden (Steigungswinkel $\alpha = 0,6$), weswegen hier die Etablierung eines anderen Primers erforderlich wird, auf dessen Bestimmung und Evaluierung aus Zeitgründen aber verzichtet werden musste. Eine signifikante positive Korrelation konnte außerdem zwischen den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung und der Pyrosequenzierung für die SNPs des Codons 931 ($p = 0,015$) bzw. Codons 951 ($p = 0,0332$) bei der Untersuchung der *P. equorum*-Populationen hergestellt werden, wobei es insbesondere im Bereich hoher Allelfrequenzen zu guten Übereinstimmungen zwischen den beiden Methoden kam.

Die zukünftige Verwendung dieses Verfahrens zu diagnostischen Zwecken hängt von den Ergebnissen weiterer Untersuchungen von *P. equorum*-Populationen ab, deren Resistenzstatus nach einem einheitlichen Verfahren mit Hilfe des FECRT bestimmt wurde. Dabei sollte davon abgesehen werden, das Vorhandensein aller drei SNPs als Voraussetzung für den Erfolg der Methode anzusehen. Vielmehr besteht auch die Möglichkeit, dass nur ein einzelner SNP bzw. nur niedrige Frequenzen der SNPs in phänotypisch resistenten Populationen auftreten. Dies wurde beispielsweise auch bei den drei SNPs des β -Tubulin-Gens, die im Rahmen der BZ-Resistenz ermittelt wurden, beobachtet (James et al., 2009).

4.3.3 Quantitative Untersuchung der *Peqpgp-11* und *Peqpgp-16* Transkription bei Populationen unterschiedlicher ML-Suszeptibilität

Neben der Untersuchung auf resistenzassoziierte qualitative Veränderungen der Pgps galt es außerdem zu überprüfen, inwiefern sich die Resistenz auch in einer verstärkten Expression der Gene niederschlägt. Dies sollte insbesondere in Hinblick auf die bereits vorliegenden Erkenntnisse hinsichtlich der Beteiligung von *Pgp-11* an der Resistenz von *P. equorum* gegenüber den MLs erfolgen. Beobachtungen einer erhöhten Expression in Zusammenhang mit ML-Resistenz wurden bereits bei zahlreichen anderen Nematoden gemacht (Xu et al., 1998; Huang & Prichard, 1999; Prichard & Roulet, 2007; James & Davey, 2009; Dicker et al., 2011; Tompkins et al., 2011; Williamson et al., 2011; Yan et al., 2012; Ardelli & Prichard, 2013; De Graef et al., 2013b).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Eier verschiedener *P. equorum*-Populationen ergaben jedoch kein einheitliches Bild hinsichtlich einer veränderten konstitutiven Expression von *pgp-11* respektive *pgp-16*. Ein möglicher Grund liegt in der mangelnden oviziden Wirkung des IVM, die bei *A. suum* anhand des Effektes auf die Embryonierung und die Infektiosität beobachtet wurde (Boes et al., 1998) und die eine *Pgp*-vermittelte Entgiftung der Zelle daher nicht erforderlich erscheinen lässt. Auch die protektiven Eigenschaften der Eischale von Askariden tragen sicherlich zu der verminderten Anfälligkeit gegenüber MLs zu diesem Entwicklungszeitpunkt bei (siehe Kapitel 2.1.1.2). Diese verleiht dem Ei eine hohe Tenazität gegenüber physikalischen und chemischen Umweltfaktoren (Wharton, 1980). Durch den Verlust der Eischale während des Schlupfes verändert sich die Situation und der Organismus muss gegebenenfalls mithilfe anderer Mechanismen wie z. B. Pgps vor äußeren Noxen geschützt werden. Eine ähnliche Hypothese wurde auch nach dem Vergleich der konstitutiven Expression von neun Pgps zwischen einem resistenten und suszeptiblen *H. contortus*-Isolat aufgestellt (Williamson & Wolstenholme, 2012). Auch hier konnte kein Anstieg der Expression bei der infektiösen, nicht auf Nahrung angewiesenen L3 in der resistenten Population festgestellt werden. Es wurde vermutet, dass die Expression im Laufe des Entwicklungszyklus variiert und Entwicklungsstadien in Kompartimenten, die einer höheren Anthelminthikabelastung ausgesetzt sind, in einem stärkeren Ausmaß auf die Entgiftung durch Pgps angewiesen sind (Williamson & Wolstenholme, 2012). Auch die Ergebnisse einer Untersuchung des *PeqPgp-11*-Homologs von *O. volvulus* (*Pgp-1*) mit L3 bzw. adulten Würmern deuten in diese Richtung: Während *pgp-1* in den larvalen Stadien, die aus infizierten Kriebelmücken gewonnen wurden, nur in geringem Maß exprimiert wurde, war die *pgp-1*-Expression der adulten Würmer bei dem Vergleich zwischen den Entwicklungsstadien signifikant erhöht (Huang & Prichard, 1999). Eine stadienspezifische Suszeptibilität wurde zudem für andere Filarien beschrieben (de Silva et al., 1997). In Betracht gezogen werden sollte auch die Möglichkeit, dass unterschiedliche Entwicklungsstadien mit der Expression unterschiedlicher Pgps einhergehen. Dies erscheint insbesondere vor dem Hintergrund der hohen Anzahl dieser bei Nematoden anzutreffenden Proteine wahrscheinlich. Für *C. elegans* ist beispielsweise bekannt, dass nicht alle der 60 für ABC-Transporter kodierenden Gene in jedem Stadium exprimiert werden (Lespine et al., 2012). So zeigte *pgp-1* in frühen Entwicklungsstadien die stärkste Expression, wohingegen bei *pgp-2* ein konträres Expressionsmuster beobachtet wurde und bei *pgp-3* eine durchweg stabile Expression gemessen wurde. In den Dauerlarven zeigte sich die Expression dagegen in den drei untersuchten *pgps* konstant niedrig (Lincke et al., 1993). Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei der Untersuchung der konstitutiven Expression einzelner Pgps bei *T. circumcincta* festgestellt (Dicker et al., 2011).

4.3 Qualitativer und quantitativer Vergleich zwischen Pgps von *P. equorum* Populationen unterschiedlicher ML-Suszeptibilität und unterschiedlichen Entwicklungsstadiums

Für *H. contortus* und *O. ostertagi* wurde die Pgp-Aktivität sowohl auf der Eioberfläche als auch der Kutikula larvaler und adulter Stadien durch die Bindung Pgp-spezifischer Antikörper nachgewiesen. Eine nähere Bestimmung, um welche Pgps es sich dabei handelt, blieb leider aus (Riou et al., 2005; Pachnicke, 2009). Die durchflusszytometrische Analyse der gebundenen Antikörper ließ außerdem die Schlussfolgerung zu, dass die Anzahl der Pgps in IVM-resistenten *H. contortus*-Isolaten auf der Eischale zunimmt. Diese Eigenschaft ist allerdings mit einer hohen individuellen Varianz verbunden: Während für manche Eier eine hohe Antikörperbindung gemessen wurde, zeigten andere derselben resistenten Population eine Intensität vergleichbar mit der der suszeptiblen Eier (Kerboeuf et al., 2003b).

Im Gegensatz zu den Larven in der Eischale zeigten präadulte männliche und weibliche Individuen eine deutliche Korrelation zwischen dem Anstieg der konstitutiven Expression von *pgp-11* und dem Resistenzstatus. Gemeinsam mit den Ergebnissen der SeqDoC-Analyse verdichten sich somit die Hinweise darauf, dass Pgp-11 an einer verminderten Wirksamkeit von MLs bei *P. equorum* beteiligt ist. Auch bei *C. elegans* wurde eine erhöhte *pgp-11*-Expression in einem IVM-resistenten Stamm nach dem Kontakt mit IVM gemessen (Ardelli & Prichard, 2013). Für die nächsten Homologe von *PeqPgp-16* in *C. elegans* sind die Ergebnisse nicht so eindeutig: Während die Expression von *pgp-4* z. T. signifikant höhere Werte bei resistenten Stämmen im Vergleich zum Wildtypstamm aufwies, konnte dies nicht für *pgp-3* bestätigt werden (Yan et al., 2012; Ardelli & Prichard, 2013). Auch für *pgp-16* von *P. equorum* konnte kein Unterschied in der Expression festgestellt werden. Hierdurch wird die Vermutung, dass dieses Pgp-Homolog nicht an dem IVM-Resistenzgeschehen beteiligt ist, weiter bestärkt; aber auch die Hypothese einer stadienspezifischen Expression wird unterstützt.

Ergänzend zu der Untersuchung der konstitutiven Expression von Pgps, die mit Hilfe von Eiern verschiedener *P. equorum*-Populationen und präadulten Würmern unterschiedlicher Herkunft ermittelt wurde, sollte die Induzierbarkeit der Pgp-Expression durch die Inkubation adulter Würmer in einem IVM-haltigen Medium überprüft werden. Als Inkubationszeit wurde eine Dauer von 12 h gewählt. Hierfür gab es verschiedene Gründe: Eine möglichst lange Exposition der Würmer sollte annähernd die Verhältnisse der IVM-MRT im Pferd widerspiegeln (Angaben schwanken hier zwischen 2,3 und 7,3 d; siehe Kapitel 2.2.1.4) (Pérez et al., 1999; Gokbulut et al., 2001; Gokbulut et al., 2010). Aufgrund der nur schwer durchzuführenden *in vitro*-Kultivierung von *P. equorum* musste der Zeitraum gleichzeitig so gewählt werden, dass die mit dem Absterben der Würmer in Zusammenhang stehenden Prozesse, wie die RNA-Degradierung oder die Expression Agonie-assoziiierter Gene, nicht die Detektion gegebenenfalls vorhandener transkriptionaler Unterschiede der Pgps verhindern bzw. überlagern (Dicker et al., 2010; Koppelkamm et al., 2011). Nicht zuletzt musste auch die bei Nematoden nach der initialen Paralyse eintretende Hyperaktivitätsphase berücksichtigt werden (Ardelli et al., 2009). Diese wurde bei *C. elegans* nach dem Kontakt mit IVM beobachtet und verzerrt möglicherweise das eigentlich durch IVM hervorgerufene Transkriptionsprofil. Weder für *pgp-11* noch für *pgp-16* konnte jedoch ein Anstieg der induzierbaren Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne den Einsatz von IVM festgestellt werden. Inwiefern sich die Transkriptionsrate anderer MDR-Transporter unterscheidet, bleibt den Untersuchungen der ebenfalls auf Basis dieser Individuen durchgeführten Transkriptomanalyse vorbehalten (Krücken et al., unveröffentlicht). Ein ähnliches Ergebnis ergab auch die Untersuchung eines 3fach-resistenten *T. circumcincta*-Isolats nach einer fünfstündigen *in vitro*-Inkubation mit IVM: Resistenz-assoziierte Gene, wie Cytochrom P450 (Cyp450), GluClIs, nikotinerge ACh-Rezeptoren und mit einer Ausnahme auch die Pgps waren hier auffallend unterrepräsentiert (Dicker et al., 2010). Die Induktion einer Überexpression von *pgp-11* war dagegen bei einem IVM-resistenten Isolat von

C. oncophora sowohl nach der *in vivo*- (adulte Würmer) als auch nach einer 24-stündigen *in vitro*-Exposition (L3) mit IVM erfolgreich. Dagegen konnte bei diesem Parasiten für *pgp-11* keine Veränderung der konstitutiven Expression (Eier, L3, Adulte) festgestellt werden. Interessanterweise zeigte auch die Expressionsanalyse von *pgp-16* einen Anstieg nach Kontakt der L3 mit IVM sowohl bei dem suszeptiblen als auch bei dem resistenten Isolat (De Graef et al., 2013b).

Die Analyse des Promotors und der Gen-flankierenden Sequenzen ergab, dass es sich bei dem humanen *MDR1* um ein Haushaltsgen handelt. Zusätzlich zeigten Untersuchungen humaner Zelllinien, dass die Promotoraktivität in Zellen mit basaler Pgp-Expression durch Agenzien chemischer oder physikalischer Natur und durch physiologische Stimuli auch relativ kurzfristig induziert werden kann (i. d. R. nach 48-72 h) (Kantharidis et al., 2000). Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um sekundäre Reaktionen auf den durch beispielsweise Chemotherapeutika verursachten oxidativen zellulären Stress (Callaghan et al., 2008). Dieser wird durch Hypoxie und Glukosemangel hervorgerufen. Reaktive Sauerstoffspezies führen über verschiedene Signalwege zu einem Anstieg der Pgp-Expression (Nwaozuzu et al., 2003). Während die anhaltende Aktivierung dieser Signalwege zu einer Apoptose führt, wird die transiente als Ursache für die Transkription bestimmter Gene, so auch der der Pgps, angesehen (Callaghan et al., 2008). Bei Bakterien scheint dagegen die klassische Expressionsinduktion der MDR-Gene vorzuherrschen: Regulatorproteine binden direkt die Substrate der entsprechenden Transportproteine und steigern somit deren Synthese und schließlich den Transport der Substrate (Grkovic et al., 2001). Auf welchem Weg die Pgp-Expression bei Nematoden induziert wird, ist noch weitgehend ungeklärt (Lespine et al., 2008).

Die in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse lassen auf eine konstitutiv hohe Expression von *pgp-11* in späteren Entwicklungsstadien von *P. equorum* schließen, da die frühen Entwicklungsstadien (d. h. Eier) diese nicht zeigten bzw. diese sich nicht durch die Inkubation mit IVM provozieren ließ. Um diesen Sachverhalt vollständig abklären zu können, wäre eine vergleichende Analyse der Pgp-Expression larvaler Entwicklungsstadien im Ei und der Larven außerhalb der Eischale bzw. der adulten Würmer mit bekanntem Resistenzstatus erforderlich. Dies setzt jedoch aufgrund des Entwicklungszyklus und dem damit einhergehenden Fehlen freier larvaler Stadien, die nicht durch eine Eischale geschützt werden (Clayton, 1986), eine Sektion des betroffenen Wirtes voraus. Auch die Untersuchung des Pgp-Vorkommens auf der Eischale wäre interessant, wie sie beispielsweise bereits bei *H. contortus* durchgeführt wurde (Kerboeuf et al., 2003b). Um die stadienspezifische Expression bei *P. equorum* zu untersuchen, bieten sich außerdem die im Rahmen einer Transkriptomanalyse gewonnenen Daten von 24 *Contigs* von Pgp-Homologen an (Krücken et al., nicht veröffentlicht).

4.4 Untersuchung von *C. elegans* Loss-of-function-Mutanten hinsichtlich ihrer IVM-Suszeptibilität

4.4 Untersuchung von *C. elegans* Loss-of-function-Mutanten hinsichtlich ihrer IVM-Suszeptibilität

MLs beeinflussen durch ihre Bindung an Glutamat- und GABA-gesteuerte Cl-Kanäle den Nematodenorganismus auf verschiedene Weisen, da sie inhibierend auf die Pharynxpumpe, die Motilität und den Eilegeapparat wirken (Martin et al., 2002). Die Durchführung eines Entwicklungsassays bietet die Möglichkeit, Wirkstoffe insbesondere in Hinblick auf die erstgenannten Merkmale zu überprüfen, da sich sowohl eine verminderte Pharynxaktivität als auch eine reduzierte Motilität hemmend auf die weitere Entwicklung des Nematoden auswirken. Je nach Dauer der veranschlagten Entwicklungszeit kann auch der Einfluss auf den Eilegeapparat bestimmt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es u. a. das Ziel, (1) den Effekt des Funktionsverlustes eines einzelnen Pgps durch Deletion sowie (2) den Einfluss des Funktionsverlustes aller im *C. elegans* Genom kodierten Pgps durch Inhibition mittels VPL zu untersuchen. *C. elegans* bietet sich insofern für diese Fragestellung an, als dass verschiedene Institutionen (CGC, NBRP) die entsprechenden *Knock-out*-Stämme frei zur Verfügung stellen. Somit war es möglich, nahezu jedes der 14 aktiven Pgps einzeln auf seine spezifische Funktion hinsichtlich des IVM-Transports bei *C. elegans* zu überprüfen.

Die Entwicklung wurde ab der L1 gemessen, um die Beobachtung zu einem möglichst frühen Zeitpunkt zu beginnen. Eier, die häufig in Entwicklungsassays mit Trichostrongyliden eingesetzt werden, eignen sich insofern nur bedingt, als dass nicht gewährleistet werden kann, dass sämtliche Larven aufgrund der vorherigen Behandlung mit NaClO-Bleiche im Rahmen der Synchronisierung noch zum Schlupf fähig sind und verringerte Schlupfraten im Anschluss somit nicht eindeutig auf die Wirkung des IVMs zurückgeführt werden können. Einen weiteren Nachteil stellt die unterschiedliche Reife der Eier dar: Während ein Teil der in der Kultur vorhandenen Eier in der Entwicklung bereits weiter fortgeschritten ist, werden andere evtl. erst durch die Chlorbehandlung aus den adulten Würmern freigesetzt. Die Absenz von Nahrung in Form von *E. coli* stellt dagegen sicher, dass sich keine Larven über das Stadium der L1 hinaus entwickeln. Als weiterer Aspekt muss die fehlende ovizide Wirkung des IVM aufgeführt werden (Boes et al., 1998), wodurch die Einbeziehung der Eier bei diesem Assay hinfällig wird.

Um den durch Pgps vermittelten Transport zu hemmen und der damit einhergehenden Resistenz gegenüber Anthelminthika zu begegnen, gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten: Zum einen können Wirkstoffe zum Einsatz kommen, die sich nicht als Substrat dieser Proteine eignen. Zum anderen kann durch die gleichzeitige Gabe von Stoffen, die die Efflux-Aktivität der Pgps hemmen, der Transport von Anthelminthika verringert und somit ihre Wirksamkeit gesteigert werden. Die Hemmung kann durch eine kompetitive, nicht-kompetitive oder allosterische Blockade im Bereich der Substratbindungsstelle erfolgen, durch ein Eingreifen in die ATP-Hydrolyse oder durch die Veränderung der Integrität der Zellmembran (Amin, 2013). Um der Bedeutung eines Pgp-Inhibitors für die Wirksamkeit von Anthelminthika nachzugehen, wurde die Entwicklungsrate von *C. elegans* unter dem Einfluss von IVM in Kombination mit dem lange Zeit als Referenz verwendeten kompetitiven Pgp-Inhibitor VPL untersucht. Vergleichbare Untersuchungen eines LFIA bei *T. circumcincta* ergaben eine Reduktion des EC₉₉-Wertes um den Faktor 10 (Bartley et al., 2009). Für *C. oncophora* und *O. ostertagi* konnte im Rahmen eines LDA eine Reduktion des EC₅₀-Wertes um das 132- bzw. 316fache erzielt werden (Al Gusbi, 2011; Demeler et al., 2013). Im Gegensatz dazu kam es bei dieser Untersuchung zu einer 2,5- bzw. 2,6fachen Abnahme nach dem Aktivitätsverlust sämtlicher Pgps durch VPL verglichen mit dem nicht exponierten Wildtypstamm Bristol N2. Über die Gründe dieses überraschend geringen Effektes auf die Entwicklungsrate lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nur spekulieren; es scheint jedoch

offensichtlich, dass sich das hier verwendete VPL-Racemat nur bedingt für den Einsatz im Entwicklungsassay eignet, weshalb auf die zusätzliche Untersuchung des R(+)-Isomers von VPL verzichtet wurde. Dieses besitzt im Gegensatz zum Racemat keine Eigenschaften als Ca^+ -Kanalblocker, wodurch das Auftreten etwaiger nicht Pgp-assoziiierter Effekte auf die Entwicklung verringert wird (Lee & Tsien, 1983; Echizen et al., 1985; Ye & Van Dyke, 1988). Um diesem Sachverhalt weiter nachzugehen, könnte daher die Untersuchung der Effekte anderer Pgp-Inhibitoren mit höherer inhibitorischer Potenz von Interesse sein. Deren Entwicklung wurde in den letzten Jahren insbesondere durch die Suche nach einer geeigneten Strategie bei der Bekämpfung der MDR von Tumorzellen vorangetrieben. Basierend auf ihrer Spezifität, Toxizität und Bindungsaffinität erfolgt eine Einteilung in drei Kategorien. VPL wird, ebenso wie z. B. Cyclosporin A, Vincristin und Tamoxifen, zu den Pgp-Inhibitoren der ersten Generation gezählt (Thomas & Coley, 2003). Mitglieder dieser Gruppe von strukturell nicht miteinander verwandten Stoffen wurden ursprünglich aufgrund anderer Indikationen entwickelt und ihre Eigenschaft als Pgp-Substrat und kompetitiver Inhibitor erst später erkannt (Srivalli & Lakshmi, 2012). Aufgrund ihrer geringen Selektivität und Bindungsaffinität, die eine Dosierung im toxischen Bereich erforderlich macht (Krishna & Mayer, 2000), sowie ihrer Eigenschaft als Substrat anderer Transporter und Enzymsysteme, die zu unvorhersehbaren Interaktionen im Beisein des Chemotherapeutikums führen (Thomas & Coley, 2003), ist ihr Einsatz im klinischen Bereich jedoch nicht möglich. Dennoch leisteten diese Verbindungen bei der Entwicklung der Pgp-Inhibitoren der zweiten Generation einen wichtigen Beitrag. Zu diesen gehört neben anderen auch das VPL-Derivat Dexverapamil und das Cyclosporin D-Analogon Valspodar (PSC833) (Srivalli & Lakshmi, 2012). Diese Substanzen zeichnen sich im Vergleich zu ihren Vorläufermolekülen durch eine höhere Potenz und eine geringere Toxizität aus (Krishna & Mayer, 2000). Durch ihre Eigenschaft als Substrat des Cyp450-Isoenzym 3A4 kann es aber insbesondere bei der gleichzeitigen Gabe von Wirkstoffen, deren Abbau ebenfalls von diesem System abhängig ist, zu Nebenwirkungen kommen (Thomas & Coley, 2003), aufgrund derer auch dieser Gruppe der Eintritt zur therapeutischen Anwendung verwehrt blieb. Moleküle der dritten Generation vereinen dagegen eine hohe Potenz und Spezifität mit der Eigenschaft (Thomas & Coley, 2003), keine Interaktion mit dem Cyp450 3A4-System oder anderen ABC-Transportern einzugehen (Dantzig et al., 1999; Wandel et al., 1999). Im Gegensatz zu vielen Inhibitoren der ersten und zweiten Generation stellen diese meist keine kompetitiven Inhibitoren dar und unterliegen somit nicht dem Pgp-vermittelten Transport. So induziert die hochaffine Bindung von Tariquidar (XR9576), einem Anthranilamid-Derivat, eine Konformationsänderung des Pgp, welche ihrerseits die ATP-Hydrolyse und den Transport anderer Substrate aus der Zelle verhindert (Thomas & Coley, 2003). Der inhibitorische Effekt von Tariquidar konnte auch bereits bei verschiedenen Infektionserregern gezeigt werden. So wurde *in vitro* die Ciprofloxacin-Suszeptibilität in MDR-Transporter überexprimierenden Stämmen von *Staphylococcus aureus* erheblich gesteigert (Leitner et al., 2011). Auch die Tariquidar-Exposition von *Schistosoma mansoni* resultierte in einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Eiproduktion über mehrere Tage (Kasinathan et al., 2011). Neben der Kenntnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen sowie den Verfahren der kombinatorischen Chemie, mit deren Hilfe die Pgp-Inhibitoren entwickelt wurden, stellt das *de novo* Design von Inhibitoren auf der Grundlage der Kristallstruktur des *C. elegans* bzw. murinen Pgp ein nicht zu unterschätzendes Potential dar (Loo & Clarke, 2013). Auf deren Basis können unter Kenntnis der Aminosäuresequenz durch die Übertragung der homologen Strukturen detaillierte Modelle von Pgps anderer Organismen erstellt werden. Dies bietet die Möglichkeit der genauen Vorhersage von Substrat- bzw. Inhibitorbindungsstellen und kann somit einen

4.4 Untersuchung von *C. elegans* Loss-of-function-Mutanten hinsichtlich ihrer IVM-Suszeptibilität

wichtigen Beitrag bei der Entwicklung neuer, hochspezifischer Inhibitoren leisten (Srivalli & Lakshmi, 2012).

