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

Identifizierung und Charakterisierung von P-Glykoproteinen in kleinen Strongyliden

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Maximiliane Kaschny Tierärztin aus Königs Wusterhausen

Berlin 2017 Journal-Nr.: 3943

mbvberlin -I--I- mensch und buch verlag

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

Identifizierung und Charakterisierung von P-Glykoproteinen in kleinen Strongyliden

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Maximiliane Kaschny Tierärztin **aus** Königs Wusterhausen

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3943

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	UnivProf. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	UnivProf. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna
Zweiter Gutachter:	UnivProf. Dr. Ralf Einspanier
Dritter Gutachter:	UnivProf. Dr. Salah Amasheh

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Cylicocylcus elongatus, Cylicoyclus insigne, Cylicostepahnus goldi, Saccharomyces cerevisiae, plasmids, DNA, RNA, polymerase chain reaction, electrophoresis, genetic analysis

Tag der Promotion: 12.09.2017

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

ISBN: 978-3-86387-910-5 **Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017** Dissertation, Freie Universität Berlin D188

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 Warenzeichenund 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 2018 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	Abbildungen	IV
	Tabellen	VI
	Abkürzungen	VIII
	Einheiten	Х
1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	3
2.1.	Cyathostominae – kleine Strongyliden	3
2.1.1.	Vorkommen und Bedeutung	4
2.1.2.	Morphologie	5
2.1.3.	Entwicklung	5
2.1.4.	Klinik und anthelminthische Therapie	7
2.2.	Anthelminthika und Resistenzen in Nematoden	9
2.2.1.	Benzimidazole	13
2.2.2.	Tetrahydropyridmidine	17
2.2.3.	Makrozyklische Laktone	20
2.3.	Anthelminthikaresistenz in kleinen Strongyliden	25
2.4.	P-Glykoprotein	29
2.4.1.	Struktur und Funktion	29
2.4.2.	P-Glykoproteine in Nematoden	30
2.4.3.	P-Glykoproteine und Anthelminthikaresistenz	32
3.	Zielsetzung	35
4.	Material und Methoden	36
4.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	36
4.2.	Software	37
4.3.	Reaktionskits	38
4.4.	Chemikalien und Enzyme	38
4.5.	Puffer und Lösungen	39
4.6.	Biologisches Material	40
4.6.1.	Bakterienstämme	40
4.6.2.	Hefestämme	40
4.6.3.	Plasmide	41
4.6.4.	Parasiten	41
4.7.	Isolation von Gesamt-RNA	42
4.7.1.	RNA aus Parasiten	42
4.7.2.	RNA aus Hefezellen	43

4.8.	DNase Verdau der RNA	43
4.9.	Erststrang-cDNA-Synthese	44
4.10.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
4.10.1.	Primer	45
4.10.2.	Synthese von Oligonukleotiden	46
4.10.3.	PCR mit degenerierten Primern	46
4.10.4.	3'-RACE	48
4.10.5.	5'-RACE	49
4.10.6.	PCR zur Amplifikation vollständiger Pgp-Sequenzen C. elongatus	51
4.10.7.	PCR zur Amplifikation vollständiger Pgp-Sequenzen C. insigne und C. goldi	53
4.10.8.	Mutagense der Pgp-Sequenz für die Transformation	54
4.10.9.	Anfügen von A-Überhängen an ein blunt-end PCR-Produkt	56
4.10.10.	PCR zum Nachweis der Pgp-Transkription in transformierten Hefezellen	57
4.11.	Agarosegelelektrophorese	58
4.12.	DNA-Aufreinigung und Alkoholfällung	59
4.13.	Klonierung von DNA-Sequenzen in chemisch-kompetente E. coli	60
4.14.	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	60
4.15.	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	61
4.16.	Bioinformatische Methoden	61
4.16.1.	Sequenzbearbeitung und -vergleich	61
4.17.	Heterologe Expression von Pgp und β -Galactosidase in S. cerevisiae	64
4.17.1.	Kultivierung von S. cerevisiae-Stämmen	64
4.17.2.	Transformation von kompetenten Hefenzellen	65
4.17.3.	Induktion der Proteinexpression in transformierten Hefezellen	65
4.17.4.	Erstellung von Wachstumskurven	66
4.17.5.	Statistische Auswertung der Wachstumsdaten	69
4.18.	Proteinisolation aus Hefezellen	70
4.19.	Bestimmung der Proteinmenge	71
4.20.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	71
4.20.1.	Vorbereitung der Proben	71
4.20.2.	SDS-Page	72
4.20.3.	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung	72
4.21.	Proteintransfer auf eine Membran und Immundetektion (Western Blot)	73
4.21.1.	Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran	73
4.21.2.	Immundetektion	73
4.22.	Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Proteinexpression in S. cerevisiae	74