Dass ein Zusammenhang zwischen Pgps und IVM als deren Substrat besteht, zeigten die Untersuchungen der einzelnen Stämme mit einem Funktionsverlust von nur jeweils einem Pgp. Insgesamt konnte eine signifikante Zunahme der Suszeptibilität bei allen Stämmen festgestellt werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Pgps basierend auf der Veränderung ihrer EC₅₀-Werte in zwei Kategorien unterteilt: Die Mutation von *pgp-14*, *pgp-11*, *pgp-8*, *pgp-1*, *pgp-12*, *pgp-9* bzw. *pgp-3* ging mit einer moderaten Reduktion des EC₅₀-Wertes einher (2,4-4,3fache Abnahme des EC₅₀-Wertes). Die übrigen Pgps (*pgp-5*, *pgp-10*, *pgp-2*, *pgp-6/7*, *pgp-4*, *pgp-13*) beeinflussten die IVM-Suszeptibilität dagegen nur in geringem Maß (1,5-1,8fache Abnahme des EC₅₀-Wertes). Das einzige beschriebene Pseudogen bei *C. elegans* (*pgp-15*) zeigte wider Erwarten ebenfalls einen sehr geringen Effekt. Trotz der natürlichen Dysfunktion dieses Gens aufgrund einer 2 bp-großen Deletion kam es bei diesem Pgp zu einer signifikanten, wenn auch äußerst geringen Abweichung vom Wildtyp (1,1fache Abnahme des EC₅₀-Wertes). Eine mögliche Ursache hierfür ist eine weitere Mutation an anderer Stelle des Genoms, die ebenfalls die IVM-Suszeptibilität beeinflussen kann. Denkbar ist auch, dass es bei dem untersuchten *Knock-out*-Stamm aufgrund der 2256 bp-großen Deletion innerhalb *Pgp-15*-Gens (Allel *ok987*) zu Auswirkungen auf die anderen, ebenfalls auf diesem Chromosom gelegenen *Pgp*-Gene kommt. Eine grundsätzliche Beeinflussung der Fitness dieses Stammes, die auch bei den Negativkontrollen mit verminderten Entwicklungsraten einhergehen würde, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu führte wie eingangs erwähnt der Verlust von sieben Pgps zu einem mittelgradigen Anstieg der Empfindlichkeit. Ein Zusammenhang zwischen dem Einfluss auf die IVM-Suszeptibilität durch den *Pgp*-Verlust und der *Pgp*-Phylogenese konnte, mit einer Ausnahme, nicht hergestellt werden. Lediglich der Funktionsverlust der beiden eng miteinander verwandten Gene von *Pgp-1* und *Pgp-9* resultierte in ähnlichen Ergebnissen, da beide Pgps für eine moderate Zunahme der Suszeptibilität verantwortlich waren. Beiden Genen ist außerdem die Expression im Darm und im Pharynx gemein und für beide wurde eine Zunahme der Expression in IVM-resistenten *C. elegans*-Stämmen nach IVM-Kontakt gezeigt (Yan et al., 2012; Ardelli & Prichard, 2013). Für *Pgp-9* konnten diese Ergebnisse auch bei verschiedenen Trichostrongylidenarten (mit Ausnahme von *C. oncophora*) erzielt werden (Prichard & Roulet, 2007; Dicker et al., 2011; Williamson et al., 2011; Areskog et al., 2013), während bei *H. contortus* eine Abnahme der *pgp-1*-Expression zu verzeichnen war (Williamson et al., 2011).

Zu den größten Veränderungen kam es bei der Untersuchung des *pgp-14* Loss-of-function-Stammes. Dieser zeigte auch bei Expressionsuntersuchungen IVM-resistenter *C. elegans* Stämme eine signifikante Steigerung der Werte nach IVM-Kontakt (Yan et al., 2012; Ardelli & Prichard, 2013). Eine Prognose für parasitische Nematoden sollte jedoch unter Vorbehalt erfolgen, wie Untersuchungen an *H. contortus* zeigten: Hier ergab die Untersuchung mehrerer Pgps, u. a. auch die des *pgp-14*-Orthologs eines IVM-resistenten Isolats, keine signifikante Veränderung der konstitutiven Expression im Vergleich zum suszeptiblen Stamm (Williamson & Wolstenholme, 2012). Das *pgp-14*-Gen liegt gemeinsam mit den phylogenetisch eng verwandten *pgp-12*, *-13* und *-15* auf dem X-Chromosom, das außerdem sieben weitere *Pgp*-Gene kodiert (www.wormbase.org). Während der Verlust von *Pgp-12* im Entwicklungsassay eine mittelgradige Reduzierung des EC₅₀-Wertes zur Folge hatte, zeigte sich die IVM-Suszeptibilität durch den Funktionsverlust von *Pgp-13* nur geringfügig beeinflusst. Dieses Ergebnis macht die Unterschiede zwischen den einzelnen Pgps innerhalb einer phylogenetischen Gruppe insbesondere vor dem Hintergrund ihrer unmittelbaren Abfolge auf dem X-Chromosom deutlich, welche für eine gemeinsame Gen-Regulierung

spricht. Untersuchungen bei *C. elegans* und *H. contortus* bestätigten eine Beteiligung von *pgp-12* in Form von erhöhten Expressionsraten und veränderten Bewegungsprofilen des *pgp-12* defizienten Stammes in Gegenwart von IVM (Williamson et al., 2011; Yan et al., 2012; Ardelli & Prichard, 2013).

Ein ähnliches Bild zeichnet sich bei der Gruppe um *pgp-5*, *-6*, *-7* und *-8* ab: Auch hier sind die eng miteinander verwandten Gene unmittelbar nebeneinander auf dem X-Chromosom zu finden. Der *pgp-8* *Loss-of-function*-Stamm zeigte aber mit einem Anstieg der Suszeptibilität gegenüber IVM um den Faktor 3,2 eine deutliche Abweichung zu den beiden anderen Stämmen dieser Gruppe, die hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit nahezu identische Werte aufwiesen (*pgp-5* und *pgp-6/7*: Faktor 1,8). Der Vergleich mit Werten von *H. contortus* ist in diesem Fall aufgrund des Fehlens dieser Gruppe bei dieser Spezies nicht möglich (Williamson & Wolstenholme, 2012).

Ein nicht ganz so deutlicher Unterschied ist in der Gruppe von *pgp-3* und *-4* vorhanden, deren Mitglieder ebenfalls in direkter Nachbarschaft auf dem X-Chromosom zu finden sind. Trotz der unterschiedlichen Kategorisierung in gering und moderat unterscheidet sich der EC₅₀-Wert zwischen den beiden Pgps nur um den Faktor 1,5. Dieses Ergebnis ist v. a. auch für die Beobachtungen in Bezug auf *pgp-16* als entsprechendes Homolog in *P. equorum* von Belang. Auch für dieses Transportprotein erschlossen sich im Rahmen der hier erbrachten Untersuchungen keine Hinweise auf eine Beteiligung an dem Geschehen der ML-Resistenz. Dies lässt sich aber nicht auf die Homologe aller Nematoden übertragen. So zeigte *pgp-16* von *C. oncophora* zwar keinen Unterschied zwischen der konstitutiven Expression eines suszeptiblen und IVM-resistenten Isolats, ein Anstieg der Transkription ließ sich aber *in vitro* bei L3 induzieren (De Graef et al., 2013b). Untersuchungen von *pgp-3* und *-4* von *C. elegans* ergaben ein sehr heterogenes Bild, weswegen die Vergleichbarkeit nur eingeschränkt gewährleistet ist (Yan et al., 2012; Ardelli & Prichard, 2013). Interessant wäre in diesem Zusammenhang daher eine Untersuchung des CBG12969 von *C. briggsae*, dem nächsten Verwandten des *Peqpgp-16* in einem Modellorganismus.

Von übergeordnetem Interesse in Bezug auf die Bedeutung der in dieser Arbeit näher charakterisierten Pgps von *P. equorum* sind aber die Daten von *pgp-11*, da dieses Gen sich zum einen als sehr polymorph erwies und zum anderen eine erhöhte Expression in Zusammenhang mit IVM-Resistenz zeigte. Auch die Ergebnisse des Entwicklungsassays verwiesen auf eine Beteiligung dieses Gens beim IVM-Transport: Der Funktionsverlust führte bei *C. elegans* zu dem, abgesehen von dem von *pgp-14*, höchsten Anstieg der Suszeptibilität. Ardelli & Prichard (2013) beobachteten außerdem eine erhöhte Expression in einem resistenten *C. elegans* Stamm nach IVM-Exposition. Auch parasitische Nematoden wie *H. contortus* und *C. oncophora* sind scheinbar auf die Entgiftung durch dieses Protein angewiesen, da sie *in vitro* und/oder *in vivo* mit einer erhöhten Expression auf den Kontakt mit IVM reagierten (Prichard & Roulet, 2007; De Graef et al., 2013b). Im Gegensatz zu einem Großteil der anderen Pgps von *C. elegans* liegt *pgp-11* isoliert auf dem Chromosom 2 und zeigte auch im phylogenetischen Vergleich nur geringe Ähnlichkeiten zu anderen Pgps. Seine Konzentration auf Gewebe mit ausscheidender Funktion wie Darm, rektale Drüsenzellen und Exkretionssystem unterstreicht seine Bedeutung für die Entgiftung bei *C. elegans* (McKay et al., 2003; Zhao et al., 2004).

Inwiefern sich die hier generierten Daten eines freilebenden Nematoden auch auf parasitische Nematoden übertragen lassen, ist schwer einzuschätzen, da auch die limitierenden Faktoren bei der Verwendung von *C. elegans* als Modell zu berücksichtigen sind. Wie schon an der unterschiedlichen Anzahl an Pgp-Genen im Genom bei den Nematoden deutlich wird, ergibt sich bereits bei dem eingeschränkten Vorkommen von Homologen zwischen freilebenden und parasitischen Nematoden eine Problematik, die sich auch bei einem Vergleich innerhalb der

4.4 Untersuchung von *C. elegans* Loss-of-function-Mutanten hinsichtlich ihrer IVM-Suszeptibilität

parasitischen Nematoden wiederfindet (Geary & Thompson, 2001) (siehe Kapitel 2.1.2.4.2). Besonders die unterschiedlichen Lebensumstände eines im Labor unter optimalen Bedingungen gehaltenen Organismus auf der einen Seite und eines im Wirt unter wechselnden Stressoren (z. B. durch Veränderungen des pH-Wertes oder des Sauerstoffpartialdrucks sowie durch die Immunantwort des Wirtes und mögliche Zwischenwirte etc.) stehenden Organismus auf der anderen Seite dürften eine hinreichende Begründung für unterschiedliche Empfindlichkeiten zwischen den Spezies aber auch zwischen unterschiedlichen Entwicklungsstadien sein (Geary & Thompson, 2001; James et al., 2009). Dies steht auch in Einklang mit der Hypothese, dass bei den intestinalen Entwicklungsstadien parasitischer Nematoden der paralytische Effekt der MLs auf die somatische Muskulatur durch die dadurch bedingte Ausscheidung an Bedeutung gewinnt, während die bei *C. elegans* beobachtete hohe Pharynxsensitivität keinen Einfluss zu haben scheint (Sheriff et al., 2005; Ardelli et al., 2009). Darüber hinaus wird die Vergleichbarkeit möglicherweise durch die Tatsache beeinflusst, dass bei *C. elegans* die Selektion auf ein spezielles Zielgen mit Hilfe eines Mutagens erfolgte, während die Selektion bei parasitischen Nematoden im Feld i. d. R. auf Grundlage einer hohen genetischen Variation beruht. So besteht die Möglichkeit, dass bei Letzteren, u. U. auch in Abhängigkeit vom Toxin, mehrere Mechanismen ineinandergreifen und den Wurm schützen (Lespine et al., 2012). Dies erklärt u. U. auch den zwar signifikanten, aber dennoch vergleichsweise geringen Effekt durch den Verlust einzelner Pgps (durchschnittlich um den Faktor 2,5). Es lässt die Vermutung zu, dass für eine stark ausgebildete Resistenz Mutationen in verschiedenen Genen erforderlich sind und die Hemmung eines einzelnen Gens die Expression eines anderen Transporters induziert (Ardelli, 2013). Für *C. elegans* wird beispielsweise vermutet, dass nur die Mutation von 6.000 der ungefähr 20.000 Gene zu einem erkennbaren, letalen oder sterilen Phänotypen führt (Jorgensen & Mango, 2002). Neben Pgps und Veränderungen der Glutamat- und GABA-gesteuerten Ionenkanäle wurde eine verminderte Suszeptibilität ebenfalls bei der Veränderung von Innexinen sowie bei Dyf-Mutanten beobachtet (Gilleard, 2006). Auch eine homologe Redundanz ist wahrscheinlich, zum einen aufgrund der hohen Anzahl von Pgps und zum anderen bedingt durch die benachbarte Lage von Pgp-Genen auf den Chromosomen, die wahrscheinlich aus Genduplikationen hervorgegangen sind. Ein entsprechender Phänotyp würde in diesem Fall erst nach der Mutation von zwei oder mehr Pgps sichtbar (Jorgensen & Mango, 2002). Unterstützt wird diese Theorie durch Beobachtungen an IVM-resistenten Stämmen von *C. elegans*. Diese zeigten nach der Mutation dreier Gene (*avr-14*, *avr-15*, *glc-1*) eine starke Zunahme der AVM-Resistenz (~4000fach). Wurden dagegen nur zwei dieser Gene verändert, führte dies lediglich zu einem Anstieg der Resistenz um den Faktor 1,3 bzw. 12,5 oder hatte keinen Einfluss auf die Suszeptibilität (Dent et al., 2000). Ähnliche Werte wurden auch für die Trichostrongyliden ermittelt (Gill & Lacey, 1998). Insgesamt lässt dies auf eine hohe Komplexität für die Ausbildung einer IVM-Resistenz schließen (Gilleard, 2006).

Nichtsdestotrotz stellt die Verwendung dieses Modellorganismus eine der wenigen experimentellen Methoden dar, bestimmte Fragestellungen vergleichend einzuschätzen bzw. zu bewerten. Hierzu gehört auch die Untersuchung zur Beteiligung einzelner Pgps an der Entgiftung bei Nematoden, deren *in vitro*-Kultivierung aus verschiedenen Gründen nicht möglich ist. Ob tatsächlich noch andere Mechanismen an der Entwicklung einer IVM-Resistenz bei *P. equorum* beteiligt sind, kann nur die Untersuchung weiterer Kandidatengene klären oder aber ein genomweiter Ansatz zeigen.

4.5 Funktionale Expression von *PeqPgp-11* in einem *C. elegans*-Stamm mit *pgp-11* *Loss-of-function*-Mutation (tm-0333)

Die Transformation eines Modellorganismus stellt häufig die einzige Möglichkeit dar, die Funktion von Genen parasitischer Nematoden zu überprüfen (James et al., 2009). Die Wahl des hierfür verwendeten Modells spielt hierbei eine entscheidende Rolle. So impliziert dies eine gewisse Übereinstimmung biologischer Gegebenheiten, um die Funktion des Proteins in einem adäquaten System untersuchen zu können (Grant, 1992). *C. elegans* hat sich bereits in zahlreichen Studien als äußerst nützliches heterologes Transformationssystem für die funktionelle Expression von Genen verschiedener parasitischer Nematoden erwiesen (Daurio & Leaning, 1989). Dies gilt auch für Untersuchungen zur Anthelminthikasuszeptibilität (Grant, 1992; Kwa et al., 1995; Welz et al., 2011; Miltsch et al., 2012). Von Vorteil ist, dass theoretisch jede DNA injiziert werden kann, da für die Erzeugung transgener Linien keine *C. elegans*-spezifischen Sequenzen erforderlich sind (Bürglin et al., 1998).

Die Injektion von Plasmid-DNA in die synzytiale Keimbahn von adulten Hermaphroditen des *pgp-11* *Loss-of-function*-Stammes (tm-333) von *C. elegans* ermöglichte die Generierung dreier transgener Linien (Janssen et al., nicht veröffentlicht). Zwei Linien (B, D) übertrugen erfolgreich ein Plasmidkonstrukt bestehend aus den Sequenzen der *C. elegans* *pgp-11* Promotorregion, dem *pgp-11* von *P. equorum* sowie der 3'-UTR des *unc-54* von *C. elegans*. Die verwendete *pgp-11*-Sequenz wies den resistenten Genotyp auf, d. h. an allen drei Positionen lag ein Basenaustausch vor. Zusätzlich konnte ein Kontrollstamm ohne *Peqpgp-11* erzeugt werden. Die Detektion erfolgreich transformierter Individuen wurde durch die Koinjektion eines *gfp*-kodierenden Plasmids ermöglicht, dessen Expression den Pharynx unter Blaulicht grün fluoreszieren ließ. Zusätzlich wurde die erfolgreiche *Pgp*-Expression mittels PCR überprüft. Die Übertragungsrate der extrachromosomalen DNA betrug durchschnittlich 63,9 % (Linie B), 83,5 % (Linie D) bzw. 45,2 % (Kontrollstamm), wie anhand der *gfp*-Expression ermittelt wurde.

Transgene Tiere dieser semistabilen Linien wurden im Anschluss in einem Bewegungsassay (*Thrashing*-Assay) unter der Einwirkung von IVM eingesetzt, um die Funktionalität von *pgp-11* zu überprüfen. Die Durchführung eines Entwicklungsassays war in diesem Fall nicht möglich, da die hierfür erforderliche Anzahl transgener Würmern aufgrund der semistabilen Plasmidübertragung nicht zur Verfügung stand. Bei dem *Thrashing*-Assay wurden die Schwimmbewegungen pro Minute einzelner adulter Würmer bestimmt. Dieses Entwicklungsstadium wurde gewählt, um mögliche Unterschiede in der Bewegungsaktivität aufgrund unterschiedlicher Reifegrade infolge einer IVM-bedingten Entwicklungshemmung zu minimieren. Die hier gewählte Inkubationszeit betrug 18 h, um die durch IVM hervorgerufene Hyperaktivitätsphase bei *C. elegans* nicht in die Untersuchung miteinzubeziehen (Ardelli et al., 2009). Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Schwimmbewegungen ausgezählt. Der Vorteil gegenüber der Bestimmung der Bewegungsaktivität auf halbfesten Medien (i. d. R. Agar) liegt darin, dass die Würmer sich in flüssiger Umgebung in einer höheren Frequenz (für den Wildtyp ca. 150/min) fortbewegen (Miller et al., 1996). Dieses Verhalten zeigen gesunde Würmer so lange, bis sie entweder zurück auf eine feste Phase überführt werden oder die Energievorräte aufgebraucht sind. Auch andere Faktoren (wie z. B. Anthelminthika), die die neuromuskulären Funktionen beeinträchtigen, können diesen Parameter beeinflussen und auf diese Weise auf ihre Wirkung untersucht werden (Nazir et al., 2010). Wie auch für den Entwicklungsassay kann hier ebenfalls von einer homogeneren Verteilung des Wirkstoffes im flüssigen Medium ausgegangen werden, als dies bei der Verwendung eines halbfesten Stoffes der Fall wäre. Anhand der auf diese Weise ermittelten Daten konnte bei beiden transgenen Linien ein

4.5 Funktionale Expression von PeqPgp-11 in einem C. elegans-Stamm mit pgp-11 Loss-of-function-Mutation (tm-0333)

signifikanter Anstieg ($p < 0,0001$) des für die Hemmung der Bewegungsaktivität erforderlichen EC_{50} -Wertes von IVM beobachtet werden (Linie B: 4,123fach, Linie D 4,63fach). Für die weitere und vertiefende Analyse empfiehlt sich die Etablierung eines automatisierten Verfahrens (Buckingham & Sattelle, 2009), welche aufgrund der zeitlichen Terminierung im Rahmen dieses Projektes nicht erfolgen konnte. Ein entsprechendes Vorgehen würde zum einen erlauben, eine höhere Anzahl von Individuen pro IVM-Konzentration miteinzubeziehen und zum anderen könnten auf diese Weise leichter mehrere IVM-Konzentrationen auf ihren Effekt hin untersucht werden. Dennoch konnte mithilfe dieser initialen Ergebnisse gezeigt werden, dass sich die weitere Untersuchung in diese Richtung empfiehlt.