5.	Ergebnisse	76
5.1.	Molekulare Identifizierung von P-Glykoproteinen in kleinen Strongyliden	76
5.1.1.	Cylicocyclus elongatus Pgp-3	76
5.1.2.	Cylicocyclus elongatus Pgp-9	79
5.1.3.	Phylogenie der identifizierten P-Glykoproteine	82
5.2.	Heterologe Expression von CegPgp-3 und -9 in S. cerevisiae	84
5.2.1.	Nachweis der Transkription der cDNA	84
5.2.2.	Nachweis der Expression rekombinanter Proteine	87
5.3.	P-Glykoprotein-Expression und Wirkstoffsuzeptibilität	90
5.3.1.	Vergleich der Wirkung von KCON zwischen transformierten Hefestämmen	90
5.3.2.	Vergleich der Wirkung von TBZ zwischen transformierten Hefestämmen	93
5.3.3.	Einfluss von makrozyklischen Laktonen auf die KCON-Suszeptibilität	94
6.	Diskussion	103
6.1.	Identifzierung von Pgp-Sequenzen	104
6.2.	Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>	107
6.3.	Etablierung des <i>S. cerevisiae</i> -Wachstumsassays	111
6.4.	Wachstumsergebnisse	113
7.	Ausblick	120
8.	Anhang	121
9.	Zusammenfassung	139
10.	Summary	141
11.	Bibliographie	143
12.	Publikationsverzeichnis	171
13.	Danksagung	172
14.	Selbstständigkeitserklärung	173

Abbildungen

Abb. 1 : Schematische Darstellung der bekannten und in dieser Arbeit amplifizierten PCR-Produkte und ihre Lage in der vollständigen mRNA- Sequenz von <i>Ceg</i> Pgp-3.	76
Abb. 2 : Darstellung der Proteinmotive innerhalb der mRNA der identifizierten Pgps.	79
Abb. 3 : Schematische Darstellung der bekannten und in dieser Arbeit amplifizierten PCR-Produkte und ihre Lage in der vollständigen mRNA-Sequenz von <i>Ceg</i> Pgp-9.	80
Abb. 4: Phylogenetischer Stammbaum der Pgps.	83
Abb. 5 : Transkriptionsnachweis von <i>Ceg</i> Pgp-3 und Pgp-9 in <i>S. cerevisiae</i> AD1-7 und JRY8012.	86
Abb. 6: Ergebnis der Scanning-Analyse für AD1-7 mit CegPgp-9 V5/6×His.	89
Abb. 7 : KonzWirkungskurve von JRY8012 mit LacZ und <i>Ceg</i> Pgp-3-Expression unter KCON-Einfluss.	91
Abb. 8 : KonzWirkungskurve von JRY8012 mit LacZ und <i>Ceg</i> Pgp-9-Expression unter KCON-Einfluss.	92
Abb. 9 : KonzWirkungskurve für AD1-7 mit LacZ und <i>Ceg</i> Pgp-9/ <i>Ceg</i> Pgp-9 V5/6×His-Expression unter KCON-Einfluss.	93
Abb. 10 : KonzWirkungskurve von TBZ getestet in AD1-7 mit LacZ und <i>Ceg</i> Pgp-9.	93
Abb. 11: Einfluss von IVM auf das Hefewachstum.	95
Abb. 12 : Darstellung des rel. Wachstums (+/- SEM) von AD1-7 <i>Ceg</i> Pgp-9 und LacZ unter Einfluss von IVM mit und ohne Zusatz von 0,73 μ M bzw. 0,18 μ M KCON.	96
Abb. 13 : Wachstumsergebnisse von AD1-7 <i>Ceg</i> Pgp-9 und LacZ unter Einfluss von EPM.	97
Abb. 14 : Darstellung des rel. Wachstums +/- SEM von AD1-7 <i>Ceg</i> Pgp-9 und LacZ unter Einfluss von EPM mit und ohne Zusatz von 0,73 μ M bzw. 0,18 μ M KCON.	98
Abb. 15 : Wachstumsergebnisse von AD1-7 <i>Ceg</i> Pgp-9 und LacZ unter Einfluss von MOX.	99

Abb. 16: Darstellung des rel. Wachstums +/- SEM von AD1-7 CegPgp-9 und	
LacZ unter Einfluss von MOX mit und ohne Zusatz von 0,73 µM bzw. 0,18 µM	100
KCON.	
Abb. 17: Darstellung des Effekts auf das rel. Wachstum von AD1-7 mit	
CegPgp-9 und LacZ durch IVM, EPM und MOX ohne und mit Zusatz von 0,73	102
μM bzw. 0,18 μM KCON.	