4.6 Schlussfolgerung und mögliche Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse lassen mehrere Schlussfolgerungen hinsichtlich der Bedeutung der beiden untersuchten Pgps bei der Resistenzentwicklung gegenüber MLs zu (Abbildung 6): Einerseits lassen sie auf eine Beteiligung von Pgp-11 schließen, während Pgp-16 bei den hier untersuchten Populationen offenbar keine Bedeutung zukommt. Dies zeigte sich an der unterschiedlichen Anzahl an putativ mit ML-Resistenz assoziierten Polymorphismen beider Gene sowie an den unterschiedlichen Transkriptionsprofilen in Abhängigkeit des Resistenzstatus. Die ML-Empfindlichkeit kann sowohl durch Veränderungen in der Primärstruktur als auch durch einen Anstieg der Expression von *pgp-11* verringert werden. Die Lokalisation der drei putativ mit IVM-Resistenz assoziierten SNPs innerhalb oder in der Nähe der vermeintlichen Substratbindungsstelle unterstreicht, neben ihrem Auftreten in Abhängigkeit von der ML-Suszeptibilität, außerdem ihre Bedeutung. Die gefundenen Unterschiede lassen außerdem auf einen Einfluss des Entwicklungsstadiums auf die Expressionsrate schließen. Ferner wurden im Kontext mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen artspezifische Unterschiede aber auch Gemeinsamkeiten deutlich.

Um jedoch eine weitergehende Einschätzung über die funktionelle Bedeutung für die Transporteigenschaften oder die alleinige Eignung des SNPs als Resistenzmarker abgeben zu können, bietet sich die Arbeit mit rekombinantem *P. equorum* Pgp-11 von Populationen unterschiedlicher ML-Suszeptibilität an. Nicht außer Acht gelassen werden sollte in diesem Zusammenhang daher die Möglichkeit, dass sich die Substitutionen lediglich in der Nähe des eigentlich unter Selektion stehenden Locus befinden und nicht ursächlich an der Resistenz beteiligt sind (Gilleard, 2006). Dies würde einer Verwendung in der Resistenzdiagnostik aber nicht zwangsläufig im Wege stehen (von Samson-Himmelstjerna & Blackhall, 2005; Prichard et al., 2007). Die Tauglichkeit als Resistenzmarker steht in engem Zusammenhang mit der Rekombinationsrate und der Entfernung von der eigentlichen Resistenzmutation. Bisher gibt es kaum Untersuchungen dazu, wie weit diese beiden Stellen auseinander liegen dürfen (Gilleard & Beech, 2007). Es wird jedoch aufgrund von Beobachtungen bei *Haemonchus placei* davon ausgegangen, dass eine Verwendung des assoziierten SNPs als Marker grundsätzlich möglich ist, sofern beide Polymorphismen innerhalb des für die Resistenz verantwortlichen Gens lokalisiert sind und keine Trennung infolge von Rekombination erfolgt (Gilleard & Beech, 2007). Eine weitere Einschränkung besteht in der Möglichkeit, dass die für die Resistenz verantwortliche Mutation in den verschiedenen Populationen unabhängig erworben wurde und somit nicht zwangsläufig mit einem Marker in Zusammenhang steht. Aus diesem Grund müssen die hier beschriebenen Ergebnisse noch unter Vorbehalt betrachtet werden und sollten als Grundlage weiterer Untersuchungen mit anderen *P. equorum*-Populationen dienen.

Die besondere Bedeutung, die Pgp-11 für den Transport von IVM bei *P. equorum* hat, wurde darüber hinaus auch bei der vergleichenden Analyse seines Homologs bei Pgp-Knock-out Mutanten von *C. elegans* herausgestellt. Der Verlust seiner Aktivität wirkte sich in besonderem Maß auf die weitere larvale Entwicklung aus. Weitere Pgps, die mithilfe von *C. elegans* auf ihren Einfluss auf die IVM-Suszeptibilität untersucht wurden, zeigten teilweise einen nur geringen Effekt. Im Gegensatz zu Pgp-11 ist ihre Entstehung höchstwahrscheinlich auf Genduplikation zurückzuführen, welche z. T. zu einer regelrechten Clusterbildung geführt hat. Aus diesem Grund würde sich eine entsprechende Untersuchung des simultanen Funktionsverlustes aller Mitglieder der jeweiligen Gruppen etwa durch RNAi anbieten. Der gleichzeitige Verlust der Funktionalität aller Pgps bei *C. elegans*, welcher durch die Anwendung von VPL erzielt wurde, war mit einem überraschend geringen Effekt auf die

4.6 Schlussfolgerung und mögliche Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen

IVM-Suszeptibilität verbunden. Dieser lässt sich wahrscheinlich auf die vergleichsweise geringe Potenz dieses Pgp-Inhibitors zurückführen. Durch die intensive Suche nach geeigneten Pgp-Modulatoren im Bereich der Krebsforschung wurden in den letzten Jahren zahlreiche neue Verbindungen hoher Potenz und Spezifität entwickelt, deren mögliche Einsatzfähigkeit bei vorhandener Anthelminthikaresistenz noch weitestgehend unbekannt ist. In diesem Zusammenhang könnte auch von Interesse sein, inwiefern diese Verbindungen Unterschiede hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zeigen, insbesondere auch in Hinblick auf der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Bedeutung von Pgp-11.

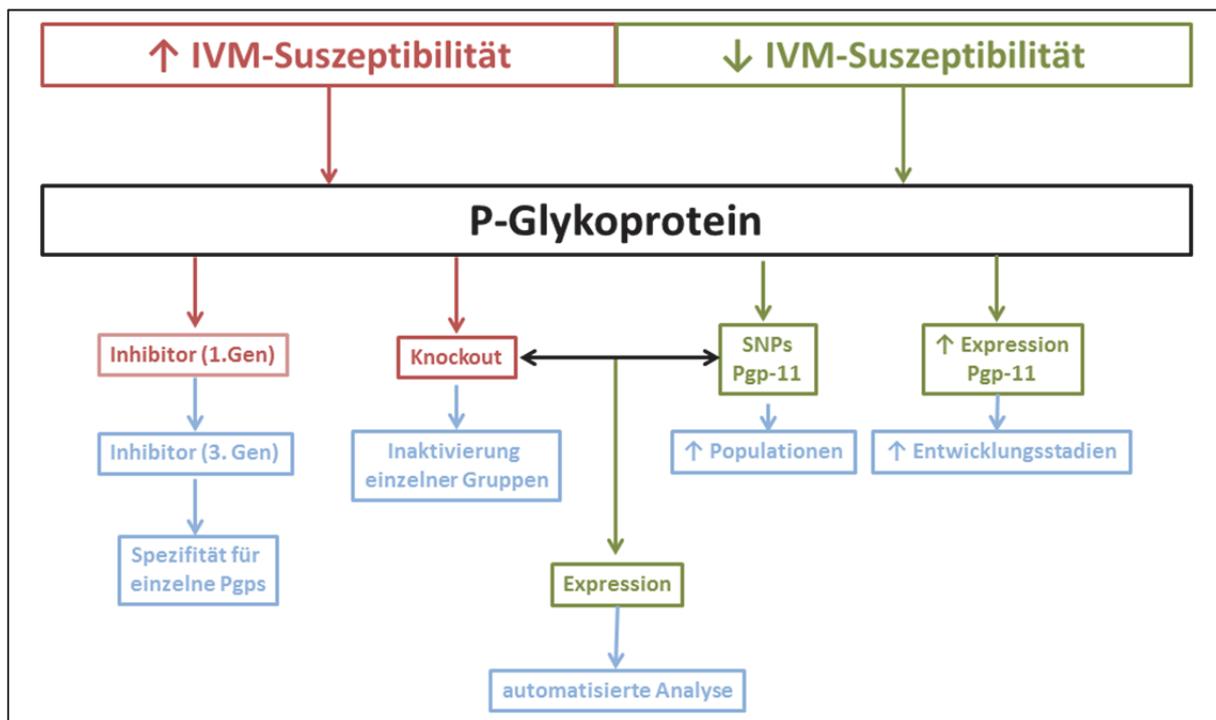


Abbildung 6: Flussdiagramm von Faktoren, für die ein erhöhter (rot) bzw. verminderter Zusammenhang mit Ivermectin-Suszeptibilität (grün) bei Pgp-11 ermittelt wurde und für die sich eine zukünftige Untersuchung empfiehlt (blau)

4 DISKUSSION

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Bedeutung von P-Glykoprotein assoziierten Mechanismen der Resistenz gegenüber makrozyklischen Laktonen beim Pferdespulwurm *Parascaris equorum*

Dem Einsatz von Anthelminthika wie den makrozyklischen Laktonen (MLs) kommt in der Tierhaltung eine bedeutende Rolle zu und ein Verlust ihrer Wirksamkeit kann neben den mit der Infektion verbundenen gesundheitlichen Beeinträchtigungen hohe wirtschaftliche Einbußen nach sich ziehen. Da mittelfristig nicht mit der Einführung neuer Antiparasitika zu rechnen ist, sollte auf den Erhalt der verfügbaren Anthelminthika ein besonderes Augenmerk gelegt werden. Die Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis der zugrundeliegenden Resistenzmechanismen. Zu diesen ist im Fall der ML-Resistenz insbesondere die Aktivität der P-Glykoproteine (Pgps) zu zählen, die der Superfamilie der *ATP-Binding-Cassette* (ABC)-Transporter angehören. Die in die Membran integrierten Proteine dienen dem aktiven Transport von Molekülen und Veränderungen ihrer Struktur oder Anzahl können infolge der verminderten Verfügbarkeit am Wirkort die Effizienz eines Wirkstoffes beeinträchtigen. Bei dem zur Gruppe der MLs gehörenden Ivermectin (IVM) wurde die Eigenschaft als Pgp-Substrat bereits bei Säugerzellen nachgewiesen. IVM findet breite Anwendung bei der Behandlung parasitärer Infektionen, zu denen auch die Parascariose, eine Jungtiererkrankung der Equiden, gehört. Bei dem Erreger handelt es sich um einen Parasiten des Dünndarms, der hier zu Obstruktionen mit Todesfolge führen kann. Die Bekämpfung dieses weltweit z. T. mit hohen Prävalenzen anzutreffenden Parasiten wurde in den letzten Jahren zunehmend durch das Auftreten von Resistenzen gegenüber IVM erschwert. Die molekularen Hintergründe hierfür sind noch weitgehend ungeklärt und auch für die Diagnose resistenter Populationen sind keine Verfahren standardisiert.

Aufgrund der Beobachtungen an anderen Nematoden hinsichtlich eines Zusammenhanges zwischen Pgps und der Resistenz gegenüber MLs wurden die vollständigen Sequenzen zweier putativer Pgps von *P. equorum* mit Hilfe degenerierter Primer und einer anschließenden RACE-PCR gewonnen. Phylogenetische Untersuchungen offenbarten diese als Orthologe von *Caenorhabditis elegans* Pgp-11 (*PeqPgp-11*) bzw. des nicht näher benannten Pgp CBG12969 von *Caenorhabditis briggsae* (*PeqPgp-16*). Die Aminosäuresequenzen beider Proteine weisen die Pgp-typischen Motive auf, die an der Substrat- und ATP-Bindung beteiligt sind. Der Vergleich einzelner Gewebe hinsichtlich ihrer Pgp-Expression mittels *Real-time-RT-PCR* ergab, dass die *PeqpPgp-11*-Expression im Darm männlicher und weiblicher Individuen signifikant gegenüber den restlichen untersuchten Geweben erhöht war, wohingegen sich der Hautmuskelschlauch für *PeqpPgp-16* als das Gewebe der stärksten Expression erwies.

Um mögliche Veränderungen, die mit der IVM-Resistenz bei *P. equorum* einhergehen, zu untersuchen, wurden außerdem die Pgp-Sequenzen mehrerer Populationen mit unterschiedlicher IVM-Suszeptibilität miteinander verglichen. Für *PeqPgp-11* wurden im Rahmen einer SeqDoC-Analyse drei Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) ermittelt (Asp931Asn, Cys951Ser, Tyr978His), die jeweils zu einer Aminosäuresubstitution führten und mit der IVM-Suszeptibilität der Populationen korrelierten. Die quantitative Untersuchung zur Expression beider Pgps bei Eiern ließ dagegen keinen Schluss auf einen Zusammenhang mit dem Resistenzstatus zu. Als weiteres Entwicklungsstadium wurden präadulte Würmer in die Untersuchungen miteinbezogen: Eine Gruppe von Würmern mit verminderter IVM-Suszeptibilität zeigte eine signifikant höhere Expression von *pPgp-11* gegenüber einer zufällig gewählten Gruppe.

Neben diesen deskriptiven Beobachtungen an *P. equorum* wurde außerdem die Beteiligung der Pgps am Entgiftungsprozess bei dem Modellorganismus *C. elegans* untersucht, erstens, um Aussagen über den gleichzeitigen Verlust der Funktionalität sämtlicher Pgps am lebenden Organismus treffen zu können und zweitens, um die Bedeutung einzelner Pgps für den IVM-Transport vergleichend darstellen zu können. IVM führte in Gegenwart des Pgp-Hemmers Verapamil zu einer geringen aber signifikanten Abnahme des EC₅₀-Wertes (~2,5fach) gegenüber dem Wildtypstamm Bristol N2, wie sich anhand von verminderten Entwicklungsraten zeigte. Der Funktionsverlust einzelner Pgps ging dagegen mit einer Reduktion des EC₅₀-Wertes um den Faktor 1,5-4,3 einher. Neben Pgp-14 zeigte der Verlust der *pgp-11*-Aktivität die größten Auswirkungen auf die Entwicklung.

Die im Laufe dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sprechen für die Beteiligung der Pgps an der Resistenz gegenüber IVM bei Nematoden. Dies wird sowohl anhand der Zunahme der Suszeptibilität nach dem Funktionsverlust einzelner bzw. aller Pgps bei *C. elegans* deutlich, als auch durch strukturelle und quantitative Veränderungen des Proteins in Abhängigkeit vom Resistenzstatus bei *P. equorum*. Eine besondere Rolle spielte in beiden Fällen *pgp-11*, dessen SNPs bei *P. equorum* vielversprechende Kandidaten für die Resistenzdiagnostik darstellen. Die Beurteilung ihrer Eignung erfordert die Untersuchung weiterer Spulwurmpopulationen mit bekanntem Resistenzstatus. Um diese zu erleichtern, wurde für zwei der drei SNPs bereits erfolgreich ein Pyrosequenzierungs-Assay etabliert. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, die Bedeutung dieser SNPs durch die vergleichende heterologe Expression von *Pgp-11* des suszeptiblen und des vermeintlich resistenten Genotyps in einem Modellorganismus zu ermitteln. Als solcher bietet sich aus vielerlei Hinsicht *C. elegans* an, u. a. auch, weil ein entsprechender *pgp-11 Loss-of-function*-Stamm, der die Durchführung eines *Rescues* erlaubt, hinsichtlich seiner IVM-Suszeptibilität schon näher charakterisiert wurde. Aus diesem Grund wurden bereits transgene Linien, die das *PepPgp-11* des vermeintlich resistenten Genotyps exprimieren, sowie eine Kontrolllinie erzeugt. Erste vergleichende Analysen zwischen diesen verschiedenen Linien führten zu vielversprechenden Ergebnissen.

6 SUMMARY AND OUTLOOK

Investigation of P-glycoprotein associated mechanisms of resistance to macrocyclic lactones in the horse roundworm *Parascaris equorum*

Anthelmintics such as the macrocyclic lactones (MLs) are of special importance for healthcare in animal husbandry. A loss of their efficacy might cause damages of health due to infections resulting in significant adverse economic effects. As the introduction of new anti-parasitics cannot be expected in the medium-term, preservation of existing effective anthelmintics should be of special interest. This requires the knowledge of underlying resistance mechanisms in parasites. ML-resistance is supposed to be a result of the activity of Pgps which belong to the ATP-binding-cassette (ABC)-superfamily of transporters. Expressed in cell-membranes, Pgps mediate the ATP-dependent transport of molecules. Therefore, changes in morphology or expression might result in reduced availability of drugs at their target-site followed by a decreased drug efficacy. The ML ivermectin (IVM) is an excellent Pgp-substrate which was demonstrated in mammalian cells. It is widely used in treatment of parasitic infections as e. g. of *Parascaris equorum*, affecting predominantly young equines. Adult stages of *P. equorum* are found in the small intestine where obstruction may lead to rupture of the intestinal wall and death. Recently, the worldwide occurrence of this nematode with its sometimes high prevalence was accompanied by cases of IVM-resistance. Unfortunately, the molecular background of this process remains largely unclear and appropriate techniques for detection of ML-resistance in *P. equorum* are not standardised yet.

In this work, complete sequences of two putative *P. equorum* Pgps were generated using degenerated primers and a following RACE-PCR based on observations in other nematodes concerning the contribution of Pgps in ML-resistance. By phylogenetic analysis these were identified orthologs of *Caenorhabditis elegans* Pgp-11 (*PeqPgp-11*) and an unnamed Pgp of *Caenorhabditis briggsae* CBG12969 (*PeqPgp-16*). Amino acid sequences of both proteins contained Pgp-specific motifs which are known to be involved in drug- and ATP-binding. Comparison of *pgp*-expression between tissues was conducted by quantitative real-time PCR. *Peqpqp-11* was found to be significantly higher expressed in the gut of both genders, in contrast to *Peqpqp-16* which was predominantly expressed in the body wall.

In order to detect changes associated with IVM-resistance in *P. equorum*, Pgp-sequences of populations with different ML-susceptibility were compared. SeqDoC-analysis revealed three single nucleotide polymorphisms (SNPs) which correlated with decreased ML-susceptibility and caused a substitution of the corresponding amino acid (Asp931Asn, Cys951Ser, Tyr978His) in *PeqPgp-11*. No resistance associated differences in mRNA expression levels were detected between embryonated eggs of the same populations. Furthermore, pre-adult worms were included in investigations, where a group of worms with reduced IVM susceptibility showed statistically significant overexpression of *Peqpqp-11* compared to a randomly selected group.

Apart from these descriptive observations for *P. equorum*, the contribution of Pgps in detoxification was also investigated in the model nematode *C. elegans*, first, to analyse the consequences of general inhibition of Pgp-activity in a living organism and second, to assess the importance of single Pgps for the IVM-transport. In presence of the Pgp-inhibitor Verapamil, the EC₅₀-value was decreased little but significantly by 2.5fold compared to the *C. elegans* wildtype Bristol N2 strain, which was found in terms of a reduced development rate of *C. elegans*. However, loss-of-function strains missing a single Pgp were hallmarked by

6 SUMMARY AND OUTLOOK

decreased EC_{50} -values between the 1.5- and 4.3fold. Apart from *Pgp-14*, loss of *Pgp-11* activity showed the greatest impact on development.

In summary, the results of the present work underline the hypothesis of a contribution of Pgps to IVM-resistance in nematodes. This becomes apparent in an increase of IVM-susceptibility in *C. elegans* strains either missing only a single Pgp or affected by the total loss of Pgp-activity, respectively, as well as in morphological and quantitative changes of the protein in dependence of the resistance level. In both cases, Pgp-11 was of particular importance, showing SNPs which are promising diagnostic candidates for detection of ML-resistance in *P. equorum*. To evaluate their suitability, further populations with known phenotypic resistance levels have to be investigated. This will be facilitated by the establishment of a pyrosequencing assay for two of the three SNPs. Furthermore, heterologous expression in a model organism of the susceptible and the presumably resistant genotype of Pgp-11 might enlighten their role. This might be conducted in *C. elegans*, since a *pgp-11* loss-of-function strain for rescue experiments is already characterised more closely regarding its IVM-susceptibility. For that reason, transgenic lines, containing *PeqPgp-11* of the presumably resistant genotype and a control line were generated. First results of comparative analyses between these different lines produced encouraging results.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Accardi, MV, Beech, RN & Forrester, SG (2012): Nematode cys-loop GABA receptors: biological function, pharmacology and sites of action for anthelmintics. *Invert Neurosci* 12(1), 3-12.
- Adelsberger, H, Scheuer, T & Dudel, J (1997): A patch clamp study of a glutamatergic chloride channel on pharyngeal muscle of the nematode *Ascaris suum*. *Neurosci Lett* 230(3), 183-186.
- Ahringer, J, ed. (2006). Reverse genetics. *WormBook* ed. The *C. elegans* Research Community. von <http://www.wormbook.org>.
- Al Gusbi, S (2011): Analysis of putative inhibitors of anthelmintic resistance mechanisms in cattle gastrointestinal nematodes. Freie Universität Berlin. Doctoral PhD-Thesis
- Albers-Schönberg, G, Arison, BH, Chabala, JC, Douglas, AW, Eskola, P, Fisher, MH, Lusi, A, Mrozik, H, Smith, JL & Tolman, RL (1981): Avermectins. Structure determination. *J Am Chem Soc* 103(14), 4216-4221.
- Albonico, M, Engels, D & Savioli, L (2004): Monitoring drug efficacy and early detection of drug resistance in human soil-transmitted nematodes: a pressing public health agenda for helminth control. *Int J Parasitol.* 34(11), 1205-1210.
- Aller, SG, Yu, J, Ward, A, Weng, Y, Chittaboina, S, Zhuo, R, Harrell, PM, Trinh, YT, Zhang, Q, Urbatsch, IL & Chang, G (2009): Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323(5922), 1718-1722.
- Altschul, SF, Gish, W, Miller, W, Myers, EW & Lipman, DJ (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3), 403-410.
- Álvarez-Sánchez, MA, Pérez-García, J, Cruz-Rojo, MA & Rojo-Vázquez, FA (2005a): Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. *Vet Parasitol* 129(3-4), 291-298.
- Álvarez-Sánchez, MA, Pérez García, J, Bartley, D, Jackson, F & Rojo-Vázquez, FA (2005b): The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Exp Parasitol* 110(1), 56-61.
- Ambudkar, SV, Kim, I-W & Sauna, ZE (2006): The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharm Sci* 27(5), 392-400.
- Amin, ML (2013): P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights* 7, 27-34.
- Andersen, UV, Howe, DK, Olsen, SN & Nielsen, MK (2013): Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: The challenge of prepatent detection. *Vet Parasitol* 192(1-3), 1-9.
- Anderson, RC (2000): Order Ascaridida. *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission*. Oxon, UK, CAB International: 245-348.
- Ardelli, BF (2013): Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes. *Parasitol Int* 62(6), 639-646.
- Ardelli, BF, Guerriero, SB & Prichard, RK (2005): Genomic organization and effects of ivermectin selection on *Onchocerca volvulus* P-glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol* 143(1), 58-66.
- Ardelli, BF, Guerriero, SB & Prichard, RK (2006a): Characterization of a half-size ATP-binding cassette transporter gene which may be a useful marker for ivermectin selection in *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* 145(1), 94-100.
- Ardelli, BF, Guerriero, SB & Prichard, RK (2006b): Ivermectin imposes selection pressure on P-glycoprotein from *Onchocerca volvulus*: linkage disequilibrium and genotype diversity. *Parasitology* 132(Pt 3), 375-386.
- Ardelli, BF & Prichard, RK (2004): Identification of variant ABC-transporter genes among *Onchocerca volvulus* collected from ivermectin-treated and untreated patients in Ghana, West Africa. *Ann Trop Med Parasitol* 98(4), 371-384.
- Ardelli, BF & Prichard, RK (2013): Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Vet Parasitol* 191(3-4), 264-275.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ardelli, BF, Stitt, LE & Tompkins, JB (2010): Inventory and analysis of ATP-binding cassette (ABC) systems in *Brugia malayi*. *Parasitology* 137(8), 1195-1212.
- Ardelli, BF, Stitt, LE, Tompkins, JB & Prichard, RK (2009): A comparison of the effects of ivermectin and moxidectin on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Vet Parasitol* 165(1-2), 96-108.
- Arena, JP, Liu, KK, Pares, PS, Schaeffer, JM & Cully, DF (1992): Expression of a glutamate-activated chloride current in *Xenopus* oocytes injected with *Caenorhabditis elegans* RNA: evidence for modulation by avermectin. *Mol Brain* 15(3-4), 339-348.
- Areskog, M, Engström, A, Tallkvist, J, von Samson-Himmelstjerna, G & Höglund, J (2013): PGP expression in *Cooperia oncophora* before and after ivermectin selection. *Parasitol Res* 112(8), 3005-3012.
- Artal-Sanz, M, de Jong, L & Tavernarakis, N (2006): *Caenorhabditis elegans*: A versatile platform for drug discovery. *Biotechnol J* 1(12), 1405-1418.
- Austin, SM, DiPietro, JA, Foreman, JH, Baker, GJ & Todd, KS (1990): *Parascaris equorum* infections in horses. *Comp Cont Educ Pract* 12(8), 1110-1119.
- Austin, SM, DiPietro, JA, Foreman, JH, Baker, GJ & Todd, KS, Jr. (1991): Comparison of the efficacy of ivermectin, oxibendazole, and pyrantel pamoate against 28-day *Parascaris equorum* larvae in the intestine of pony foals. *J Am Vet Med Assoc* 198(11), 1946-1949.
- Avery, L & Horvitz, HR (1990): Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool* 253(3), 263-270.
- Bamber, BA, Beg, AA, Twyman, RE & Jorgensen, EM (1999): The *Caenorhabditis elegans* unc-49 locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor. *J Neurosci* 19(13), 5348-5359.
- Bamber, BA, Twyman, RE & Jorgensen, EM (2003): Pharmacological characterization of the homomeric and heteromeric UNC-49 GABA receptors in *C. elegans*. *Br J Pharmacol* 138(5), 883-893.
- Barragry, TB (1987): A review of the pharmacology and clinical uses of ivermectin. *Can Vet J* 28(8), 512-517.
- Barstead, RJ (1999): Reverse Genetics. In: H. I. A.: *C. elegans - A practical Approach*. Oxford, Oxford University Press: 97-118.
- Bartley, DJ, McAllister, H, Bartley, Y, Dupuy, J, Ménez, C, Alvinerie, M, Jackson, F & Lespine, A (2009): P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 136(9), 1081-1088.
- Basiaga, M & Kornas, S (2011): Determination of ivermectin efficacy against *Parascaris equorum* in horses from large herd farm. *Infectious and Parasitic Diseases of Animals, 4th International Scientific Conference*, Kosice.
- Bates, SE, Robey, R, Miyake, K, Rao, K, Ross, DD & Litman, T (2001): The role of half-transporters in multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr* 33(6), 503-511.
- Bauer, C, Merkt, JC, Janke-Grimm, G & Bürger, HJ (1986): Prevalence and control of benzimidazole-resistant small strongyles on German thoroughbred studs. *Vet Parasitol* 21(3), 189-203.
- Beech, RN, Prichard, RK & Scott, ME (1994): Genetic variability of the beta-tubulin genes in benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics* 138(1), 103-110.
- Beech, RN, Skuce, P, Bartley, DJ, Martin, RJ, Prichard, RK & Gilleard, JS (2011): Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? *Parasitology* 138(2), 160-174.
- Bemrick, WJ, O'Leary, TP & Averbach, GA (1977): Homocytotropic response of guinea-pigs to antigen extracts from formalized and unformalized *Parascaris equorum*. *Immunology* 32(4), 567-572.
- Bennett, JL & Pax, RA (1986): Micromotility meter: an instrument designed to evaluate the action of drugs on motility of larval and adult nematodes. *Parasitology* 93 (Pt 2), 341-346.
- Bernt, U, Junkersdorf, B, Londershausen, M, Harder, A & Schierenberg, E (1998): Effects of anthelmintics with different modes of action on the behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. *Fundam Appl Nematol* 21(3), 251-263.

- Bielza, P, Quinto, V, Grávalos, C, Fernández, E, Abellán, J & Contreras, J (2008): Stability of spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Pergande) under laboratory conditions. *Bull Entomol Res* 98(4), 355-359.
- Bishop, R, Scott, I, Gee, E, Rogers, C, Pomroy, W & Mayhew, I (2013): Sub-optimal efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum* in foals on three Thoroughbred stud farms in the Manawatu region of New Zealand. *N Z Vet J*.
- Blackhall, WJ, Liu, HY, Xu, M, Prichard, RK & Beech, RN (1998a): Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 95(2), 193-201.
- Blackhall, WJ, Pouliot, JF, Prichard, RK & Beech, RN (1998b): *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. *Exp Parasitol* 90(1), 42-48.
- Blackhall, WJ, Prichard, RK & Beech, RN (2003): Selection at a gamma-aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. *Mol Biochem Parasitol* 131(2), 137-145.
- Blackhall, WJ, Prichard, RK & Beech, RN (2008): P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Vet Parasitol* 152(1-2), 101-107.
- Blaxter, M (2011): Nematodes: the worm and its relatives. *PLoS Biol* 9(4), e1001050.
- Blaxter, M & Liu, L (1996): Nematode spliced leaders-ubiquity, evolution and utility. *Int J Parasitol* 26(10), 1025-1033.
- Blaxter, ML, De Ley, P, Garey, JR, Liu, LX, Scheldeman, P, Vierstraete, A, Vanfleteren, JR, Mackey, LY, Dorris, M, Frisse, LM, Vida, JT & Thomas, WK (1998): A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392(6671), 71-75.
- Blouin, MS (1998): Mitochondrial DNA diversity in nematodes. *J Helminthol* 72(4), 285-289.
- Blouin, MS, Yowell, CA, Courtney, CH & Dame, JB (1995): Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* 141(3), 1007-1014.
- Boersema, JH, Eysker, M & Nas, JWM (2002): Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Vet Rec* 150(9), 279-281.
- Boes, J, Eriksen, L & Nansen, P (1998): Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs isolated from worms expelled by pigs treated with albendazole, pyrantel pamoate, ivermectin or piperazine dihydrochloride. *Vet Parasitol* 75(2-3), 181-190.
- Borst, P, Evers, R, Kool, M & Wijnholds, J (1999): The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1461(2), 347-357.
- Bourguinat, C, Ardelli, BF, Pion, SD, Kamgno, J, Gardon, J, Duke, BO, Boussinesq, M & Prichard, RK (2008): P-glycoprotein-like protein, a possible genetic marker for ivermectin resistance selection in *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* 158(2), 101-111.
- Bourguinat, C, Keller, K, Bhan, A, Peregrine, A, Geary, T & Prichard, R (2011a): Macrocyclic lactone resistance in *Diriofilaria immitis*. *Vet Parasitol* 181(2-4), 388-392.
- Bourguinat, C, Keller, K, Blagburn, B, Schenker, R, Geary, TG & Prichard, RK (2011b): Correlation between loss of efficacy of macrocyclic lactone heartworm anthelmintics and P-glycoprotein genotype. *Vet Parasitol* 176(4), 374-381.
- Bourguinat, C, Keller, K, Prichard, RK & Geary, TG (2011c): Genetic polymorphism in *Diriofilaria immitis*. *Vet Parasitol* 176(4), 368-373.
- Boveri, T (1887): Über Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megaloccephala*. *Anat Anz* 2, 688-693.
- Braisher, TL, Gemmell, NJ, Grenfell, BT & Amos, W (2004): Host isolation and patterns of genetic variability in three populations of *Teladorsagia* from sheep. *Int J Parasitol* 34(10), 1197-1204.
- Brenner, S (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1), 71-94.
- Broeks, A, Gerrard, B, Allikmets, R, Dean, M & Plasterk, RHA (1996): Homologues of the human multidrug resistance genes *MRP* and *MDR* contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 15(22), 6132-6143.
- Broeks, A, Janssen, HWRM, Calafat, J & Plasterk, RHA (1995): A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins. *EMBO J* 14(9), 1858-1866.
- Brownlee, DJA, Holden-Dye, L & Walker, RJ (1997): Actions of the anthelmintic ivermectin on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Parasitology* 115(Pt 5), 553-561.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Buckingham, SD & Sattelle, DB (2009): Fast, automated measurement of nematode swimming (thrashing) without morphometry. *BMC Neurosci* 10, 84.
- Bucknell, DG, Gasser, RB & Beveridge, I (1995): The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria, Australia. *Int J Parasitol* 25(6), 711-724.
- Bullini, L, Nascetti, G, Ciafre, S, Rumore, F & Biocca, E (1978): Ricerche carilogiche ed elettroforetiche su *Parascaris univalens* e *Parascaris equorum*. *Acc. Naz. Lincei, Rend. Cl. Sc. Fis., Mat. e Nat.* 65, 151-156.
- Bürglin, TR, Lobos, E & Blaxter, ML (1998): *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes. *Int J Parasitol* 28(3), 395-411.
- Callaghan, R, Crowley, E, Potter, S & Kerr, ID (2008): P-glycoprotein: so many ways to turn it on. *J Clin Pharmacol* 48(3), 365-378.
- Campbell, WC (1993): Ivermectin, an antiparasitic agent. *Med Res Rev* 13(1), 61-79.
- Campbell, WC & Benz, GW (1984): Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J Vet Pharmacol Ther* 7(1), 1-16.
- Campbell, WC, Fisher, MH, Stapley, EO, Albers-Schönberg, G & Jacob, TA (1983): Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* 221(4613), 823-828.
- Cassada, RC & Russell, RL (1975): The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 46(2), 326-342.
- Caviston, JP & Holzbaur, ELF (2006): Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol* 16(10), 530-537.
- Chalfie, M, Tu, Y, Euskirchen, G, Ward, WW & Prasher, DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148), 802-805.
- Chapman, MR, French, DD & Klei, TR (2002): Gastrointestinal helminths of ponies in Louisiana: a comparison of species currently prevalent with those present 20 years ago. *J Parasitol* 88(6), 1130-1134.
- Cirak, VY, Kar, S & Girisgin, O (2010): [A survey on anthelmintic resistance in Strongyles to ivermectin and pyrantel and macrocyclic lactone-resistance in *Parascaris equorum*]. *Türkiye Parazit Derg* 34(1), 35-39.
- Clayton, HM (1978): Ascariasis in foals. *Vet Rec* 102(25), 553-556.
- Clayton, HM (1986): Ascarids. Recent advances. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2(2), 313-328.
- Clayton, HM & Duncan, JL (1977): Experimental *Parascaris equorum* infection of foals. *Res Vet Sci* 23(1), 109-114.
- Clayton, HM & Duncan, JL (1978): Clinical signs associated with *Parascaris equorum* infection in worm-free pony foals and yearlings. *Vet Parasitol* 4(1), 69-78.
- Clayton, HM & Duncan, JL (1979a): The development of immunity to *Parascaris equorum* infection in the foal. *Res Vet Sci* 26(3), 383-384.
- Clayton, HM & Duncan, JL (1979b): The migration and development of *Parascaris equorum* in the horse. *Int J Parasitol* 9(4), 285-292.
- Clayton, HM, Duncan, JL & Dargie, JD (1980): Pathophysiological changes associated with *Parascaris equorum* infection in the foal. *Equine Vet J* 12(1), 23-25.
- Cobb, R & Boeckh, A (2009): Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. *Parasit Vectors* 2 (Suppl 2), S5.
- Coles, GC (2006): Drug resistance and drug tolerance in parasites. *Trends Parasitol* 22(8), 348.
- Coles, GC, Bauer, C, Borgsteede, FH, Geerts, S, Klei, TR, Taylor, MA & Waller, PJ (1992): World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 44(1-2), 35-44.
- Coles, GC, Jackson, F, Pomroy, WE, Prichard, RK, von Samson-Himmelstjerna, G, Silvestre, A, Taylor, MA & Vercruyse, J (2006): The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 136(3-4), 167-185.
- Coles, GC, Rhodes, AC & Wolstenholme, AJ (2005): Rapid selection for ivermectin resistance in *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 129(3-4), 345-347.
- Coles, GC, Tritschler, JP, 2nd, Giordano, DJ, Laste, NJ & Schmidt, AL (1988): Larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. *Res Vet Sci* 45(1), 50-53.

- Coles, GC, Watson, CL & Anziani, OS (2001): Ivermectin-resistant *Cooperia* in cattle. *Vet Rec* 148(9), 283-284.
- Consortium, TCeS (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282(5396), 2012-2018.
- Conway, DP (1964): Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *Am J Vet Res* 25, 844-846.
- Corsi, AK (2006): A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. *Anal Biochem* 359(1), 1-17.
- Craig, TM, Diamond, PL, Ferwerda, NS & Thompson, JA (2007): Evidence of ivermectin resistance by *Parascaris equorum* on a Texas horse farm. *J Equine Vet Sci* 27(2), 67-71.
- Craven, J, Bjorn, H, Barnes, EH, Henriksen, SA & Nansen, P (1999): A comparison of in vitro tests and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. *Vet Parasitol* 85(1), 49-59.
- Cribb, NC, Coté, NM, Bouré, LP & Peregrine, AS (2006): Acute small intestinal obstruction associated with *Parascaris equorum* infection in young horses: 25 cases (1985-2004). *N Z Vet J* 54(6), 338-343.
- Crowe, ML (2005): SeqDoC: rapid SNP and mutation detection by direct comparison of DNA sequence chromatograms. *BMC Bioinformatics* 6, 133.
- Cully, DF, Vassilatis, DK, Liu, KK, Pares, PS, Van der Ploeg, LH, Schaeffer, JM & Arena, JP (1994): Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371(6499), 707-711.
- Cully, DF, Wilkinson, H, Vassilatis, DK, Etter, A & Arena, JP (1996): Molecular biology and electrophysiology of glutamate-gated chloride channels of invertebrates. *Parasitology* 113 Suppl, S191-200.
- Cvilink, V, Lamka, J & Skálová, L (2009): Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metab Rev* 41(1), 8-26.
- d'Assonville, JA, Janovsky, E & Verster, A (1996): *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. *Vet Parasitol* 61(1-2), 73-80.
- Dantzig, AH, Shepard, RL, Law, KL, Tabas, L, Pratt, S, Gillespie, JS, Binkley, SN, Kuhfeld, MT, Starling, JJ & Wrighton, SA (1999): Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities. *J Pharmacol Exp Ther* 290(2), 854-862.
- Daurio, CP & Leaning, WHD (1989): The effect of oral ivermectin on immature ascarids in foals. *J Equine Vet Sci* 9(6), 312-315.
- Davis, RE & Stretton, AO (1996): The motoneuronal system of *Ascaris*: electrophysiology and anatomy of the neurons and their control by neuromodulators. *Parasitology* 113 Suppl, S97-117.
- De Graef, J, Claerebout, E & Geldhof, P (2013a): Anthelmintic resistance of gastrointestinal cattle nematodes. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 82, 113-123.
- De Graef, J, Demeler, J, Skuce, P, Mitreva, M, von Samson-Himmelstjerna, G, Vercruysse, J, Claerebout, E & Geldhof, P (2013b): Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant *Cooperia oncophora* isolate following *in vivo* and *in vitro* exposure to macrocyclic lactones. *Parasitology* 140(4), 499-508.
- de Lourdes Mottier, M & Prichard, RK (2008): Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenet Genomics* 18(2), 129-140.
- de Silva, N, Guyatt, H & Bundy, D (1997): Anthelmintics. A comparative review of their clinical pharmacology. *Drugs* 53(5), 769-788.
- Delany, NS, Laughton, DL & Wolstenholme, AJ (1998): Cloning and localisation of an avermectin receptor-related subunit from *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 97(1-2), 177-187.
- Demeler, J, Krücken, J, AlGusbi, S, Ramünke, S, De Graef, J, Kerboeuf, D, Geldhof, P, Pomroy, WE & von Samson-Himmelstjerna, G (2013): Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Mol Biochem Parasitol* 188(1), 10-19.

- Demeler, J, Küttler, U & von Samson-Himmelstjerna, G (2010): Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. *Vet Parasitol* 170(1-2), 61-70.
- Dent, JA (2006): Evidence for a diverse Cys-loop ligand-gated ion channel superfamily in early bilateria. *J Mol Evol* 62(5), 523-535.
- Dent, JA, Davis, MW & Avery, L (1997): *avr-15* encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 16(19), 5867-5879.
- Dent, JA, Smith, MM, Vassilatis, DK & Avery, L (2000): The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6), 2674-2679.
- Deplazes, P, Eckert, J, von Samson-Himmelstjerna, G & Zahner, H (2012a): Ordnung Ascaridida. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Stuttgart, Enke Verlag: 308-324.
- Deplazes, P, Eckert, J, von Samson-Himmelstjerna, G & Zahner, H (2012b): Planmäßige Bekämpfung wichtiger Parasitosen des Pferdes. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Stuttgart, Enke Verlag: 581-586.
- Deplazes, P, Eckert, J, von Samson-Himmelstjerna, G & Zahner, H (2012c): Stamm Nematoda (Syn. Nematzoa) (Faden- oder Rundwürmer). *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Stuttgart, Enke Verlag: 235-239.
- Diawara, A, Drake, LJ, Suswillo, RR, Kihara, J, Bundy, DAP, Scott, ME, Halpenny, C, Stothard, JR & Prichard, RK (2009): Assays to detect beta-tubulin codon 200 polymorphism in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. *PLoS Negl Trop Dis* 3(3), e397.
- Dicker, AJ, Nath, M, Yaga, R, Nisbet, AJ, Lainson, FA, Gilleard, JS & Skuce, PJ (2010): *Teladorsagia circumcincta*: The transcriptomic response of a multi-drug-resistant isolate to ivermectin exposure in vitro. *Exp Parasitol* 127(2), 351-356.
- Dicker, AJ, Nisbet, AJ & Skuce, PJ (2011): Gene expression changes in a P-glycoprotein (*Tci-pgp-9*) putatively associated with ivermectin resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol* 41(9), 935-942.
- Didier, A & Loor, F (1996): The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs* 7(7), 745-751.
- DiPietro, JA, Lock, TF, Todd, KS, Jr. & Davis, JL (1989): Efficacy of ivermectin in the treatment of induced *Parascaris equorum* infection in pony foals. *J Am Vet Med Assoc* 195(12), 1712-1714.
- DiPietro, JA, Lock, TF, Todd, KS, Jr. & Reuter, VE (1987): Evaluation of ivermectin paste in the treatment of ponies for *Parascaris equorum* infections. *J Am Vet Med Assoc* 190(9), 1181-1183.
- DiPietro, JA & Todd, KS, Jr. (1987): Anthelmintics used in treatment of parasitic infections of horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 3(1), 1-14.
- DiPietro, JA, Todd, KS, Lock, TF & McPherron, TA (1982): Anthelmintic efficacy of ivermectin given intramuscularly in horses. *Am J Vet Res* 43(1), 145-148.
- Dobson, RJ, Donald, AD, Waller, PJ & Snowdon, KL (1986): An egg-hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongyloid nematode parasites. *Vet Parasitol* 19(1-2), 77-84.
- Dobson, RJ, Lejambre, L & Gill, JH (1996): Management of anthelmintic resistance: inheritance of resistance and selection with persistent drugs. *Int J Parasitol* 26(8-9), 993-1000.
- Doyle, LA & Ross, DD (2003): Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22(47), 7340-7358.
- Drogemuller, M, Schnieder, T & von Samson-Himmelstjerna, G (2004): Evidence of p-glycoprotein sequence diversity in cyathostomins. *J Parasitol* 90(5), 998-1003.
- Drudge, JH & Lyons, ET (1965): Newer developments in helminth control and *Strongylus vulgaris* research. *Proc. 11th Ann. Meet. Amer. Ass. Equine Pract.*, 381-389.
- Drudge, JH & Lyons, ET (1977): Methods in the evaluation of antiparasitic drugs in the horse. *Am J Vet Res* 38(10), 1581-1586.
- Drudge, JH, Lyons, ET & Tolliver, SC (1978): Critical tests of the anthelmintic febantel in the horse: activity of a paste formulation alone or with a trichlorfon paste. *Am J Vet Res* 39(9), 1419-1421.