Tabellen

Tabelle 1 : Übersicht der Länder in alphabetischer Reihenfolge mitnachgewiesenen Resistenzen kleiner Strongyliden.	25
Tabelle 2 : Übersicht über verwendete Primer zur Amplifikation der Zielgenemit Annealingtemperatur, Elongationszeit und Polymerase.	45
Tabelle 3 : PCR-Protokolle f ür RT-PCR mit degenerierten Primern zurAmplifizierung von Teilsequenzen von CegPgp-3 und CegPgp-9.	47
Tabelle 4 : PCR-Protokolle der 3'-RACE zur Amplifzierug des 3'-Endes von <i>Ceg</i> Pgp-3 und –Pgp-9.	49
Tabelle 5 : PCR-Protokolle der 5'-RACE zur Amplifizierung des 5'-Endes vonCegPgp-3 und CegPgp-9.	51
Tabelle 6 : Die angewendeten PCR-Protokolle mit dem Primerpaaren zurAmplifizierung der Volllängensequenzen von CegPgp-3 und CegPgp-9.	52
Tabelle 7 : PCR-Protokolle der Volllängenamplifizierung von Pgp-3 in C. <i>insigne</i> und C. goldi.	54
Tabelle 8 : Verwendete Primer und die durchgeführten PCR-Protokolle zurAmplifizierung der mutagenisierten Vollängensequenzen von CegPgp-3 und -9für die Transformation der Hefezellen.	56
Tabelle 9: PCR-Protokolle zu Überprüfung der Plasmidtranskription.	58
Tabelle 10 : ABC-Transporterproteine, die im Alignment (Blastp) und für diephylogenetische Berechnung verwendet wurden mit Angabe ihrerZugangsnummer in der jeweiligen Datenbank.	61
Tabelle 11: Verwendete Wirkstoffkonzentrationen f ür das Hefewachstumsassay	69
Tabelle 12 : Primerpaare, die für die Amplifizierung von CegPgp-3 verwendet wurden.	77
Tabelle 13: Ergebnis des Blastp-Alignments von CegPGP-3	78
Tabelle 14: Konservierte Proteinmotive der PGP-3.	78
Tabelle 15 : Primerpaare, die für die Amplifizierung von CegPgp-9 verwendet wurden.	80

Tabelle 16 : Ergebnis des Blastp-Alignments von CegPGP-9.	81
Tabelle 17: Konservierte Proteinmotive von CegPGP-9	81
Tabelle 18 : Übersicht über transformierte Hefestämme und die verwendete cDNA.	84
Tabelle 19 : Durchschnittliches rel. Wachstum von AD1-7 CegPgp-9 und LacZunter Einfluss von IVM.	94
Tabelle 20 : Durchschnittliches rel. Wachstum von AD1-7 CegPgp-9 und LacZunter Einfluss von EPM.	96
Tabelle 21: Ergebnisse der Wachstumsassays mit Verwendung von MOX.	99

Abkürzungen

ABCATP-bindende Transportproteine ("ATP binding cassette")AsAminosäureATPAdenosintriphosphatBBreiteBidest. H ₂ OReinstwasser vom Type 1 (MilliQ-Wasser)BLASTBasic Local Alignment Search ToolbpBasenpaarBZBenzimidazol/BenzimidazoleCCytidincDNAkomplementäre DNACegCylicocyclus elongatusCgoCylicocyclus elongatusCgoCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDNADesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE<. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
AsAminosäureATPAdenosintriphosphatBBreiteBidest. H2OReinstwasser vom Type 1 (MilliQ-Wasser)BLASTBasic Local Alignment Search ToolbpBasenpaarBZBenzimidazol/BenzimidazoleCCytidincDNAkomplementäre DNACegCylicocyclus elongatusCgoCylicostephanus goldiCIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDNADesoxyribonukleinsäureDNADesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
ATPAdenosintriphosphatBBreiteBidest. H2OReinstwasser vom Type 1 (MilliQ-Wasser)BLASTBasic Local Alignment Search ToolbpBasenpaarBZBenzimidazol/BenzimidazoleCCytidincDNAkomplementäre DNACegCylicocyclus elongatusCgoCylicostephanus goldiCIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNADesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
BBreiteBidest. H2OReinstwasser vom Type 1 (MilliQ-Wasser)BLASTBasic Local Alignment Search ToolbpBasenpaarBZBenzimidazol/BenzimidazoleCCytidincDNAkomplementäre DNACegCylicocyclus elongatusCgoCylicostephanus goldiCIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNADesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
Bidest. H2OReinstwasser vom Type 1 (MilliQ-Wasser)BLASTBasic Local Alignment Search ToolbpBasenpaarBZBenzimidazol/BenzimidazoleCCytidineDNAkomplementäre DNACegCylicocyclus elongatusCgoCylicostephanus goldiCIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNADesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
BLASTBasic Local Alignment Search ToolbpBasenpaarBZBenzimidazol/BenzimidazoleCCytidincDNAkomplementäre DNACegCylicocyclus elongatusCgoCylicostephanus goldiCIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidibindende Domäne
bpBasenpaarBZBenzimidazol/BenzimidazoleCCytidincDNAkomplementäre DNACegCylicocyclus elongatusCgoCylicocyclus elongatusCgoCylicostephanus goldiCIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidibindende Domäne
BZBenzimidazol/BenzimidazoleCCytidincDNAkomplementäre DNACegCylicocyclus elongatusCgoCylicostephanus goldiCIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNADesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
CCytidincDNAkomplementäre DNACegCylicocyclus elongatusCgoCylicostephanus goldiCIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNADesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
cDNAKomplementäre DNACegCylicocyclus elongatusCgoCylicostephanus goldiCIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
CegCylicocyclus elongatusCgoCylicostephanus goldiCIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
CgoCylicostephanus goldiCIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
CIKonfidenzintervall (confidence interval)CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
CinCylicocyclus insigneDaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy Nukleotidtriphosphat <i>E. coliEscherichia coli</i> EDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
DaDaltondATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
dATPdesoxy AdenosintriphosphatDEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
DEPCDiethylpyrocarbonatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
DMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
DNADesoxyribonukleinsäureDNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
DNaseDesoxyribonukleasedNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
dNTPdesoxy NukleotidtriphosphatE. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
E. coliEscherichia coliEDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
EDTAEthylendiamintetraacetatGGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
GGuanosinhStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
hStundeKCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
KCONKetoconazolLLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
LLängeLiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
LiAcLithiumacetatminMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
minMinuteMLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
MLMakrozyklisches Lakton/makrozyklische LaktonemRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
mRNABoten-RNA (messenger RNA)NBDNukleotidbindende Domäne
NBD Nukleotidbindende Domäne
NCBI National Center for Biotechnological Information
OD optische Dichte
PCR Polymerasekettenreaktion
Pgp P-Glykoprotein
pH negativer, dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
RACE Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA Ribonukleinsäure
RT Reverse Transkriptase
RT-PCR Reverse Transkriptase-PCR
SDS Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
T Thymindin
TAE Tris-Essig-EDTA

Thiabendazol
Tris-EDTA
Transmembrandomäne
Tris-Natriumchlorid
Tris-Natriumchlorid-Tween
Uracil
nicht translatierte Genregion
ultraviolett
Yeast Peptone Dextrose

Einheiten

Grad Celsius
Zentimeter
Gramm
Stunde
Kilobase
Liter
Mol/l
Milligramm
Minute
Milliliter
Millimol/l
Nanometer
Nanomol/l
Sekunde
Unit
Volt
Mikrogramm
Mikroliter
Mikromol/l

1. Einleitung

Eine regelmäßige, antiparasitäre Behandlung gehört für viele Pferdebesitzer zum Standardprogramm in der Erhaltung der Tiergesundheit. Dabei wird in vielen Fällen auf einen diagnostischen Nachweis einer Infektion verzichtet. Vor allem makrozyklische Laktone (ML) mit ihrem breiten Wirtsspektrum und Praziquantel speziell zur Behandlung eines Bandwurmbefalls werden in der Praxis eingesetzt. Durch die Kombination aus epidemiologischer Fachkenntnis und effektiver antiparasitärer Therapie verringerte sich die Prävalenz hochpathogener Nematoden wie Strongylus vulgaris in den vergangenen Jahrzehnten stetig. Ein leichter Zugang zu wirksamen Anthelminthika und ihre hohe therapeutische Sicherheit beeinflussten nachhaltig die Behandlungsroutine in der Pferdemedizin. Das Ziel, Pferde parasitenfrei zu (er)halten und dadurch positiv auf ihre Gesundheit einzuwirken, schien erreichbar. Doch wie in vielen medizinischen Bereichen ist auch in der Parasitologie die vollkommene Infektionskontrolle an der Entstehung von Resistenzen gescheitert. Bereits kurz nach der Einführung des ersten Breitbandanthelminthikums Thiabendazol (TBZ) wurden Hinweise auf tolerante Parasitenpopulationen gefunden. Mit jeder neuentdeckten Wirkstoffgruppe konnte bisher das Gleichgewicht zwischen effektiver Bekämpfung und entstehender Resistenz wiederhergestellt werden. Doch seit der Einführung der ML in den 1980er Jahren erfolgten keine neuen Wirkstoffzulassungen zur Anwendung im Pferd. Dafür häufen sich Berichte über nachlassende Effizienz bis zur multiplen Resistenz.

Die Entstehung von Resistenzen ist in vielen Bereichen der Veterinär- und Humanparasitologie ein zentrales Problem. Bezogen auf das Pferd als Wirt zahlreicher Endoparasiten rückte die vermehrt unzureichende Wirksamkeit von Anthelminthika Infektionen mit Cyathostominen (auch als kleine Strongyliden bezeichnet) ins Zentrum der Aufmerksamkeit. Lange als apathogene Differentialdiagnose der großen Strongyliden angesehen, wird heute vor allem den Larvenstadien der kleinen Strongyliden ein bemerkenswertes Pathogenitätspotential zugesprochen werden. Symptome, die vorher mit *Strongylus spp.*-Infektionen in Verbindung gebracht wurden, verschwanden nicht in dem Maße wie die Prävalenz dieser Nematodenspezies sank. Die Bedeutung der kleinen Strongyliden wuchs mit ihrer Resistenzentwicklung. Während große Strongyliden bis heute sensibel gegenüber Anthelminthika blieben, wurden zahlreiche resistente Cyathostominen-Population nachgewiesen. Ihr weltweites Vorkommen zusammen mit zum Teil hochgradiger Resistenz und ihrer neubeurteilten Pathogenität machen sie zu einer der bedeutendsten Parasitenfamilien des Pferdes.