- Drudge, JH, Lyons, ET, Tolliver, SC & Kubis, JE (1979): Critical tests and clinical trials on oxibendazole in horses with special reference to removal of *Parascaris equorum*. *Am J Vet Res* 40(6), 758-761.
- Drudge, JH, Szanto, J, Wyant, ZN & Elam, G (1964): Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. *Am J Vet Res* 25, 1512-1518.
- Duke, BO, Zea-Flores, G & Muñoz, B (1991): The embryogenesis of *Onchocerca volvulus* over the first year after a single dose of ivermectin. *Trop Med Parasitol* 42(3), 175-180.
- Echizen, H, Brecht, T, Niedergesäss, S, Vogelgesang, B & Eichelbaum, M (1985): The effect of dextro-, levo-, and racemic verapamil on atrioventricular conduction in humans. *Am Heart J* 109(2), 210-217.
- Edwards, G (2003): Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria J Suppl* 1(S8).
- Egerton, JR, Brokken, ES, Suhayda, D, Eary, CH, Wooden, JW & Kilgore, RL (1981): The antiparasitic activity of ivermectin in horses. *Vet Parasitol* 8(1), 83-88.
- El-Abdellati, A, De Graef, J, Van Zeveren, A, Donnan, A, Skuce, P, Walsh, T, Wolstenholme, A, Tait, A, Vercruyse, J, Claerebout, E & Geldhof, P (2011): Altered *avr-14B* gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi*. *Int J Parasitol* 41(9), 951-957.
- Emmons, SW, Klass, MR & Hirsh, D (1979): Analysis of the constancy of DNA sequences during development and evolution of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(3), 1333-1337.
- Endicott, JA & Ling, V (1989): The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 58, 137-171.
- Eng, JK & Prichard, RK (2005): A comparison of genetic polymorphism in populations of *Onchocerca volvulus* from untreated- and ivermectin-treated patients. *Mol Biochem Parasitol* 142(2), 193-202.
- Eng, JKL, Blackhall, WJ, Osei-Atweneboana, MY, Bourguinat, C, Galazzo, D, Beech, RN, Unnasch, TR, Awadzi, K, Lubega, GW & Prichard, RK (2006): Ivermectin selection on beta-tubulin: evidence in *Onchocerca volvulus* and *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 150(2), 229-235.
- Fauvin, A, Charvet, C, Issouf, M, Cortet, J, Cabaret, J & Neveu, C (2010): cDNA-AFLP analysis in levamisole-resistant *Haemonchus contortus* reveals alternative splicing in a nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Mol Biochem Parasitol* 170(2), 105-107.
- Fire, A (1986): Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 5(10), 2673-2680.
- Fire, A, Xu, S, Montgomery, MK, Kostas, SA, Driver, SE & Mello, CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669), 806-811.
- Folz, SD, Pax, RA, Klei, TR, Thomas, EM, Ash, KA, Conder, GA & Bennett, JL (1988): Development of a novel in vitro equine anthelmintic assay. *J Vet Pharmacol Ther* 11(2), 177-182.
- Francisco, I, Arias, M, Cortiñas, FJ, Francisco, R, Mochales, E, Sánchez, JA, Uriarte, J, Suárez, JL, Morrondo, P, Sánchez-Andrade, R, Díez-Baños, P & Paz-Silva, A (2009): Silvopastoralism and autochthonous equine livestock: analysis of the infection by endoparasites. *Vet Parasitol* 164(2-4), 357-362.
- Freeman, AS, Nghiem, C, Li, J, Ashton, FT, Guerrero, J, Shoop, WL & Schad, GA (2003): Amphidial structure of ivermectin-resistant and susceptible laboratory and field strains of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 110(3-4), 217-226.
- French, DD, Klei, TR, Taylor, HW, Chapman, MR & Wright, FR (1988): Efficacy of ivermectin in the oral paste formulation against naturally acquired adult and larval stages of *Parascaris equorum* in pony foals. *Am J Vet Res* 49(7), 1000-1003.
- Fritzen, B, Rohn, K, Schnieder, T & von Samson-Himmelstjerna, G (2010): Endoparasite control management on horse farms - lessons from worm prevalence and questionnaire data. *Equine Vet J* 42(1), 79-83.
- Fung, KL & Gottesman, MM (2009): A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* 1794(5), 860-871.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Garg, R & Yadav, CL (2009): Genotyping of benzimidazole susceptible and resistant alleles in different populations of *Haemonchus contortus* from Himalayan and sub-Himalayan regions of North-West India. *Trop Anim Health Prod* 41(7), 1127-1131.
- Geary, TG, Klein, RD, Vanover, L, Bowman, JW & Thompson, DP (1992): The nervous systems of helminths as targets for drugs. *J Parasitol* 78(2), 215-230.
- Geary, TG & Moreno, Y (2012): Macrocyclic lactone anthelmintics: spectrum of activity and mechanism of action. *Curr Pharm Biotechnol* 13(6), 866-872.
- Geary, TG, Sangster, NC & Thompson, DP (1999): Frontiers in anthelmintic pharmacology. *Vet Parasitol* 84(3-4), 275-295.
- Geary, TG, Sims, SM, Thomas, EM, Vanover, L, Davis, JP, Winterrowd, CA, Klein, RD, Ho, NFH & Thompson, DP (1993): *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. *Exp Parasitol* 77(1), 88-96.
- Geary, TG & Thompson, DP (2001): *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites? *Vet Parasitol* 101(3-4), 371-386.
- Gill, JH & Lacey, E (1998): Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. *Int J Parasitol* 28(6), 863-877.
- Gill, JH, Redwin, JM, van Wyk, JA & Lacey, E (1991): Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 21(7), 771-776.
- Gill, JH, Redwin, JM, van Wyk, JA & Lacey, E (1995): Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*-effects of ivermectin resistance. *Int J Parasitol* 25(4), 463-470.
- Gilleard, JS (2004): The use of *Caenorhabditis elegans* in parasitic nematode research. *Parasitology* 128 Suppl 1, S49-70.
- Gilleard, JS (2006): Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. *Int J Parasitol* 36(12), 1227-1239.
- Gilleard, JS & Beech, RN (2007): Population genetics of anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitology* 134(Pt 8), 1133-1147.
- Glendinning, SK, Buckingham, SD, Sattelle, DB, Wonnacott, S & Wolstenholme, AJ (2011): Glutamate-gated chloride channels of *Haemonchus contortus* restore drug sensitivity to ivermectin resistant *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 6(7), e22390.
- Goday, C & Pimpinelli, S (1984): Chromosome organization and heterochromatin elimination in *Parascaris*. *Science* 224(4647), 411-413.
- Goday, C & Pimpinelli, S (1986): Cytological analysis of chromosomes in the two species *Parascaris univalens* and *Parascaris equorum*. *Chromosoma* 94(1), 1-10.
- Goday, C & Pimpinelli, S (1993): The occurrence, role and evolution of chromatin diminution in nematodes. *Parasitol Today* 9(9), 319-322.
- Gokbulut, C, Cirak, VY, Senlik, B, Aksit, D, Durmaz, M & McKellar, QA (2010): Comparative plasma disposition, bioavailability and efficacy of ivermectin following oral and pour-on administrations in horses. *Vet Parasitol* 170(1-2), 120-126.
- Gokbulut, C, Nolan, AM & McKellar, QA (2001): Plasma pharmacokinetics and faecal excretion of ivermectin, doramectin and moxidectin following oral administration in horses. *Equine Vet J* 33(5), 494-498.
- Golden, JW & Riddle, DL (1984): The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Dev Biol* 102(2), 368-378.
- Gottesman, MM & Ling, V (2006): The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. *FEBS Lett* 580(4), 998-1009.
- Gottesman, MM & Pastan, I (1993): Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62, 385-427.
- Gould, JC, Rossano, MG, Lawrence, LM, Burk, SV, Ennis, RB & Lyons, ET (2013): The effects of windrow composting on the viability of *Parascaris equorum* eggs. *Vet Parasitol* 191(1-2), 73-80.
- Grant, WN (1992): Transformation of *Caenorhabditis elegans* with genes from parasitic nematodes. *Parasitol Today* 8(10), 344-346.
- Grantham, R (1974): Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185(4154), 862-864.

- Griffin, J, Fletcher, N, Clemence, R, Blanchflower, S & Brayden, DJ (2005): Selamectin is a potent substrate and inhibitor of human and canine P-glycoprotein. *J Vet Pharmacol Ther* 28(3), 257-265.
- Grkovic, S, Brown, MH & Skurray, RA (2001): Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12(3), 225-237.
- Gros, P, Dhir, R, Croop, J & Talbot, F (1991): A single amino acid substitution strongly modulates the activity and substrate specificity of the mouse *mdr1* and *mdr3* drug efflux pumps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16), 7289-7293.
- Halley, BA, Jacob, TA & Lu, AYH (1989): The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate. *Chemosphere* 18(7-8), 1543-1563.
- Hanna, M, Brault, M, Kwan, T, Kast, C & Gros, P (1996): Mutagenesis of transmembrane domain 11 of P-glycoprotein by alanine scanning. *Biochemistry* 35(11), 3625-3635.
- Harder, A & von Samson-Himmelstjerna, G (2002): Cyclooctadepsipeptides--a new class of anthelmintically active compounds. *Parasitol Res* 88(6), 481-488.
- Hart, AC, ed. (2006). *Behavior. WormBook* ed. The *C. elegans* Research Community. von <http://www.wormbook.org>.
- Hayton, K & Su, XZ (2008): Drug resistance and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*. *Curr Genet* 54(5), 223-239.
- Hearn, FP & Peregrine, AS (2003): Identification of foals infected with *Parascaris equorum* apparently resistant to ivermectin. *J Am Vet Med Assoc* 223(4), 482-485, 455.
- Hennessy, DR & Alvinerie, MR (2002): Pharmacokinetics of the Macrocyclic Lactones: Conventional Wisdom and New Paradigms. In: J. Vercruysse and R. S. Rew: *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. Oxon, UK, CAB International: 97-123.
- Hibbs, RE & Gouaux, E (2011): Principles of activation and permeation in an anion-selective cys-loop receptor. *Nature* 474(7349), 54-60.
- Higgins, CF (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8, 67-113.
- Higgins, CF (2007): Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 446(7137), 749-757.
- Higgins, CF & Gottesman, MM (1992): Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* 17(1), 18-21.
- Higgins, CF & Linton, KJ (2004): The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 11(10), 918-926.
- Hinney, B, Wirtherle, NC, Kyule, M, Miethe, N, Zessin, KH & Clausen, PH (2011): Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. *Parasitol Res* 108(5), 1083-1091.
- Hoffmeyer, S, Burk, O, von Richter, O, Arnold, HP, Brockmöller, J, John, A, Cascorbi, I, Gerloff, T, Roots, I, Eichelbaum, M & Brinkmann, U (2000): Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7), 3473-3478.
- Höglund, J, Engström, A, Morrison, DA & Mattsson, JG (2004): Genetic diversity assessed by amplified fragment length polymorphism analysis of the parasitic nematode *Dictyocaulus viviparus* the lungworm of cattle. *Int J Parasitol* 34(4), 475-484.
- Höglund, J, Morrison, DA, Engström, A, Nejsum, P & Jansson, DS (2012): Population genetic structure of *Ascaridia galli* re-emerging in non-caged laying hens. *Parasit Vectors* 5, 97.
- Hollenstein, K, Dawson, RJP & Locher, KP (2007): Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol* 17(4), 412-418.
- Holterman, M, van der Wurff, A, van den Elsen, S, van Megen, H, Bongers, T, Holovachov, O, Bakker, J & Helder, J (2006): Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Mol Biol Evol* 23(9), 1792-1800.
- Hopper, K, Aldrich, J & Haskins, SC (2002): Ivermectin toxicity in 17 collies. *J Vet Intern Med* 16(1), 89-94.
- Horoszok, L, Raymond, V, Sattelle, DB & Wolstenholme, AJ (2001): GLC-3: a novel fipronil and BIDN-sensitive, but picrotoxinin-insensitive, L-glutamate-gated chloride channel subunit from *Caenorhabditis elegans*. *Br J Pharmacol* 132(6), 1247-1254.

- Huang, YJ & Prichard, RK (1999): Identification and stage-specific expression of two putative P-glycoprotein coding genes in *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* 102(2), 273-281.
- Hyde, SC, Emsley, P, Hartshorn, MJ, Mimmack, MM, Gileadi, U, Pearce, SR, Gallagher, MP, Gill, DR, Hubbard, RE & Higgins, CF (1990): Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346(6282), 362-365.
- Ihler, CF (1995): The distribution of *Parascaris equorum* eggs in the soil profile of bare paddocks in some Norwegian studs. *Vet Res Commun* 19(6), 495-501.
- Jabbar, A, Iqbal, Z, Kerboeuf, D, Muhammad, G, Khan, MN & Afaq, M (2006): Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci* 79(26), 2413-2431.
- Jagannathan, S, Laughton, DL, Critten, CL, Skinner, TM, Horoszok, L & Wolstenholme, AJ (1999): Ligand-gated chloride channel subunits encoded by the *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum* orthologues of the *Caenorhabditis elegans* gbr-2 (avr-14) gene. *Mol Biochem Parasitol* 103(2), 129-140.
- James, CE & Davey, MW (2007): A rapid colorimetric assay for the quantitation of the viability of free-living larvae of nematodes in vitro. *Parasitol Res* 101(4), 975-980.
- James, CE & Davey, MW (2009): Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol* 39(2), 213-220.
- James, CE, Hudson, AL & Davey, MW (2009): Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol* 25(7), 328-335.
- Janko, C & Geyer, J (2012): Moxidectin has a lower neurotoxic potential but comparable brain penetration in P-glycoprotein-deficient CF-1 mice compared to ivermectin. *J vet Pharmacol Ther* 36(3), 275-284.
- Jansen, G, Hazendonk, E, Thijssen, KL & Plasterk, RHA (1997): Reverse genetics by chemical mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 17(1), 119-121.
- Jeong, H, Herskowitz, I, Kroetz, DL & Rine, J (2007): Function-altering SNPs in the human multidrug transporter gene ABCB1 identified using a *Saccharomyces*-based assay. *PLoS Genet* 3(3), e39.
- Jin, MS, Oldham, ML, Zhang, Q & Chen, J (2012): Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 490(7421), 566-569.
- Johnson, TE & Nelson, GA (1991): *Caenorhabditis elegans*: A model system for space biology studies. *Exp Gerontol* 26(2-3), 299-309.
- Jones, PM & George, AM (2005): Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling. *Int J Parasitol* 35(5), 555-566.
- Jorgensen, EM & Mango, SE (2002): The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Genet* 3(5), 356-369.
- Juliano, RL & Ling, V (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *BBA-Bioenergetics* 455(1), 152-162.
- Kamath, RS, Fraser, AG, Dong, Y, Poulin, G, Durbin, R, Gotta, M, Kanapin, A, Le Bot, N, Moreno, S, Sohrmann, M, Welchman, DP, Zipperlen, P & Ahringer, J (2003): Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421(6920), 231-237.
- Kaminsky, R, Ducray, P, Jung, M, Clover, R, Rufener, L, Bouvier, J, Weber, SS, Wenger, A, Wieland-Berghausen, S, Goebel, T, Gauvry, N, Pautrat, F, Skripsky, T, Froelich, O, Komoin-Oka, C, Westlund, B, Sluder, A & Mäser, P (2008): A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* 452(7184), 176-180.
- Kantheridis, P, El-Osta, S, de Silva, M, Lee, G, Hu, XF & Zalberg, J (2000): Regulation of *MDR1* gene expression: emerging concepts. *Drug Resist Updat* 3(2), 99-108.
- Kaplan, RM (2004): Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20(10), 477-481.
- Kaplan, RM (2011): Biology and Management of Anthelmintic Resistance. In: H. M. Elsheikha and N. A. Khan: *Essentials of Veterinary Parasitology*. Norfolk, UK, Horizon Scientific Press: 201-208.
- Karns, PA & Luther, DG (1984): A survey of adverse effects associated with ivermectin use in Louisiana horses. *J Am Vet Med Assoc* 185(7), 782-783.

- Kartner, N, Riordan, JR & Ling, V (1983): Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221(4617), 1285-1288.
- Kasinathan, RS, Morgan, WM & Greenberg, RM (2011): Genetic knockdown and pharmacological inhibition of parasite multidrug resistance transporters disrupts egg production in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 5(12).
- Kass, IS, Wang, CC, Walrond, JP & Stretton, AO (1980): Avermectin B1a, a paralyzing anthelmintic that affects interneurons and inhibitory motoneurons in *Ascaris*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(10), 6211-6215.
- Kassai, T (1999): Order: ASCARIDIDA Ascarididoses - Intestinal roundworm diseases. *Veterinary Helminthology*. Oxford, UK, Butterworth-Heinemann Ltd: 96-111.
- Käufer-Weiss, I (2007): Leber und Gallenwege. In: E. Dahme and E. Weiss: *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Stuttgart, Enke Verlag: 148-168.
- Kerboeuf, D, Blackhall, W, Kaminsky, R & von Samson-Himmelstjerna, G (2003a): P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *Int J Antimicrob Agents* 22(3), 332-346.
- Kerboeuf, D & Guégnard, F (2011): Anthelmintics are substrates and activators of nematode P-glycoprotein. *Antimicrob Agents Chemother* 55(5), 2224-2232.
- Kerboeuf, D, Guégnard, F & Vern, YL (2003b): Detection of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance against anthelmintics in *Haemonchus contortus* using anti-human *mdr1* monoclonal antibodies. *Parasitol Res* 91(1), 79-85.
- Kiki-Mvouaka, S, Ménez, C, Borin, C, Lyazrhi, F, Foucaud-Vignault, M, Dupuy, J, Collet, X, Alvinerie, M & Lespine, A (2010): Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: A comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. *Drug Metab Dispos* 38(4), 573-580.
- Kimchi-Sarfaty, C, Oh, JM, Kim, IW, Sauna, ZE, Calcagno, AM, Ambudkar, SV & Gottesman, MM (2007): A "silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity. *Science* 315(5811), 525-528.
- Klei, TR & Torbert, BJ (1980): Efficacy of ivermectin (22,23-dihydroavermectin B1) against gastrointestinal parasites in ponies. *Am J Vet Res* 41(11), 1747-1750.
- Kopp, SR, Coleman, GT, Traub, RJ, McCarthy, JS & Kotze, AC (2009): Acetylcholine receptor subunit genes from *Ancylostoma caninum*: altered transcription patterns associated with pyrantel resistance. *Int J Parasitol* 39(4), 435-441.
- Koppelkamm, A, Vennemann, B, Lutz-Bonengel, S, Fracasso, T & Vennemann, M (2011): RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int J Legal Med* 125(4), 573-580.
- Kornaś, S, Skalska, M & Nowosad, B (2006): Occurrence of roundworm (*Parascaris equorum*) in horses from small farms based on necropsy. *Wiad Parazytol* 52(4), 323-326.
- Kramer, JM, French, RP, Park, EC & Johnson, JJ (1990): The *Caenorhabditis elegans* *rol-6* gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen. *Mol Cell Biol* 10(5), 2081-2089.
- Krishna, R & Mayer, LD (2000): Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 11(4), 265-283.
- Kwa, MSG, Kooyman, FNJ, Boersema, JH & Roos, MH (1993): Effect of selection for benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* on β -tubulin isotype 1 and isotype 2 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 191(2), 413-419.
- Kwa, MSG, Veenstra, JG, Van Dijk, M & Roos, MH (1995): Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 246(4), 500-510.
- Kwei, GY, Alvaro, RF, Chen, Q, Jenkins, HJ, Hop, CEAC, Keohane, CA, Ly, VT, Strauss, JR, Wang, RW, Wang, Z, Pippert, TR & Umbenhauer, DR (1999): Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in *mdr1a* P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos* 27(5), 581-587.
- Kyte, J & Doolittle, RF (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157(1), 105-132.