1

Ein grundlegender Mechanismus der Resistenzentstehung ist die genetische Selektion. Sie wird verstärkt durch den häufigen Einsatz von Anthelminthika. Versuche durch selektive Behandlungsschemata, wie sie z.B. in der Kontrolle von Haemonchus contortus angewendet werden, oder durch eine Verringerung der Weidekontamination die Anzahl der jährlichen Behandlungen zu reduzieren, sind mit einem hohen Aufwand für den Pferdehalter verbunden und zeigen nur variablen Erfolg. Auf der molekulargenetischen Ebene stellt sich die Frage nach den selektierten Merkmalen in resistenten Populationen. Im Fall der Benzimidazole (BZ) sind es Veränderungen an der Zielstruktur, die die Bindungsaffinität verringern und damit zur Resistenz führen. Auch Stoffwechselprozesse, die Anthelminthika in inaktive Metaboliten umwandeln, oder verstärkte Zellentgiftung durch Transmembrantransporter können unter anthelminthischer Selektion ein evolutiver Vorteil für Parasiten mit bestimmten Merkmalen sein. Die Bandbreite möglicher Mechanismen ist groß und variiert nicht nur zwischen den Anthelminthika-Gruppen, sondern auch zwischen Parasitenspezies und -populationen. Die wissenschaftliche Untersuchung ist entsprechend aufwendig, doch nicht aussichtslos. Und sie ist womöglich unumgänglich. Nur mit ausreichender Kenntnis der molekularen Zusammenhänge zwischen Anthelminthikawirk- und Resistenzmechanismen können gezielte therapeutische Maßnahmen oder pharmakologische Anpassungen ermöglicht werden, um die Wirksamkeit der verfügbaren Medikamente zu erhalten.

In Europa zeigten sich ML trotz ihres intensiven Einsatzes bis heute zu weiten Teilen effektiv gegenüber kleinen Strongyliden, doch sind bereits erste ML-resistente Populationen in Südamerika aufgetreten. Die Folgen eines Verlusts dieser Anthelminthika in der Pferdepraxis sind nicht absehbar. Die Untersuchung von Resistenzmechanismen führte in den letzten Jahren besonders zu Hinweisen auf einen Pgp-vermittelten Export von ML in verschiedenen Nematoden wie z.B. *H. contortus* und auch *Caenorhabditis elegans*.

Die vorliegende Arbeit hat es sich daher zum Ziel gesetzt, die potentielle Bedeutung der Pgps für die Resistenzentwicklung in Cyathostominen zu untersuchen. Dabei ging es insbesondere um die Analyse von Interaktionen auf Proteinebene zwischen Anthelminthika und Pgps. Neben der Identifizierung von Pgps in kleinen Strongyliden sollte durch die heterologe Expression in einem Modellorganismus eine Methode entwickelt werden, diese Transportproteine funktionell charakterisieren zu können.

2

2. Literaturübersicht

2.1. Cyathostominae - kleine Strongyliden

Der Terminus "kleine Strongyliden" ist bis heute nicht einheitlich festgelegt und entspricht häufig keinem echten Taxon. Zum Teil wird damit eine Abgrenzung der Gattung Strongylus, die auch als "große Strongyliden" bezeichnet werden, von den restlichen Mitgliedern der Familie der Strongylidae definiert, auf Grund von Unterschieden in der Morphologie und Pathogenität (Deplazes et al., 2012). In diesem Fall gehören zu den "kleinen Strongyliden" drei Unterfamilien: die Strongylinae, Cyathostominae und Gyalocephalinae (Deplazes et al., 2012). Andere Autoren zählen jedoch die gesamte Unterfamilie der Strongylinae zu den "großen Strongyliden", was die Anzahl der Unterfamilien der kleinen Strongyliden auf max. 2 reduziert (Cyathostominae und Gyalocephalinae) (Deplazes et al., 2012; Giles et al., 1985). Nach Lichtenfels et al. (2008) stellt die Unterfamilie der Gyalocephalinae allerdings nur eine Gattung dar (Gyalocephalus) und wird der Unterfamilie der Cyathostominae zugeordnet (Lichtenfels, 1975). Im englischen Sprachgebrauch kann die Bezeichnung "cyathostomins" oder "Cyathostominea" als Äquivalent zu Cyathostominae verwendet werden (Lichtenfels et al., 2002). Die Grundlage der Taxonomie bilden bis heute morphologische Charakteristika insbesondere am Vorderende, aber auch am Hinterende adulter Nematoden (z.B. Strukturen der Mundkapsel, innerer und äußerer Blätterkranz, Bursa copulatrix) (Lichtenfels, 1975). Die Identifizierung von L4 ist nur für wenige Arten gelungen, während Eier oder frühere Larvenstadien mikroskopisch nicht zu differenzieren sind (Dvojnos und Harcenko, 1990; Lichtenfels, 2008). In den letzten Jahren hat sich jedoch die molekulare Speziesidentifizierung entscheidend weiterentwickelt (Hodgkinson, 2006). Durch Sequenzunterschiede bestimmter Zielregionen ribosomaler Nematoden-DNA, wie z.B. ITS-1 und ITS-2, konnten bereits in den 90er Jahren unterschiedliche Entwicklungsstadien mehrerer equiner Strongyliden mit Hilfe PCR basierter Methoden bestimmt werden (Campbell et al., 1995; Gasser et al., 1996; Hung et al., 1999). Kaye et al. (1998) sequenzierten und verglichen IGS-Regionen von 16 Cyathostomin-Spezies. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden weitere Methoden entwickelt, die auf der spezifischen Amplifizierung der IGS-Region im Rahmen eines PCR-ELISA beruhten (Hodgkinson et al., 2003). Eine Reverse Line Blot Hybridization (RLB) ermöglichte 2007 erstmals die gleichzeitige Identifizierung und Differenzierung von 13 Spezies kleiner Strongyliden und wurde bereits zur Untersuchung der Populationszusammensetzung resistenter Cyathostominae verwendet (Čerňanská et al., 2009; Traversa et al., 2007a). Der aktuellste morphologische Identifizierungsschlüssel wurde von Lichtenfels et al. (2008) veröffentlicht. Er bildet auch die Grundlage für Spezieszuordnungen und -bezeichnung in der vorliegenden Arbeit. Demnach gehören zu den Cyathostominae 14 Gattung mit insgesamt 50 Spezies (Lichtenfels, 2008). Bereits 1975 wurde die früher übliche Bezeichnung Trichonema als Gattung aufgelöst und die einzelnen Spezies anderweitig zugeordnet. Molekularbiologische Ansätze zur Speziesidentifizierung scheinen jedoch bisher nicht alle morphologischen Zuordnungen zu unterstützen (Hung et al., 2000; Matthews et al., 2004; McDonnell et al., 2000).

2.1.1. Vorkommen und Bedeutung

Cyathostominae gehören heute zu den prävalentesten Magen-Darm-Nematoden der Equiden (Bucknell et al., 1995; Cirak et al., 1996; Collobert-Laugier et al., 2002; Gawor, 1995; Lichtenfels, 2008; Love et al., 1999; Matthews et al., 2004). Sie sind weltweit verbreitet und es ist davon auszugehen, dass sich nahezu alle Pferde, die Zugang zu Weideflächen haben, mit Cyathostominen infizieren (Giles et al., 1985; Hass, 1979; Lyons et al., 1999; Matthews et al., 2004; Reinemeyer et al., 1984; Tolliver et al., 1987). Von den 50 anerkannten Spezies wurden 10 nur in Zebras oder Eseln nachgewiesen. Insgesamt umfasst das Wirtsspektrum jedoch alle Equiden mit ihren entsprechenden Hybriden (Lichtenfels, 2008). Im Fall von natürlichen Infektionen handelt es sich in der Regel um Mischinfektionen aus durchschnittlich 5-10 Spezies (Corning, 2009; Lichtenfels et al., 2002). Bei Untersuchungen zur Spezieszusammensetzung wurde unabhängig von geographischen und klimatischen Unterschieden nur eine geringe Varianz der prävalentesten Arten festgestellt. Reinemeyer (1986) hat basierend auf verschiedenen Studien weltweit 5 Spezies identifiziert, die übereinstimmend am häufigsten nachgewiesen wurden. Dazu gehören Cyathostomum catinatum, Cylicocyclus nassatus, Cylicostephanus longibursatus, Cyathostomum coronatum und Cylicostephanus calicatus (Reinemeyer, 1986). Die Ergebnisse einer Studie aus Deutschland zeigen ein ähnliches Ergebnis. Jedoch konnte an Stelle von Cylicostephanus calicatus die Spezies Cylicostephanus radiatus nachgewiesen werden (Anderson und Hasslinger, 1982). Chapman et al. (2003) gehen jedoch davon aus, dass Prävalenzen von Spezies, die nur in geringer Anzahl im Wirt vorkommen, in Abhängigkeit vom Umfang der untersuchten Stichprobe deutlich unterschätzt werden.

2.1.2. Morphologie

Mit einer Länge von 0,5 - 3,0 cm sind die Cyathostominae etwas kleiner als *Strongylus* spp. (große Strongyliden), wobei jedoch das deutlichere Unterscheidungskriterium die kleine Mundkapsel dieser Parasiten ist. Es wird eine zylindrische oder rechteckige Form der Mundkapsel beschrieben. Kleine Strongyliden weisen eine gelbweiße Färbung auf, die artspezifisch auch rötlich sein kann (Deplazes et al., 2012).

2.1.3. Entwicklung

Cyathostomine entwickeln sich in einem direkten Lebenszyklus. Dabei findet im Gegensatz zu den großen Strongyliden keine parenterale Migration statt, was in Bezug auf die geringere Pathogenität dieser Parasiten von entscheidender Bedeutung ist. Die Eier werden von weiblichen, adulten Würmen, die im Lumen des Dickdarms infizierter Tiere vorkommen, ausgeschieden und gelangen mit den Faeces in die Umwelt (Deplazes et al., 2012; Lyons et al., 1999). Damit beginnt die externe oder präparasitische Phase ihrer Entwicklung. Die dünnwandigen Eier enthalten in der Regel mehr als 8 Furchungszellen (Deplazes et al., 2012), aus denen sich in Abhängigkeit von den klimatischen Bedingungen innerhalb von 48 h erste Larven (L1) entwickeln (Reinemeyer, 1986). Nach dem Schlupf ernähren sich L1 von Fäkalbakterien und häuten sich zum zweiten Larvenstadium (L2). Auch in diesem Entwicklungsstadium nehmen sie Nahrung auf und wachsen, während sich die inneren Organe weiter differenzieren. Es folgt eine zweite, unvollständige Häutung, bei der die abgelöste Kutikula nicht abgestreift wird, sondern weiterhin die dritte Larve (L3) vollständig umgibt. Diese Hülle wird als Scheide oder Exuvie bezeichnet (Deplazes et al., 2012). Dritte Larven nehmen keine Nahrung auf und können dennoch abhängig von Temperatur und Feuchtigkeit zwischen 2 bis 21 Wochen auf der Weide überleben, wobei ihnen die sie umgebende Scheide einen gewissen Schutz vor Witterungseinflüssen bietet (Duncan, 1974; English, 1979; Ogbourne, 1973). Die Ergebnisse einer Studie von Grelck et al. (1977), durchgeführt im Raum Berlin, ergaben sogar eine Überlebensdauer der L3 von mind. 11 Monaten. L3 stellen das infektiöse Stadium dar und sind in der Lage bei entsprechender Feuchtigkeit aktiv aus dem Kot aus- und auf Pflanzen aufzuwandern, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, von weidenden Pferden oder anderen potentiellen Wirten aufgenommen zu werden (Reinemeyer, 1986). Neben der aktiven spielt auch die passive Auswanderung, vermittelt durch meteorologische, mechanische oder biologische Faktoren, eine Rolle bei der Verteilung der Larven auf der Weide (Reinemeyer, 1986). Sowohl unter Laborbedingungen, als auch in Feldversuchen wurde wiederholt die Suszeptibilität der Eier und Larvenstadien gegenüber Frost, Austrocknung, Hitze und dem Wechsel zwischen Einfrieren und Auftauen untersucht. Eine entsprechende Übersicht der Ergebnisse findet sich bei Nielsen et al. (2007).