- Lacey, E (1988): The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 18(7), 885-936.
- Lacey, E (1990): Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 6(4), 112-115.
- Lacey, E & Prichard, RK (1986): Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 19(2), 171-181.
- Lage, H (2003): ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents* 22(3), 188-199.
- Laing, R, Kikuchi, T, Martinelli, A, Tsai, IJ, Beech, RN, Redman, E, Holroyd, N, Bartley, DJ, Beasley, H, Britton, C, Curran, D, Devaney, E, Gilabert, A, Hunt, M, Jackson, F, Johnston, S, Kryukov, I, Li, K, Morrison, AA, Reid, AJ, Sargison, N, Saunders, G, Wasmuth, JD, Wolstenholme, A, Berriman, M, Gilleard, JS & Cotton, JA (2013): The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology* 14(8), R88.
- Laugier, C, Sevin, C, Ménard, S & Maillard, K (2012): Prevalence of *Parascaris equorum* infection in foals on French stud farms and first report of ivermectin-resistant *P. equorum* populations in France. *Vet Parasitol* 188(1-2), 185-189.
- Lawson, J, O'Mara, ML & Kerr, ID (2008): Structure-based interpretation of the mutagenesis database for the nucleotide binding domains of P-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1778(2), 376-391.
- Le Jambre, LF (1976): Egg hatch as an in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 2(4), 385-391.
- Le Jambre, LF, Gill, JH, Lenane, IJ & Baker, P (2000): Inheritance of avermectin resistance in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 30(1), 105-111.
- Le Jambre, LF, Lenane, IJ & Wardrop, AJ (1999): A hybridisation technique to identify anthelmintic resistance genes in *Haemonchus*. *Int J Parasitol* 29(12), 1979-1985.
- Leathwick, DM, Pomroy, WE & Heath, ACG (2001): Anthelmintic resistance in New Zealand. *N Z Vet J* 49(6), 227-235.
- Lee, KS & Tsien, RW (1983): Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature* 302(5911), 790-794.
- Leignel, V, Silvestre, A, Humbert, JF & Cabaret, J (2010): Alternation of anthelmintic treatments: a molecular evaluation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 172(1-2), 80-88.
- Leitner, I, Nemeth, J, Feurstein, T, Abraham, A, Matzneller, P, Lagler, H, Erker, T, Langer, O & Zeitlinger, M (2011): The third-generation P-glycoprotein inhibitor tariquidar may overcome bacterial multidrug resistance by increasing intracellular drug concentration. *J Antimicrob Chemother* 66(4), 834-839.
- Lespine, A, Alvinerie, M, Vercruyse, J, Prichard, RK & Geldhof, P (2008): ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends Parasitol* 24(7), 293-298.
- Lespine, A, Martin, S, Dupuy, J, Roulet, A, Pineau, T, Orlowski, S & Alvinerie, M (2007): Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure-affinity relationship. *Eur J Pharm Sci* 30(1), 84-94.
- Lespine, A, Ménez, C, Bourguinat, C & Prichard, RK (2012): P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *Int J Parasitol: Drug Drug Resist* 2(0), 58-75.
- Lewis, JA & Fleming, JT (1995): Genetic and Culture Methods - Basic Culture Methods. In: H. F. Epstein and D. C. Shakes: *Caenorhabditis elegans*: Modern Biological Analysis of an Organism. San Diego, California, Academic Press. 48: 1-29.
- Li, W, Matsuoka, M, Kai, M, Thapa, P, Khadge, S, Hagge, DA, Brennan, PJ & Vissa, V (2012): Real-time PCR and high-resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. *J Clin Microbiol* 50(3), 742-753.
- Lincke, CR, Broeks, A, The, I, Plasterk, RHA & Borst, P (1993): The expression of two P-glycoprotein (*pgp*) genes in transgenic *Caenorhabditis elegans* is confined to intestinal cells. *EMBO J* 12(4), 1615-1620.

- Lind, EO & Christensson, D (2009): Anthelmintic efficacy on *Parascaris equorum* in foals on Swedish studs. *Acta Vet Scand* 51, 45.
- Lindgren, K, Ljungvall, Ö, Nilsson, O, Ljungström, BL, Lindahl, C & Höglund, J (2008): *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. *Vet Parasitol* 151(2-4), 337-343.
- Link, EM, Hardiman, G, Sluder, AE, Johnson, CD & Liu, LX (2000): Therapeutic target discovery using *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacogenomics* 1(2), 203-217.
- Liu, LX, Spoerke, JM, Mulligan, EL, Chen, J, Reardon, B, Westlund, B, Sun, L, Abel, K, Armstrong, B, Hardiman, G, King, J, McCague, L, Basson, M, Clover, R & Johnson, CD (1999): High-throughput isolation of *Caenorhabditis elegans* deletion mutants. *Genome Res* 9(9), 859-867.
- Lok, JB, Knight, DH, Selavka, CM, Eynard, J, Zhang, Y & Bergman, RN (1995): Studies of reproductive competence in male *Dirofilaria immitis* treated with milbemycin oxime. *Trop Med Parasitol* 46(4), 235-240.
- Loo, TW, Bartlett, MC & Clarke, DM (2003): Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem* 278(41), 39706-39710.
- Loo, TW & Clarke, DM (1999): Identification of residues in the drug-binding domain of human P-glycoprotein. Analysis of transmembrane segment 11 by cysteine-scanning mutagenesis and inhibition by dibromobimane. *J Biol Chem* 274(50), 35388-35392.
- Loo, TW & Clarke, DM (2000): Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane. *J Biol Chem* 275(50), 39272-39278.
- Loo, TW & Clarke, DM (2001): Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J Biol Chem* 276(18), 14972-14979.
- Loo, TW & Clarke, DM (2013): Drug rescue distinguishes between different structural models of human P-glycoprotein. *Biochemistry* 52(41), 7167-7169.
- Love, S (2003): Treatment and prevention of intestinal parasite-associated disease. *Vet Clin Equine* 19(3), 791-806.
- Lubega, GW & Prichard, RK (1991): Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin from developing stages of thiabendazole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *Biochem Pharmacol* 41(1), 93-101.
- Lucius, R & Loos-Frank, B (1997): Helminthen. *Parasitologie - Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag: 143-262.
- Lumaret, J-P, Errouissi, F, Floate, K, Römbke, J & Wardhaugh, K (2012): A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Curr Pharm Biotechnol* 13(6), 1004-1060.
- Lynagh, T & Lynch, JW (2012): Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sci* 33(8), 432-441.
- Lyons, ET, Drudge, JH & Tolliver, SC (1976): Studies on the development and chemotherapy of larvae of *Parascaris equorum* (Nematoda: Ascaridoidea) in experimentally and naturally infected foals. *J Parasitol* 62(3), 453-459.
- Lyons, ET, Swerczek, TW, Tolliver, SC, Bair, HD, Drudge, JH & Ennis, LE (2000): Prevalence of selected species of internal parasites in equids at necropsy in central Kentucky (1995-1999). *Vet Parasitol* 92(1), 51-62.
- Lyons, ET, Swerczek, TW, Tolliver, SC & Drudge, JH (1996): Natural superinfection of *Parascaris equorum* in a stall-confined orphan horse foal. *Vet Parasitol* 66(1-2), 119-123.
- Lyons, ET & Tolliver, SC (2004): Prevalence of parasite eggs (*Strongyloides westeri*, *Parascaris equorum*, and strongyles) and oocysts (*Emeria leuckarti*) in the feces of Thoroughbred foals on 14 farms in central Kentucky in 2003. *Parasitol Res* 92(5), 400-404.
- Lyons, ET, Tolliver, SC & Collins, SS (2006a): Field studies on endoparasites of Thoroughbred foals on seven farms in central Kentucky in 2004. *Parasitol Res* 98(5), 496-500.
- Lyons, ET, Tolliver, SC & Collins, SS (2006b): Prevalence of large endoparasites at necropsy in horses infected with Population B small strongyles in a herd established in Kentucky in 1966. *Parasitol Res* 99(2), 114-118.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Lyons, ET, Tolliver, SC, Ionita, M & Collins, SS (2008): Evaluation of parasiticidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxbendazole, and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central Kentucky in 2007. *Parasitol Res* 103(2), 287-291.
- Lyons, ET, Tolliver, SC, Kuzmina, TA & Collins, SS (2011): Further evaluation in field tests of the activity of three anthelmintics (fenbendazole, oxbendazole, and pyrantel pamoate) against the ascarid *Parascaris equorum* in horse foals on eight farms in Central Kentucky (2009-2010). *Parasitol Res* 109(4), 1193-.
- Marriner, SE, McKinnon, I & Bogan, JA (1987): The pharmacokinetics of ivermectin after oral and subcutaneous administration to sheep and horses. *J Vet Pharmacol Ther* 10(2), 175-179.
- Martin, PJ, Anderson, N & Jarrett, RG (1989): Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Aust Vet J* 66(8), 236-240.
- Martin, PJ & Le Jambre, LF (1979): Larval paralysis as an in vitro assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*. *Vet Sci Commun* 3(1), 159-164.
- Martin, RJ (1996): An electrophysiological preparation of *Ascaris suum* pharyngeal muscle reveals a glutamate-gated chloride channel sensitive to the avermectin analogue, milbemycin D. *Parasitology* 112 (Pt 2), 247-252.
- Martin, RJ (1997): Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J* 154(1), 11-34.
- Martin, RJ & Pennington, AJ (1989): A patch-clamp study of effects of dihydroavermectin on *Ascaris* muscle. *Br J Pharmacol* 98(3), 747-756.
- Martin, RJ & Robertson, AP (2007): Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. *Parasitology* 134(Pt 8), 1093-1104.
- Martin, RJ, Robertson, AP & Bjorn, H (1997): Target sites of anthelmintics. *Parasitology* 114(Suppl), S111-124.
- Martin, RJ, Robertson, AP & Wolstenholme, AJ (2002): Mode of Action of the Macrocyclic Lactones. In: J. Vercruyse and R. S. Rew: *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. Oxon, UK, CAB International: 125-140.
- Martínez-Valladares, M, Geldhof, P, Jonsson, N, Rojo-Vázquez, FA & Skuce, P (2012): *Teladorsagia circumcincta*: Molecular characterisation of the avr-14B subunit and its relatively minor role in ivermectin resistance. *Int J Parasitol: Drugs and Drug Resistance* 2(0), 154-161.
- Maupas, E (1900): Modes et formes de reproduction des nématodes. *Arch Zool Exp et Gén*, 3e série 8, 463-624.
- McCavera, S, Walsh, TK & Wolstenholme, AJ (2007): Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. *Parasitology* 134(Pt 8), 1111-1121.
- McKay, SJ, Johnsen, R, Khattra, J, Asano, J, Baillie, DL, Chan, S, Dube, N, Fang, L, Goszczynski, B, Ha, E, Halfnight, E, Hollebakken, R, Huang, P, Hung, K, Jensen, V, Jones, SJM, Kai, H, Li, D, Mah, A, Marra, M, McGhee, J, Newbury, R, Pouzyrev, A, Riddle, DL, Sonnhammer, E, Tian, H, Tu, D, Tyson, JR, Vatcher, G, Warner, A, Wong, K, Zhao, Z & Moerman, DG (2003): Gene expression profiling of cells, tissues, and developmental stages of the nematode *C. elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68, 159-169.
- McKellar, QA & Gokbulut, C (2012): Pharmacokinetic features of the antiparasitic macrocyclic lactones. *Curr Pharm Biotechnol* 13(6), 888-911.
- McKellar, QA & Jackson, F (2004): Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends Parasitol* 20(10), 456-461.
- Mealey, KL, Bentjen, SA, Gay, JM & Cantor, GH (2001): Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11(8), 727-733.
- Mehlhorn, H & Piekarski, G (2002): Fadenwürmer (Nematodes). *Grundriß der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und der Nutztiere*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag: 285-353.
- Mello, CC, Kramer, JM, Stinchcomb, D & Ambros, V (1991): Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* 10(12), 3959-3970.
- Miller, CM, Waghorn, TS, Leathwick, DM, Candy, PM, Oliver, A-MB & Watson, TG (2012): The production cost of anthelmintic resistance in lambs. *Vet Parasitol* 186(3-4), 376-381.

- Miller, KG, Alfonso, A, Nguyen, M, Crowell, JA, Johnson, CD & Rand, JB (1996): A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. Proc Natl Acad Sci U S A 93(22), 12593-12598.
- Miltsch, SM, Krücken, J, Demeler, J, Janssen, IJ, Krüger, N, Harder, A & von Samson-Himmelstjerna, G (2012): Decreased emodepside sensitivity in *unc-49* gamma-aminobutyric acid (GABA)-receptor-deficient *Caenorhabditis elegans*. Int J Parasitol 42(8), 761-770.
- Molento, MB (2007): Parasite control strategies. Vet Rec 161(8), 280.
- Molento, MB, Antunes, J, Bentes, RN & Coles, GC (2008): Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. Vet Rec 162(12), 384-385.
- Monahan, CM, Chapman, MR, Taylor, HW, French, DD & Klei, TR (1995): Dose titration of moxidectin oral gel against migrating *Strongylus vulgaris* and *Parascaris equorum* larvae in pony foals. Vet Parasitol 60(1-2), 103-110.
- Monahan, CM, Chapman, MR, Taylor, HW, French, DD & Klei, TR (1996): Comparison of moxidectin oral gel and ivermectin oral paste against a spectrum of internal parasites of ponies with special attention to encysted cyathostome larvae. Vet Parasitol 63(3-4), 225-235.
- Monahan, CM & Klei, TR (2002): The Use of Macrocyclic Lactones to Control Parasites of Horses. In: J. Vercruyssen and R. S. Rew: Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy. Oxon, UK, CAB International: 323-337.
- Mottier, L, Alvarez, L, Ceballos, L & Lanusse, C (2006): Drug transport mechanisms in helminth parasites: passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. Exp Parasitol 113(1), 49-57.
- Müller, F, Bernard, V & Tobler, H (1996): Chromatin diminution in nematodes. Bioessays 18(2), 133-138.
- Müller, F & Tobler, H (2000): Chromatin diminution in the parasitic nematodes *Ascaris suum* and *Parascaris univalens*. Int J Parasitol 30(4), 391-399.
- Nadler, SA (1987a): Biochemical and immunological systematics of some ascaridoid nematodes: genetic divergence between congeners. J Parasitol 73(4), 811-816.
- Nadler, SA (1987b): Genetic variability in endoparasitic helminths. Parasitol Today 3(5), 154-155.
- Nare, B, Liu, Z, Prichard, RK & Georges, E (1994): Benzimidazoles, potent anti-mitotic drugs: substrates for the P-glycoprotein transporter in multidrug-resistant cells. Biochem Pharmacol 48(12), 2215-2222.
- Näreaho, A, Vainio, K & Oksanen, A (2011): Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland. Vet Parasitol 182(2-4), 372-377.
- Nazir, A, Sammi, SR, Singh, P & Tripathi, RK (2010): Trans-cellular introduction of HIV-1 protein Nef induces pathogenic response in *Caenorhabditis elegans*. PLoS One 5(12), e15312.
- Nejsum, P, Frydenberg, J, Roepstorff, A & Parker, ED, Jr. (2005): Population structure in *Ascaris suum* (Nematoda) among domestic swine in Denmark as measured by whole genome DNA fingerprinting. Hereditas 142(2005), 7-14.
- Neveu, C, Charvet, CL, Fauvin, A, Cortet, J, Beech, RN & Cabaret, J (2010): Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated transcripts associated with resistance. Pharmacogenet Genomics 20(7), 414-425.
- Nicholls, JM, Clayton, HM, Pirie, HM & Duncan, JL (1978): A pathological study of the lungs of foals infected experimentally with *Parascaris equorum*. J Comp Pathol 88(2), 261-274.
- Nielsen, MK (2012): Sustainable equine parasite control: perspectives and research needs. Vet Parasitol 185(1), 32-44.
- Nielsen, MK, Baptiste, KE, Tolliver, SC, Collins, SS & Lyons, ET (2010): Analysis of multiyear studies in horses in Kentucky to ascertain whether counts of eggs and larvae per gram of feces are reliable indicators of numbers of strongyles and ascarids present. Vet Parasitol 174(1-2), 77-84.
- Njue, AI, Hayashi, J, Kinne, L, Feng, XP & Prichard, RK (2004): Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel alpha3 and beta subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. J Neurochem 89(5), 1137-1147.
- Njue, AI & Prichard, RK (2004): Genetic variability of glutamate-gated chloride channel genes in ivermectin-susceptible and -resistant strains of *Cooperia oncophora*. Parasitology 129(Pt 6), 741-751.

- Nunes, F, Wolf, M, Hartmann, J & Paul, RJ (2005): The ABC transporter PGP-2 from *Caenorhabditis elegans* is expressed in the sensory neuron pair AWA and contributes to lysosome formation and lipid storage within the intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 338(2), 862-871.
- Nwaozuzu, OM, Sellers, LA & Barrand, MA (2003): Signalling pathways influencing basal and H₂O₂-induced P-glycoprotein expression in endothelial cells derived from the blood-brain barrier. *J Neurochem* 87(4), 1043-1051.
- Nyrén, P (2007): The history of pyrosequencing. In: S. Marsh: *Pyrosequencing Protocols*. Totowa, New Jersey, Humana Press. 373: 1-14.
- Omura, S & Crump, A (2004): The life and times of ivermectin - a success story. *Nat Rev Microbiol* 2(12), 984-989.
- Pachnicke, SM (2009): *Molecular Mechanisms Involved in Anthelmintic Resistance*. Tierärztliche Hochschule Hannover. PhD
- Peaty, M (2008): *Parascaris equorum* resistance to moxidectin? *Vet Rec* 162(12), 387.
- Pemberton, DJ, Franks, CJ, Walker, RJ & Holden-Dye, L (2001): Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl- α 2 in the function of the native receptor. *Mol Pharmacol* 59(5), 1037-1043.
- Pérez, R, Cabezas, I, Garcia, M, Rubilar, L, Sutra, JF, Galtier, P & Alvinerie, M (1999): Comparison of the pharmacokinetics of moxidectin (Equest) and ivermectin (Eqvalan) in horses. *J Vet Pharmacol Ther* 22(3), 174-180.
- Pérez, R, Cabezas, I, Sutra, JF, Galtier, P & Alvinerie, M (2001): Faecal excretion profile of moxidectin and ivermectin after oral administration in horses. *Vet J* 161(1), 85-92.
- Perez, R, Godoy, C, Palma, C, Cabezas, I, Munoz, L, Rubilar, L, Arboix, M & Alvinerie, M (2003): Plasma profiles of ivermectin in horses following oral or intramuscular administration. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50(6), 297-302.
- Pilitt, PA, Lichtenfels, JR & Madden, PA (1979): Differentiation of 4th and early 5th stages of *Parascaris equorum* (Goeze, 1782) Nematoda, Ascaridoidea. *Proc Helm Soc Wash* 46(1), 15-20.
- Portillo, V, Jagannathan, S & Wolstenholme, AJ (2003): Distribution of glutamate-gated chloride channel subunits in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *J Comp Neurol* 462(2), 213-222.
- Pouliot, J-F, L'Heureux, F, Liu, Z, Prichard, RK & Georges, E (1997): Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochem Pharmacol* 53(1), 17-25.
- Prichard, R (1994): Anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 54(1-3), 259-268.
- Prichard, R (2008): Mechanisms of anthelmintic resistance: Implications for the future of parasite control. 15th Brazilian Veterinary Parasitology Congress, Curitiba, Brazil.
- Prichard, R, Ménez, C & Lespine, A (2012): Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *Int J Parasitol: Drugs and Drug Resistance* 2(0), 134-153.
- Prichard, RK (1990): Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. *Int J Parasitol* 20(4), 515-523.
- Prichard, RK (2002): Resistance Against Macrocyclic Lactones. In: J. Vercruysse and R. S. Rew: *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. Oxon, UK, CAB International: 163-182.
- Prichard, RK (2007): Ivermectin resistance and overview of the consortium for anthelmintic resistance SNPs. *Expert Opin Drug Discov* 2(Suppl. 1), S41-S52.
- Prichard, RK, Hall, CA, Kelly, JD, Martin, IC & Donald, AD (1980): The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust Vet J* 56(5), 239-251.
- Prichard, RK & Roulet, A (2007): ABC transporters and beta-tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology* 134(Pt 8), 1123-1132.
- Prichard, RK, von Samson-Himmelstjerna, G, Blackhall, WJ & Geary, TG (2007): Foreword: towards markers for anthelmintic resistance in helminths of importance in animal and human health. *Parasitology* 134(Pt 8), 1073-1076.
- Pulliam, JD & Preston, JM (1989): Safety of Ivermectin in Target Animals. In: W. C. Campbell: *Ivermectin and Abamectin*. New York, Springer Verlag: 149-161.
- Pulliam, JD, Seward, RL, Henry, RT & Steinberg, SA (1985): Investigating ivermectin toxicity in colliers. *Vet Med* 80, 33-40.

- Real, R, González-Lobato, L, Baro, MF, Valbuena, S, de la Fuente, A, Prieto, JG, Alvarez, AI, Marques, MM & Merino, G (2011): Analysis of the effect of the bovine adenosine triphosphate-binding cassette transporter G2 single nucleotide polymorphism Y581S on transcellular transport of veterinary drugs using new cell culture models. *J Anim Sci* 89(12), 4325-4338.
- Rehbein, S, Visser, M & Winter, R (2002): Koproskopische Untersuchungen bei Pferden in Deutschland und Österreich. *Pferdeheilkunde* 18, 439-449.
- Rehbein, S, Visser, M & Winter, R (2012): Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. *Parasitol Res* 112(1), 407-413.
- Reinemeyer, CR (2009): Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasit Vectors* 2 (Suppl 2), S8.
- Reinemeyer, CR (2012): Anthelmintic resistance in non-strongylid parasites of horses. *Vet Parasitol* 185(1), 9-15.
- Reinemeyer, CR, Prado, JC, Nichols, EC & Marchiondo, AA (2010): Efficacy of pyrantel pamoate against a macrocyclic lactone-resistant isolate of *Parascaris equorum* in horses. *Vet Parasitol* 171(1-2), 111-115.
- Rew, RS, Urban, JF, Jr. & Douvres, FW (1986): Screen for anthelmintics, using larvae of *Ascaris suum*. *Am J Vet Res* 47(4), 869-873.
- Richter, A & Steuber, S (2010): Antiparasitica. In: H. H. Frey and W. Löscher: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Stuttgart, Enke Verlag: 469-526.
- Riou, M, Koch, C, Delaleu, B, Berthon, P & Kerboeuf, D (2005): Immunolocalisation of an ABC transporter, P-glycoprotein, in the eggshells and cuticles of free-living and parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasitol Res* 96(3), 142-148.
- Rohrer, SP, Birzin, ET, Eary, CH, Schaeffer, JM & Shoop, WL (1994): Ivermectin binding sites in sensitive and resistant *Haemonchus contortus*. *J Parasitol* 80(3), 493-497.
- Ronaghi, M, Uhlén, M & Nyrén, P (1998): A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281(5375), 363, 365.
- Roulet, A, Puel, O, Gesta, S, Lepage, J-F, Drag, M, Soll, M, Alvinerie, M & Pineau, T (2003): MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *Eur J Pharmacol* 460(2-3), 85-91.
- Rufener, L, Kaminsky, R & Mäser, P (2009): In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of beta-tubulin. *Mol Biochem Parasitol* 168(1), 120-122.
- Russell, GJ & Lacey, E (1992): Differential stability of the benzimidazole (BZ)-tubulin complex in BZ-resistant and BZ-susceptible isolates of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* 22(3), 399-402.
- Saier, MH, Jr., Paulsen, IT, Sliwinski, MK, Pao, SS, Skurray, RA & Nikaido, H (1998): Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J* 12(3), 265-274.
- Sangster, N, Batterham, P, Chapman, HD, Duraisingh, M, Le Jambre, L, Shirley, M, Upcroft, J & Upcroft, P (2002): Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *Int J Parasitol* 32(5), 637-653.
- Sangster, NC (1994): P-glycoproteins in nematodes. *Parasitol Today* 10(8), 319-322.
- Sangster, NC (1999): Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int J Parasitol* 29(1), 115-124; discussion 137-118.
- Sangster, NC, Bannan, SC, Weiss, AS, Nulf, SC, Klein, RD & Geary, TG (1999): *Haemonchus contortus*: sequence heterogeneity of internucleotide binding domains from P-glycoproteins and an association with avermectin/milbemycin resistance. *Exp Parasitol* 91(3), 250-257.
- Sauna, ZE, Kim, IW & Ambudkar, SV (2007): Genomics and the mechanism of P-glycoprotein (ABCB1). *J Bioenerg Biomembr* 39(5-6), 481-487.
- Schinkel, AH, Smit, JJM, van Tellingen, O, Beijnen, JH, Wagenaar, E, van Deemter, L, Mol, CAAM, van der Valk, MA, Robanus-Maandag, EC, te Riele, HPJ, Berns, AJM & Borst, P (1994): Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77(4), 491-502.
- Schougaard, H & Nielsen, MK (2007): Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark. *Vet Rec* 160(13), 439-440.