Mit der oralen Aufnahme der L3 und dem Abstreifen der Scheide innerhalb des Darmkanals beginnt die interne oder parasitische Phase dieser Nematoden (Deplazes et al., 2012). Sogenannte "entscheidete" L3 dringen in die Mukosa oder Submukosa des Zäkum oder Kolons ein, wo sie von Bindegewebe eingekapselt werden und sich granulomatöse Wurmknötchen bilden (Reinemeyer, 1986). Während der histotropen Phase, die meist 1-2 Monate aber auch deutlich länger dauern kann, entwickeln sich erst frühe dritte Larven (EL3, "early third stage larvae"), dann späte dritte Larven (LL3, "late third stage larvae") und schließlich das vierte Larvenstadium (L4). L4 verlassen die Kapsel und wandern wieder in das Darmlumen aus (Deplazes et al., 2012; Matthews, 2011). Dort häuten sie sich während der Sommer- und Frühherbstmonate zu präadulten Stadien, die sich zu luminalen Adultstadien entwickeln. Mit artspezifischen Unterschieden beträgt die Präpatenz der kleinen Strongyliden bei natürlichen Infektionen 5 - 12 Wochen (Love und Duncan, 1992).

Eine epidemiologisch wichtige Besonderheit ist die Fähigkeit einiger Arten zur Unterbrechung ihrer Entwicklung während der histotropen Phase als EL3 (Eysker et al., 1984; Gibson, 1953; Kaplan und Matthews, 2004; Matthews et al., 2004; Proudman und Matthews, 2000). Diese sog. Hypobiose ist ein bekanntes Phänomen bei Nematoden. Ein Zusammenhang Wirtstierimmunität. unterschiedlichen wie mit Faktoren Jahreszeit, Dichte der Parasitenpopulation im Wirt und dem Parasitenstamm konnte für Trichostrongyliden nachgewiesen werden (Eysker, 1997). In kleinen Strongyliden sind jedoch die Ursachen für das Auftreten von inhibierten Larvenstadien, sowie für ihre Reaktivierung bis heute noch nicht hinreichend erklärt (Stratford et al., 2011). Gibson (1953) stellte die Hypothese eines Feedback-Mechanismus auf, nach dem eine hohe Anzahl an luminalen Adultstadien zur Akkumulation von inhibierten Larven führt bzw. eine Reduzierung von adulten Parasiten zur Reaktivierung der unreifen Stadien. Love und Duncan (1992) wiederum fanden Hinweise auf einen Einfluss des Alters der infizierten Pferde, wobei Fohlen und Jährlinge eine höhere Anzahl an hypobiotischen Larven aufwiesen als ausgewachsene Tiere. Gleichzeitig konnten sie in ihrer Untersuchung keinen Zusammenhang zu klimatischen Bedingungen feststellen. Die Angaben zur Dauer der Hypobiose variieren stark und reichen von 4 Monaten bis zu 3 Jahren (Corning, 2009; Eysker et al., 1984; Gibson, 1953; Reinemeyer, 1986). Die Anzahl der Larven, die sich entweder im Zustand der Hypobiose befinden oder während der normalen Entwicklung in der Darmwandwand vorliegen, kann nicht mit den zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden ermitteln werden (Matthews et al., 2004; Proudman und Matthews, 2000). Doch gerade ein hohes Vorkommen dieser Darmwandstadien kann eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der larvalen Cyathostominose spielen (Matthews, 2011).

2.1.4. Klinik und anthelminthische Therapie

Das Auftreten von Mischinfektionen von kleinen Strongyliden zusammen mit hochpathogenen *Strongylus spp*. führte lange Zeit zu der Annahme eines nur geringen Pathogenitätspotentials der Cyathostominae (Herd, 1990). Unterstützt wurde diese Hypothese zusätzlich durch die häufig subklinisch verlaufenden Cyathostominen-Infektionen (Love et al., 1999). Während die hohe Empfindlichkeit von *Strongylus* spp. gegenüber ML insbesondere auch während der sehr langen Präpatenzzeit in den letzten Jahrzehnten zu einem deutlichen Absinken der Prävalenz führte, konnten jedoch weiterhin Strongyliden-assoziierte Erkrankungen diagnostiziert werden. Dieser Umstand führte zur erneuten Evaluierung der Pathogenität kleiner Strongyliden (Herd, 1990; Love et al., 1999; Peregrine et al., 2006).