- Schröder, J & Swan, GE (1982): Ivermectin as an antiparasitic agent in horses. *J S Afr Vet Assoc* 53(2), 127-128.
- Schuske, K, Beg, AA & Jorgensen, EM (2004): The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends Neurosci* 27(7), 407-414.
- Seaman, JT, Eagleson, JS, Carrigan, MJ & Webb, RF (1987): Avermectin B1 toxicity in a herd of Murray Grey cattle. *Aust Vet J* 64(9), 284-285.
- Seeger, MA & van Veen, HW (2009): Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* 1794(5), 725-737.
- Seelig, A (1998): A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 251(1-2), 252-261.
- Seelig, A, Blatter, XL & Wohnsland, F (2000): Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: a comparison. *Int J Clin Pharmacol Ther* 38(3), 111-121.
- Sharom, FJ (2006): Multidrug Resistance Protein: P-Glycoprotein. In: G. You and M. E. Morris: *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons: 223-262.
- Sharom, FJ (2011): The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem* 50(1), 161-178.
- Sheps, JA, Ralph, S, Zhao, Z, Baillie, DL & Ling, V (2004): The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol* 5(3), R15.
- Sheriff, JC, Kotze, AC, Sangster, NC & Hennessy, DR (2005): Effect of ivermectin on feeding by *Haemonchus contortus* in vivo. *Vet Parasitol* 128(3-4), 341-346.
- Shilling, RA, Venter, H, Velamakanni, S, Bapna, A, Woebking, B, Shahi, S & van Veen, HW (2006): New light on multidrug binding by an ATP-binding-cassette transporter. *Trends Pharmacol Sci* 27(4), 195-203.
- Shoop, W, Soll, M, Conder, GA, Baker, WJ, Jung, M, Saito, A, Buescher, G, Maurer, M, Graf, JF, Rock, DW, DeLay, RL & Gliddon, MJ (2002): Chemistry, Pharmacology and Safety of the Macrocyclic Lactones. In: J. Vercurysse and R. S. Rew: *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. Oxon, UK, CAB International: 1-96.
- Shoop, WL, Mrozik, H & Fisher, MH (1995a): Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Vet Parasitol* 59(2), 139-156.
- Shoop, WL, Ostlind, DA, Rohrer, SP, Mickle, G, Haines, HW, Michael, BF, Mrozik, H & Fisher, MH (1995b): Avermectins and milbemycins against *Fasciola hepatica*: in vivo drug efficacy and in vitro receptor binding. *Int J Parasitol* 25(8), 923-927.
- Sieghart, W, Fuchs, K, Tretter, V, Ebert, V, Jechlinger, M, Hoyer, H & Adamiker, D (1999): Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int* 34(5), 379-385.
- Simpkin, KG & Coles, GC (1981): The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. *J Chem Tech Biotechnol* 31(1), 66-69.
- Slocombe, JOD, de Gannes, RVG & Lake, MC (2007): Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. *Vet Parasitol* 145(3-4), 371-376.
- Smith, G, Grenfell, BT, Isham, V & Cornell, S (1999): Anthelmintic resistance revisited: under-dosing, chemoprophylactic strategies, and mating probabilities. *Int J Parasitol* 29(1), 77-91; discussion 93-74.
- Southwood, LL, Baxter, GM, Bennett, DG & Ragle, CA (1998): Ascarid impaction in young horses. *Comp Cont Educ Pract* 20(1), 100-106.
- Srihakim, S & Swerczek, TW (1978): Pathologic changes and pathogenesis of *Parascaris equorum* infection in parasite-free pony foals. *Am J Vet Res* 39(7), 1155-1160.
- Srivalli, KMR & Lakshmi, PK (2012): Overview of P-Glycoprotein inhibitors: a rational outlook. *Braz J Pharm Sci* 48(3), 353-367.
- Steel, JW & Wardhaugh, KG (2002): Ecological Impact of Macrocyclic Lactones on Dung Fauna. In: J. Vercurysse and R. S. Rew: *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. Oxon, UK, CAB International: 141-162.
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* ed. The *C. elegans* Research Community. von <http://www.wormbook.org>.

- Stinchcomb, DT, Shaw, JE, Carr, SH & Hirsh, D (1985): Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 5(12), 3484-3496.
- Stoneham, S & Coles, G (2006): Ivermectin resistance in *Parascaris equorum*. *Vet Rec* 158(16), 572.
- Stretton, AO, Cowden, C, Sithigorngul, P & Davis, RE (1991): Neuropeptides in the nematode *Ascaris suum*. *Parasitology* 102 Suppl, S107-116.
- Sulston, JE & Brenner, S (1974): The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1), 95-104.
- Sulston, JE & Horvitz, HR (1977): Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56(1), 110-156.
- Sulston, JE, Schierenberg, E, White, JG & Thomson, JN (1983): The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100(1), 64-119.
- Sutherland, IA, Lee, DL & Lewis, D (1989): Colorimetric assay for the detection of benzimidazole resistance in trichostrongyles. *Res Vet Sci* 46(3), 363-366.
- Tatz, AJ, Segev, G, Steinman, A, Berlin, D, Milgram, J & Kelmer, G (2012): Surgical treatment for acute small intestinal obstruction caused by *Parascaris equorum* infection in 15 horses (2002-2011). *Equine Vet J* 44 Suppl 43, 111-114.
- Taylor, MA, Hunt, KR & Goodyear, KL (2002): Anthelmintic resistance detection methods. *Vet Parasitol* 103(3), 183-194.
- Thomas, H & Coley, HM (2003): Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 10(2), 159-165.
- Tobler, H, Etter, A & Müller, F (1992): Chromatin diminution in nematode development. *Trends Genet* 8(12), 427-432.
- Tompkins, JB, Stitt, LE, Morrissette, AM & Ardelli, BF (2011): The role of *Brugia malayi* ATP-binding cassette (ABC) transporters in potentiating drug sensitivity. *Parasitol Res* 109(5), 1311-1322.
- Torbert, BJ, Kramer, BS & Klei, TR (1982): Efficacy of injectable and oral paste formulations of ivermectin against gastrointestinal parasites in ponies. *Am J Vet Res* 43(8), 1451-1453.
- Traill, P (2008): *Parascaris equorum* resistance to moxidectin? *Vet Rec* 162(15), 491.
- Tritschler, JP, Giordano, DJ & Coles, GC (1986): Use of anthelmintics by New England sheep producers. *J Am Vet Med Assoc* 189(10), 1309-1313.
- Troell, K, Engström, A, Morrison, DA, Mattsson, JG & Höglund, J (2006): Global patterns reveal strong population structure in *Haemonchus contortus*, a nematode parasite of domesticated ruminants. *Int J Parasitol* 36(12), 1305-1316.
- Tydén, E, Morrison, DA, Engström, A, Nielsen, MK, Eydal, M & Höglund, J (2013): Population genetics of *Parascaris equorum* based on DNA fingerprinting. *Infect Genet Evol* 13, 236-241.
- Urban, J, Kokoska, L, Langrova, I & Matejkova, J (2008): *In Vitro* Anthelmintic Effects of Medicinal Plants Used in Czech Republic. *Pharm Biol* 46(10-11), 808-813.
- van Doorn, DCK, Lems, S, Weteling, A, Ploeger, HW & Eysker, M (2007): Resistance of *Parascaris equorum* against ivermectin due to frequent anthelmintic treatment of foals in The Netherlands. *Proc 21st Int Conf World Assoc Adv Vet Parasitol*, Gent, Belgium.
- van Megen, H, van den Elsen, S, Holterman, M, Karssen, G, Mooyman, P, Bongers, T, Holovachov, O, Bakker, J & Helder, J (2009): A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology* 11(6), 927-950.
- van Wyk, JA (2001): Refugia-overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J Vet Res* 68(1), 55-67.
- Vandermyde, CR, DiPietro, JA, Todd, KS, Jr. & Lock, TF (1987): Evaluation of fenbendazole for larvacidal effect in experimentally induced *Parascaris equorum* infections in pony foals. *J Am Vet Med Assoc* 190(12), 1548-1549.
- Vassilatis, DK, Arena, JP, Plasterk, RHA, Wilkinson, HA, Schaeffer, JM, Cully, DF & Van der Ploeg, LHT (1997): Genetic and biochemical evidence for a novel avermectin-sensitive chloride channel in *Caenorhabditis elegans*. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 272(52), 33167-33174.
- Veronesi, F, Fioretti, DP & Genchi, C (2010): Are macrocyclic lactones useful drugs for the treatment of *Parascaris equorum* infections in foals? *Vet Parasitol* 172(1-2), 164-167.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Veronesi, F, Moretta, I, Moretti, A, Fioretti, DP & Genchi, C (2009): Field effectiveness of pyrantel and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms. *Vet Parasitol* 161(1-2), 138-141.
- VICH-Steering-Committee (2000). VICH Guidelines. Efficacy of Anthelmintics: General Requirements, International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. 7: 1-9.
- von Samson-Himmelstjerna, G (2006): Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 136(2), 99-107.
- von Samson-Himmelstjerna, G (2012): Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. *Vet Parasitol* 185(1), 2-8.
- von Samson-Himmelstjerna, G & Blackhall, W (2005): Will technology provide solutions for drug resistance in veterinary helminths? *Vet Parasitol* 132(3-4), 223-239.
- von Samson-Himmelstjerna, G, Blackhall, WJ, McCarthy, JS & Skuce, PJ (2007a): Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. *Parasitology* 134(Pt 8), 1077-1086.
- von Samson-Himmelstjerna, G, Buschbaum, S, Wirtherle, N, Pape, M & Schnieder, T (2003): TaqMan minor groove binder real-time PCR analysis of beta-tubulin codon 200 polymorphism in small strongyles (*Cyathostomum*) indicates that the TAC allele is only moderately selected in benzimidazole-resistant populations. *Parasitology* 127(Pt 5), 489-496.
- von Samson-Himmelstjerna, G, Fritzen, B, Demeler, J, Schürmann, S, Rohn, K, Schnieder, T & Epe, C (2007b): Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Vet Parasitol* 144(1-2), 74-80.
- von Samson-Himmelstjerna, G, Ilchmann, G, Clausen, P-H, Schein, E, Fritzen, B, Handler, J, Lischer, CJ, Schnieder, T, Demeler, J, Reimers, G & Mehn, P (2011): Empfehlungen zur nachhaltigen Kontrolle von Magen-Darmwurminfektionen beim Pferd in Deutschland. *Pferdeheilkunde* 27(2), 127-140.
- von Samson-Himmelstjerna, G, Walsh, TK, Donnan, AA, Carrière, S, Jackson, F, Skuce, PJ, Rohn, K & Wolstenholme, AJ (2009): Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. *Parasitology* 136(3), 349-358.
- Walker, JE, Saraste, M, Runswick, MJ & Gay, NJ (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1(8), 945-951.
- Walsh, TK, Donnan, AA, Jackson, F, Skuce, P & Wolstenholme, AJ (2007): Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. *Vet Parasitol* 144(3-4), 304-312.
- Wandel, C, Kim, RB, Kajiji, S, Guengerich, FP, Wilkinson, GR & Wood, AJJ (1999): P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies. *Cancer Res* 59(16), 3944-3948.
- Wang, J, Mitreva, M, Berriman, M, Thorne, A, Magrini, V, Koutsovoulos, G, Kumar, S, Blaxter, ML & Davis, RE (2012): Silencing of germline-expressed genes by DNA elimination in somatic cells. *Dev Cell* 23(5), 1072-1080.
- Waterston, RH, Sulston, JE & Coulson, AR (1997): The Genome. In: D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess: *C. elegans* II. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 33: 23-46.
- Weiss, E & Rudolph, R (2007): Atmungsorgane. In: E. Dahme and E. Weiss: *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Stuttgart, Enke Verlag: 49-81.
- Welz, C, Krüger, N, Schniederjans, M, Miltsch, SM, Krücken, J, Guest, M, Holden-Dye, L, Harder, A & von Samson-Himmelstjerna, G (2011): SLO-1-channels of parasitic nematodes reconstitute locomotor behaviour and emodepside sensitivity in *Caenorhabditis elegans slo-1* loss of function mutants. *PLoS Pathog* 7(4), e1001330.
- Weston, KM, O'Brien, RW & Prichard, RK (1984): Respiratory metabolism and thiabendazole susceptibility in developing eggs of *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 14(2), 159-164.
- Wharton, D (1980): Nematode egg-shells. *Parasitology* 81(02), 447-463.

- Williamson, SM, Storey, B, Howell, S, Harper, KM, Kaplan, RM & Wolstenholme, AJ (2011): Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 180(2), 99-105.
- Williamson, SM & Wolstenholme, AJ (2012): P-glycoproteins of *Haemonchus contortus*: development of real-time PCR assays for gene expression studies. *J Helminthol* 86(2), 202-208.
- Wolstenholme, AJ (2012): Glutamate-gated chloride channels. *J Biol Chem* 287(48), 40232-40238.
- Wolstenholme, AJ, Fairweather, I, Prichard, R, von Samson-Himmelstjerna, G & Sangster, NC (2004): Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol* 20(10), 469-476.
- Wolstenholme, AJ & Kaplan, RM (2012): Resistance to Macrocyclic Lactones. *Curr Pharm Biotechnol* 13(6), 873-887.
- Wolstenholme, AJ & Rogers, AT (2005): Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology* 131, S85-95.
- Xu, M, Molento, M, Blackhall, W, Ribeiro, P, Beech, R & Prichard, R (1998): Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol Biochem Parasitol* 91(2), 327-335.
- Yan, R, Urdaneta-Marquez, L, Keller, K, James, CE, Davey, MW & Prichard, RK (2012): The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Vet Parasitol* 190(3-4), 519-529.
- Yates, DM, Portillo, V & Wolstenholme, AJ (2003): The avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol* 33(11), 1183-1193.
- Ye, Z & Van Dyke, K (1988): Reversal of chloroquine resistance in falciparum malaria independent of calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 155(1), 476-481.
- Zhao, Z, Sheps, JA, Ling, V, Fang, LL & Baillie, DL (2004): Expression analysis of ABC transporters reveals differential functions of tandemly duplicated genes in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 344(2), 409-417.
- Zhao, Z, Thomas, JH, Chen, N, Sheps, JA & Baillie, DL (2007): Comparative genomics and adaptive selection of the ATP-binding-cassette gene family in *Caenorhabditis* species. *Genetics* 175(3), 1407-1418.
- Zhou, SF (2008): Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 38(7-8), 802-832.
- Zinser, EW, Wolf, ML, Alexander-Bowman, SJ, Thomas, EM, Davis, JP, Groppi, VE, Lee, BH, Thompson, DP & Geary, TG (2002): Anthelmintic paraherquamides are cholinergic antagonists in gastrointestinal nematodes and mammals. *J Vet Pharmacol Ther* 25(4), 241-250.

7 LITERATURVERZEICHNIS

8 ANHANG

8.1 Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen mittels Pyrosequenzierung

Tabelle 2: Sequenzen der Primer für die Amplifikation und Sequenzierung des SNP-tragenden Bereiches von *Peppgp-11* im Rahmen der Pyrosequenzierung

Name des Primers	Sequenz (5'→3')	Größe des PCR-Produktes
Pgp11Pyrofor+	Biotin-GGA ACA AGT GCG TAC GAT CC	-
Pgp11Pyrofor	GGA ACA AGT GCG TAC GAT CC	-
Pgp11Pyrorev	CAT CGC TGA GGC AAA GAC T	235
Pgp11Pyro2791rev	GGC ATC GAG TTT CCC	76
Pgp11Pyro2852rev	TGC CAT TGT GAT AGT GA	139
Pgp11Pyro2932rev	TTC GTC TGC CTT AGC	217

Tabelle 3: Gemessene Allelfrequenzen^a von *Peqpgp-11* nach dem Einsatz definierter Plasmidmischungsverhältnisse

Mischungs- verhältnis	N ^b	Position 2791			N ^b	Position 2852			N ^b	Position 2932		
100	G	93	96	96	G	98	91	95	T	68	60	60
0	A	7	4	4	C	2	9	5	C	32	40	40
90	G	74	89	94	G	91	86	87	T	59	61	61
10	A	26	11	6	C	9	14	13	C	41	39	39
80	G	76	83	84	G	82	79	81	T	56	52	58
20	A	24	17	16	C	18	21	19	C	44	48	42
70	G	68	73	78	G	73	71	70	T	47	48	53
30	A	32	27	22	C	27	29	30	C	53	52	47
60	G	61	72	72	G	62	65	64	T	45	43	49
40	A	39	28	28	C	38	35	36	C	55	57	51
50	G	54	65	62	G	54	57	58	T	37	38	42
50	A	46	35	38	C	46	43	42	C	63	62	58
40	G	47	54	54	G	43	44	53	T	33	30	37
60	A	53	46	46	C	57	56	47	C	67	70	63
30	G	37	41	44	G	32	42	43	T	25	29	30
70	A	63	59	56	C	68	58	57	C	75	71	70
20	G	20	62	30	G	22	24	29	T	22	36	20
80	A	80	38	70	C	78	76	71	C	78	64	80
10	G	21	15	15	G	7	14	15	T	12	8	9
90	A	79	85	85	C	93	86	85	C	88	92	91
0	G	9	0	3	G	0	6	5	T	4	8	5
100	A	91	100	97	C	100	94	95	C	96	92	95

^a Angaben in Prozent^b Nukleotid

8.1 Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen mittels Pyrosequenzierung

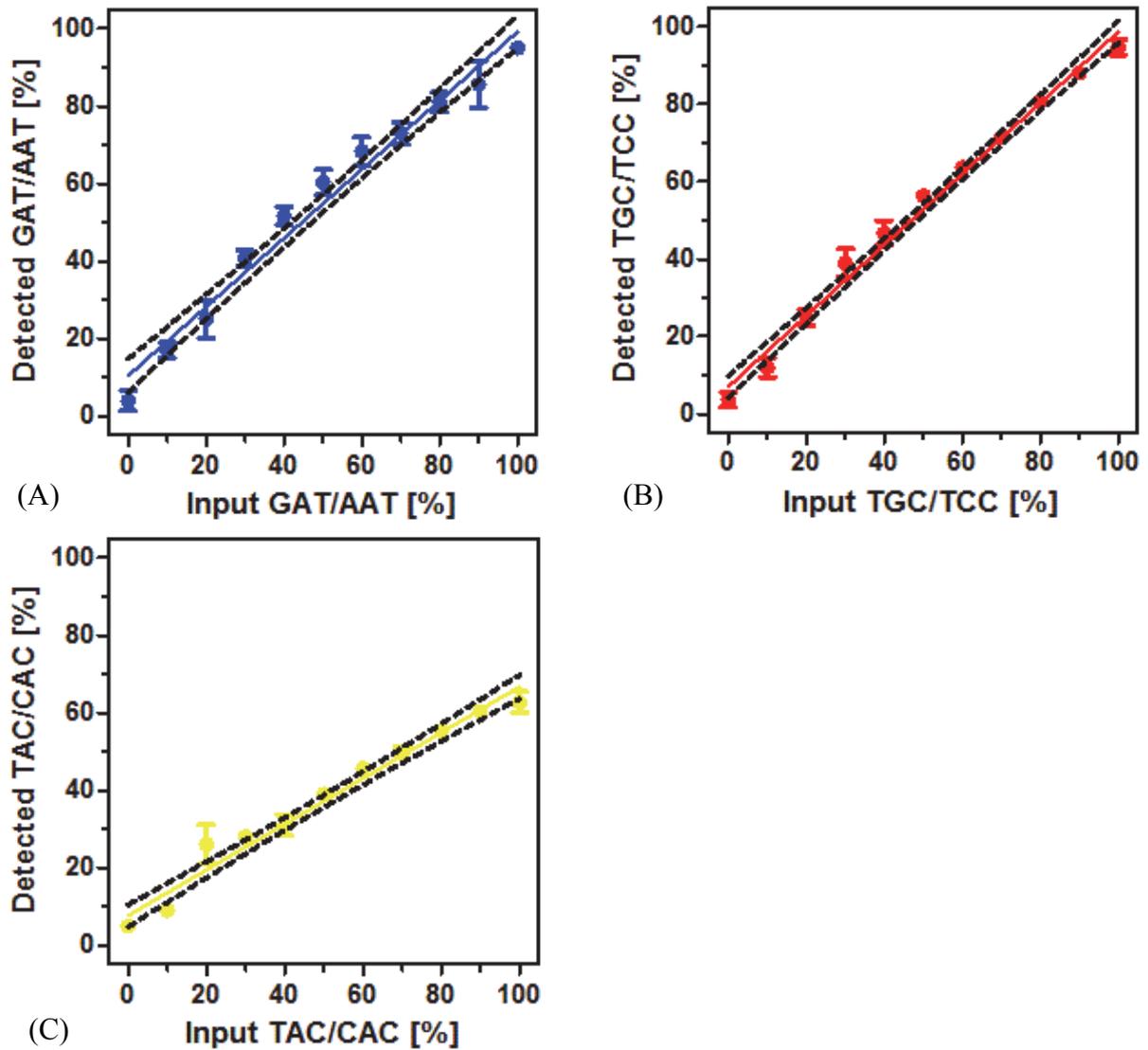


Abbildung 7: Lineare Korrelation zwischen dem eingesetzten Plasmidmischungsverhältnis und dem mittels Pyrosequenzierung detektierten Mischungsverhältnis für die drei ermittelten Einzelnukleotidpolymorphismen. Während für Codon 931 (A) und Codon 951 (B) eine hohe Korrelation zwischen dem errechneten und dem ermittelten Mischungsverhältnis erzielt werden konnte, konnten für Codon 978 (C) keine zufriedenstellenden Ergebnisse generiert werden. Auch hier war der Korrelationskoeffizient sehr hoch, die Steigung der Ausgleichsgeraden aber mit ca. $\alpha = 0,5905$ unbefriedigend niedrig. (A) $y = 10,44 + 0,8871 \times x$, $R^2 = 0,954$; (B) $y = 7,015 + 0,9161 \times x$, $R^2 = 0,9804$; (C); $y = 7,643 + 0,5905 \times x$, $R^2 = 0,9455$

Tabelle 4: Allelfrequenzen^a von *PeqPgp-11* unterschiedlicher *Parascaris equorum*-Populationen

Position	N ^b	Population A		Population B2		Population C		Population D		Population E	
2791	T	71	70	30	29	36	37	4	5	6	6
	C	29	30	70	71	64	63	96	95	94	94
2852	G	74	73	29	26	31	30	2	2	1	2
	C	26	27	71	74	69	70	98	98	99	98

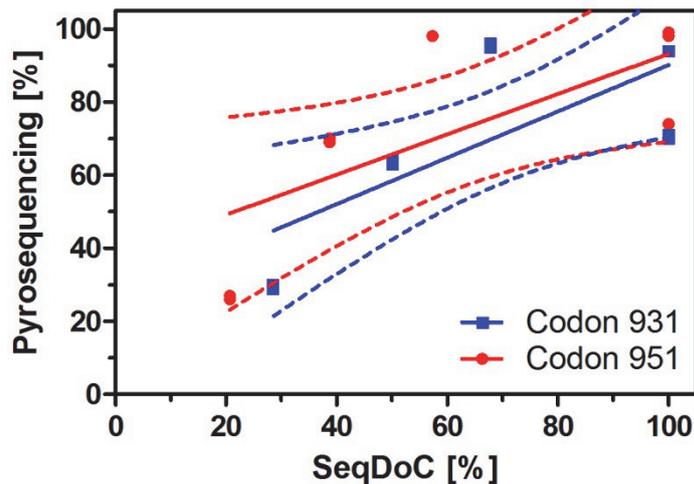
^a Angaben in Prozent^b Nukleotid

Abbildung 8: Lineare Regressionsgerade (Codon 931: $y = 26,71 + 0,634 \times x$; Codon 951: $y = 38,14 + 0,5504 \times x$) und 95 %-Konfidenzintervall zwischen den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung und der Pyrosequenzierung in Prozent. Es zeigt sich eine signifikante positive Korrelation (Codon 931: $p = 0,015$; Codon 951: $p = 0,0332$) zwischen der mit Hilfe der beiden Methoden ermittelten Allelhäufigkeiten bei der Untersuchung des Pgp-11 verschiedener Populationen von *Parascaris equorum*. Codon 931: $R^2 = 0,544$; Codon 951: $R^2 = 0,452$.

8.2 Funktionale Expression von *PeqPgp-11* in *tm0333*

Tabelle 5: Sequenzen der Primer und Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) für die Amplifikation des Promotors von *Caenorhabditis elegans*, des Pgp-11 von *Parascaris equorum* und der *unc54*-3'-UTR von *Caenorhabditis elegans* zur Ligation in den Expressionsvektor

Name des Primers	Sequenz (5'→3')	Größe des PCR-Produktes
<i>CelPromPgp-11-NotI-Se</i>	<u>GCG GCC GCA</u> GTC AGG TGT CCT CTT TAT-TGA GGG	3084 bp
<i>CelPromPgp-11-ApaI-AS</i>	GGG CCC GTT CTC TTA AAT ACA CAC TGA- <u>ATT TGA</u> G	
<i>PeqPgp-11-ApaI-Se</i>	<u>GGG CCC AAA</u> ATG GAA CTG GAA GCA AAA-CAA CCA GTT GG	3858 bp
<i>PeqPgp-11-SfiI-AS</i>	<u>GGC CTT TTT GGC</u> CTC ACG ACG TGA GGT-CCT GCT TTC GG	
<i>Cel3UTR-SfiI-Se</i>	<u>GGC CAA AAA GGC</u> CCA TCT CGC GCC CGT-GCC TCT	735 bp
<i>Cel3UTR-SbfI-AS</i>	<u>CCT GCA GGA AAC</u> AGT TAT GTT TGG TAT-ATT GGG AAT	

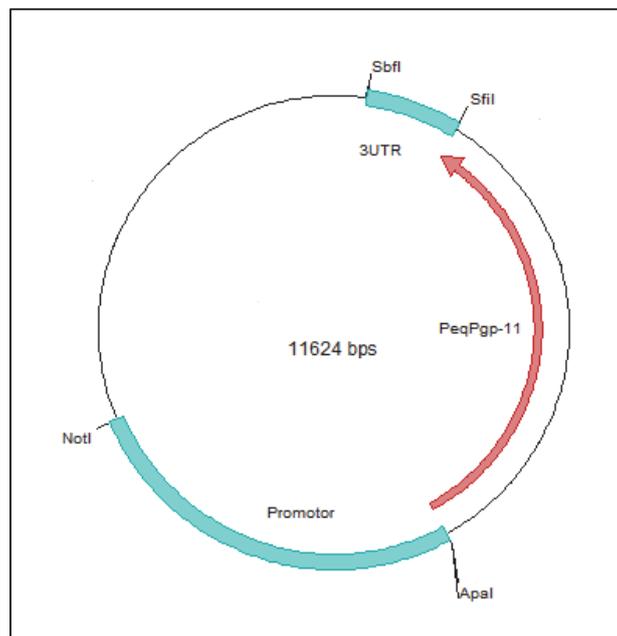


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Restriktionsenzymstellen *NotI*, *ApaI*, *SfiI* und *SbfI* im modifizierten Vektor pCR[®]4-TOPO[®] nach der Ligation der Pgp-11-Sequenz von *Parascaris equorum* sowie der Promotor- und 3'-UTR-Sequenz von *Caenorhabditis elegans*.

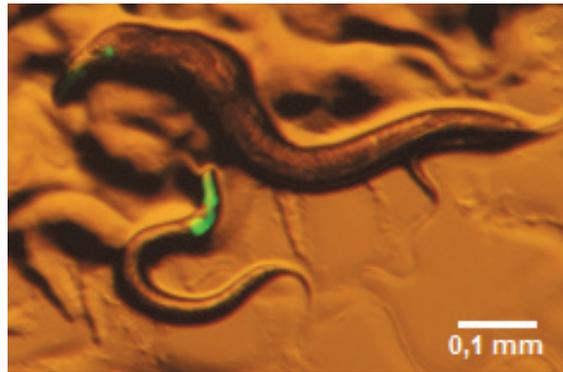


Abbildung 10: Larve (unten) und junger adulter Wurm (oben) von *Caenorhabditis elegans*. Die transgenen Würmer sind anhand der GFP-Expression im Bereich des Pharynx zu identifizieren.

Tabelle 6: Bewegungsaktivität transgener Linien von *Caenorhabditis elegans* nach Ivermectin-Inkubation

Linie	Genotyp	EC ₅₀ -Wert (95 %-KI ^a) [nm]	R ^{2b}	Anstieg gegenüber der Kontrolllinie ^c
Kontrolllinie	-	1,249 (1,021-1,527)	0,7074	-
Linie B	<i>PeqPgp-11</i>	5,15 (4,595-5,771)	0,7777	4,123
Linie D	<i>PeqPgp-11</i>	5,783 (2,086-16,04)	0,6928	4,63

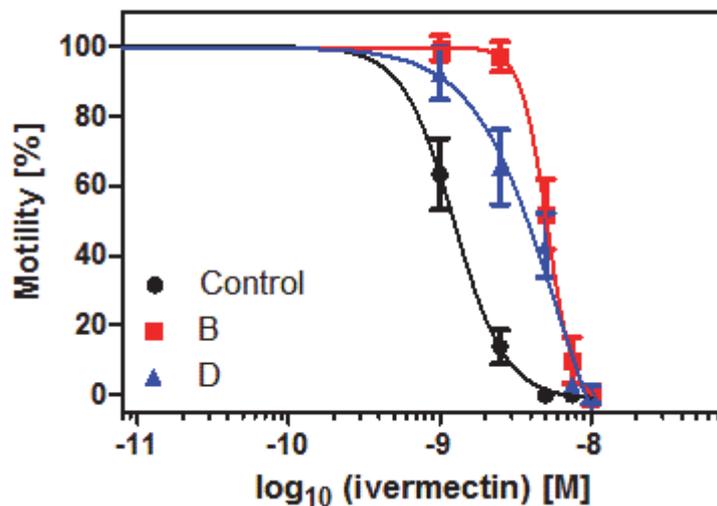
^a 95 %-Konfidenzintervall^b Bestimmtheitsmaß^c Verhältnis des EC₅₀-Wertes der Linie B bzw. D zur Kontrolllinie

Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurven des Einflusses von Ivermectin auf die Bewegungsaktivität des transgenen *Caenorhabditis elegans*-Stammes *tm0333*. Der Kontrolllinie (Control) wurde zuvor ein Plasmid injiziert, dem die Sequenz für *PeqPgp-11* fehlte, während das den Linien B und D überführte Plasmid dieses Gen neben einer Promotor- und 3'-UTR-Sequenz enthielt. Die Bewegung wurde anhand der ausgeführten Schwimmbewegungen pro Minute ermittelt.

8.3 Avermectin Derivate

Tabelle 7: Chemische Unterscheidung der Avermectin Derivate

Bindung zwischen C-22, C-23	C-23- Substituent	C-25- Substituent	C-5- Substituent	Derivat
Doppelbindung	-H	<i>sec</i> -Butyl	-OCH ₃	Avermectin-A _{1a}
			-OH	Avermectin-B _{1a}
		<i>iso</i> -Propyl	-OCH ₃	Avermectin-A _{1b}
			-OH	Avermectin-B _{1b}
Einfachbindung	-OH	<i>sec</i> -Butyl	-OCH ₃	Avermectin-A _{2a}
			-OH	Avermectin-B _{2a}
		<i>iso</i> -Propyl	-OCH ₃	Avermectin-A _{2b}
			-OH	Avermectin-B _{2b}

8.4 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Å	Ångström
ABC-Transporter	<i>ATP-binding-Cassette-Transporter</i>
ABM	Abamectin
Acc. No.	Zugriffsschlüssel/ <i>Accession Number</i>
ACh	Acetylcholin
<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AVM	Avermectin
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
<i>B. malayi</i>	<i>Brugia malayi</i>
BZ	Benzimidazol
C	Kohlenstoffatom
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA/ <i>complementary DNA</i>
<i>C. oncophora</i>	<i>Cooperia oncophora</i>
Cl ⁻	Chloridion
<i>C. briggsae</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	Caenorhabditis Genetics Center
d	Tag/Dies
<i>D. immitis</i>	<i>Dirofilaria immitis</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRM	Doramectin
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
Dyf	<i>Dye filling</i>
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
Epg	Eier pro Gramm Kot
EPM	Eprinomectin
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FEC	<i>Faecal Egg Count</i>
FECRT	Eizahlreduktionstest/ <i>Faecal Egg Count Reduction Test</i>
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFP	<i>Aequorea victoria</i> grün fluoreszierendes Protein
GluCl	Glutamat-gesteuerter Chloridionenkanal
h	Stunde/hora
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
IVM	Ivermectin
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
L1, L2, L3, L4	erste, zweite, dritte, vierte Larve
LDA	Larvenentwicklungstest/ <i>Larval Development Assay</i>
LEV	Levamisol
LFIA	Larven/ <i>Larval Feeding Inhibition Assay</i>
Mbp	Megabasenpaare

MDR	Mehrfachresistenz/ <i>Multidrug Resistance</i>
MDR1	<i>Multidrug-Resistance-Protein 1</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
ML	makrozyklische Laktone
MMT	<i>Micromotility Meter Test</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	<i>Mean Residence Time</i>
MOX	Moxidectin
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NBRP	National Bioresource Project for the Experimental Animal "Nematode <i>C. elegans</i> "
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
OIE	World Organisation for Animal Health
<i>O. volvulus</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion/ <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>P. equorum</i>	<i>Parascaris equorum</i>
<i>P. univalens</i>	<i>Parascaris univalens</i>
Pgp	P-Glykoprotein
P _i	anorganisches Phosphat
p. i.	post infectionem
p. o.	per os
PYR	Pyrantel
R ²	Bestimmtheitsmaß
RACE -PCR	<i>Rapid Amplification of cDNA-Ends with Polymerase Chain Reaction</i>
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
SeqDoC	<i>Sequence-Difference-of-Chromatogramms</i>
SLM	Selamectin
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus/ <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
T	Thymin
<i>T. circumcincta</i>	<i>Teladorsagia circumcincta</i>
TMH	Transmembranhelix
TMP	Trimethylpsoralen
unc	<i>uncoordinated</i>
UV	Ultraviolett-Strahlung
VPL	Verapamil
WAAVP	World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology
ZNS	Zentralnervensystem

8.5 Liste der Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Typtophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

8.6 Veröffentlichungen

8.6.1 Publikationen

Janssen IJI, Krücken J, Demeler J, Basiaga M, Kornaś S, von Samson-Himmelstjerna G. (2013), Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility, PLoS One, 8 (4). doi: 10.1371/journal.pone.0061635

Janssen IJI, Krücken J, Demeler J, von Samson-Himmelstjerna G. (2013), *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains, Exp Parasitol, 134 (2). doi: 10.1016/j.exp para.2013.03.005

Janssen Jana I. et al. (2011), Empfindlichkeit von *Parascaris equorum* gegenüber makrozyklischen Laktonen, VetMedReport Organ für tierärztliche Fortbildungskongresse, Wiley-Blackwell

8.6.2 Präsentationen

J. Janssen, J. Krücken, J. Demeler, G. von Samson-Himmelstjerna (2012), Genetic variability of P-glycoproteins in *Parascaris equorum* populations of different ivermectin susceptibility, Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP), Heidelberg, Deutschland, 14.-17. März 2012

J. Janssen, J. Krücken, J. Demeler, G. von Samson-Himmelstjerna (2011), Comparison of P-glycoproteins between *Parascaris equorum* populations to identify single-nucleotide polymorphisms correlating with macrocyclic lactone resistance, 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), Buenos Aires, Argentinien, 21.-25. August 2011

J. Janssen, J. Krücken, S. Kornaś, J. Demeler, G. von Samson-Himmelstjerna (2011), Macrocyclic lactone resistance in *Parascaris equorum*: Search for candidate genes by Transcriptomics and scanning for SNPs in Pgp genes, Consortium for Anthelmintic Resistance SNPs (CARS) Workshop, Buenos Aires, Argentinien, 21. August 2011

J. Janssen, J. Krücken, J. Demeler, G. von Samson-Himmelstjerna (2011), Unterschiede in der P-Glykoprotein Primärstruktur bei Populationen von *Parascaris equorum* mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber Makrozyklischen Laktonen, Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, Berlin, Deutschland, 04.-06. Juli 2011

J. Janssen, J. Krücken, G. von Samson-Himmelstjerna (2010), The Importance of P-glycoprotein associated Mechanisms of Resistance to Macrocyclic Lactones in the Horse-Roundworm *Parascaris equorum*, 4th Short Course for Young Parasitologists, Düsseldorf, 13.-16.03.2010

8.6.3 Poster

J. Janssen, J. Krücken, J. Demeler, G. von Samson-Himmelstjerna (2010), **Bioinformatical analysis and genetic diversity of P-glycoproteins in ivermectin-susceptible and resistant *Parascaris equorum***, Molecular and cellular biology of helminth parasites VI, Hydra, Greece, 05.-10. September 2010

J. Janssen, J. Krücken, G. von Samson-Himmelstjerna (2010), **Cloning and bioinformatical analysis of *Parascaris equorum* P-glycoprotein sequences**, Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP), 16.-20.03.2010

8.6.4 Weitere Veröffentlichungen

Janssen J, Kaschny M, Demeler J, Ramünke S, Burton T, Besognet B, Kanellos T, Kerboeuf D, von Samson-Himmelstjerna G, Krücken J (2013), **P-Glycoproteins in macrocyclic lactone resistance of equine parasitic nematodes: Functional analysis of putative resistance markers using a yeast expression system**, 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), Perth, Australien, 25.-29. August 2013

I.J.I. Janssen, J. Krücken, J. Demeler, S. Ramünke, T. Burton, M. Basiaga, S. Kornaś, G. von Samson-Himmelstjerna (2013), **Korrelation von P-Glykoprotein-11-Allelfrequenzen und Expressionslevel mit verminderter Ivermectin-Suszeptibilität: Entwicklung von Pyrosequenzierungsassays**, Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, Gießen, Deutschland, 08.-10. Juli 2013

Miltsch SM, Krücken J, Demeler J, **Janssen IJI**, Krüger N, Harder A, von Samson-Himmelstjerna G. (2012), **Decreased emodepside sensitivity in unc-49 γ -aminobutyric acid (GABA)-receptor-deficient *Caenorhabditis elegans***, Int J Parasitol, 42 (8). doi: 10.1016/j.ijpara.2012.05.009

E. Tyden, A. Engström, **J. Janssen**, G. von Samson-Himmelstjerna, J. Höglund (2011), **Population genetics of *Parascaris equorum* based on AFLP marker technique**, 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), Buenos Aires, Argentinien, 21.-25. August 2011

J. Krücken, **J. Janssen**, S. Kornas, G. von Samson-Himmelstjerna (2011), **Characterisation of the *Parascaris equorum* transcriptome**, 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), Buenos Aires, Argentinien, 21.-25. August 2011

J. Krücken, **J. Janssen**, S. Kornas, G. von Samson-Himmelstjerna (2011), **Charakterisierung des Transkriptoms des Pferdespulwurms *Parascaris equorum***, Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, 04.-06. Juli 2011

J. Demeler, J. Krücken, S. Al-Gusbi, **J. Janssen**, D. Kerboeuf, G. von Samson-Himmelstjerna (2010), **Nematode P-glycoproteins as mediators of unspecific resistance against**

macrocyclic lactones and other anthelmintics, Molecular and cellular biology of helminth parasites VI, Hydra, Greece, 05.-10. September 2010

9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Im Rahmen meiner Dissertation wurde es mir ermöglicht, zahlreiche Arbeitsmethoden und Techniken kennenzulernen und die hierbei erworbenen Ergebnisse auf vielen Fachtagungen vorzustellen, wofür ich mich ebenfalls herzlich bedanken möchte. Des Weiteren möchte ich mich für die motivierenden und jederzeit freundlichen Worte bedanken. Vielen Dank.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier und Herrn Prof. Dr. Richard Lucius danke ich für die anregenden Diskussionen und die Denkanstöße, durch die sie es mir ermöglicht haben, auch neue Aspekte des Projektes zu berücksichtigen und zu hinterfragen.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jürgen Krücken für seine unermüdliche Unterstützung und seine jederzeit offene Tür, durch die ich mit zahlreichen guten und auch weniger guten Nachrichten zu ihm kommen konnte und für die wir auch (fast) immer eine Lösung finden konnten.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Janina Demeler, für ihre Anregungen und hilfreichen Ratschläge.

Furthermore, I want to thank Dr. hab. Slawomir Kornaś for his help in Krakow.

Mein Dank gilt ebenfalls der Dahlem Research School für die finanzielle Förderung und die Möglichkeit, mein Wissen auch in anderen nicht „Labor-assoziierten“ Bereichen zu erweitern.

Frau Prof. Dr. Christina Strube, Sandra Buschbaum und Ulla Küttler des Instituts für Parasitologie der TiHo Hannover möchte ich dafür danken, dass sie mich bei meinen ersten Schritten in den Irrungen und Wirrungen der Molekularbiologie begleitet haben.

Außerdem möchte ich mich bei den technischen Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin, sowie, selbstredend, bei den vielen, vielen Paradoxs bedanken, die zu einer unvergesslichen Zeit beigetragen haben. Dank dieser Kollegen war die Zeit inner- und außerhalb der Laborwände immer höchst abwechslungsreich. Es hat unglaublichen Spaß gemacht, mit Euch zusammenzuarbeiten. Es war mir eine Ehre.

Wem ich außerdem ganz besonders danken möchte, ist meiner Familie! Meinen Eltern, Franca, Arne, Eva, Mila, Nele und unserem Kater, die alle immer mit viel Gleichmut, Anteilnahme und Verständnis meine zahlreichen Anrufe und Besuche „erduldet“ haben, v. a. auch in Zeiten, in denen ich mal wieder gedacht habe, es klappt nichts mehr.

Vielen, vielen, vielen Dank, ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

9 DANKSAGUNG

10 ERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 05.12.2013

Jana Janssen