Infektionen mit Cyathostominae wurden mit einer Vielzahl unterschiedlicher Symptome in Verbindung gebracht, von denen einige als Syndrom der larvalen Cyathostominose zusammengefasst wurden (Love et al., 1999). Diese Erkrankung tritt saisonal auf. Die höchste Inzidenz liegt in den Winter- und Frühlingsmonaten (Blackwell, 1973; Chiejina und Mason, 1977; Giles et al., 1985). Gleichzeitig wird auch ein signifikant häufigeres Auftreten bei Tieren unter 5 Jahren beschrieben (Reid et al., 1995). Dennoch bleiben Pferde jeden Alters empfindlich gegenüber einer Infektion mit Cyathostominae, da sich eine nur unzureichende Immunität 2009; von Samson-Himmelstjerna, aufbaut (Corning, 2012). Die meisten und schwerwiegendsten klinischen Symptome werden ausgelöst durch die Invasion und zum Teil massenhafte Auswanderung von dritten und vierten Larven aus der intestinalen Mukosa in das Darmlumen (Giles et al., 1985; Love et al., 1999; Murphy und Love, 1997; Thamsborg et al., 1998). Mehrere Fallbeispiele von Cyathostominosen mit z. T. tödlichem Verlauf wurden in den letzten Jahrzehnten veröffentlicht (Bodecek et al., 2010; Corning, 2009; Giles et al., 1985; Harmon et al., 1986; Jasko und Roth, 1984; Mair, 1993, 1994; Mair et al., 2000; Reilly et al., 1993; Smets et al., 1999). Abhängig von der Intensität der Darmwandschädigung können entzündliche Enteropathien mit rezidivierender oder plötzlich auftretender Diarrhoe, Proteinverlust-Enteropathien und Koliken auftreten (Blackwell, 1973; Chiejina und Mason, 1977; Larsen, 1997). Diese Prozesse zeigen entweder einen akuten oder chronischen Verlauf (Larsen, 1997). Als Folge der Enteropathie und Diarrhoe kann es zum starken Gewichtsverlust

bis zur Kachexie mit Todesfolge kommen (Larsen, 1997). Subkutane Ödeme als Folge einer Hypoalbuminämie wurden ebenso wie ein verspäteter Fellwechsel beschrieben (Bodecek et al., 2010; Chiejina und Mason, 1977; Giles et al., 1985; Larsen, 1997). Hämatologische Befunde wie Anämie und Leukozytose bzw. Neutrophilie variieren und sind aus diesem Grund nicht als pathognomonische Merkmale einer Cyathostominose anzusehen (Corning, 2009; Herd, 1990; Love et al., 1999). Blackwell (1973) wie auch Jasko und Roth (1984) wiesen in histologischen Untersuchungen des Kolons und Zäkums Anzeichen einer granulomatösen Kolitis nach. Eine Übersicht weiterer pathohistologischer Befunde findet sich bei Love et al. (1999). Nach Corning (2009) ist jedoch keines der klinischen und pathologischen Symptome spezifisch für eine larvale Cyathostominose, was die Diagnose erschweren kann.

Zur Behandlung von Nematoden des Pferdes sind bis heute drei Klassen anthelminthischer Wirkstoffe zugelassen: BZ, Tetrahydropyrimidine (THP) und ML (Stratford et al., 2011). Diese können einerseits zur Behandlung erkrankter Tiere verwendet werden oder zur Reduktion der Weidekontamination durch verringerte Eiausscheidung, wobei sehr unterschiedliche Behandlungsstrategien in Abhängigkeit von z.B. klimatischen Bedingungen und dem vorhandenen Parasitenspektrum empfohlen werden (von Samson-Himmelstjerna, 2012). Seit den 60er Jahren führten häufige anthelminthische Behandlungen einerseits zur Reduktion von Morbidität und Mortalität auf Grund von Parasitosen, andererseits erhöhten sie den Selektionsdruck auf Cyathostomin-Populationen (Kaplan und Matthews, 2004). Aus diesem Grund wurden alternative Kontrollprogramme untersucht und empfohlen, wie z.B. die ausschließliche Behandlung von Tieren, deren EpG (Eier pro Gramm) einen Schwellenwert überschreitet (Becher et al., 2010; Krecek et al., 1994), eine entsprechende Weide- und Stallhygiene und altersabhängige Behandlungsschemata (Herd und Coles, 1995; Von Samson-Himmelstjerna et al., 2011). Auf Grund der hohen Pathogenität, die von den parasitischen Larvenstadien ausgeht, stieg das Interesse an larviziden Behandlungenstrategien (Reinemeyer, 1986). Nachgewiesene Effektivität besitzen ausschließlich MOX, bereits bei einfacher Anwendung, und Fenbendazol, verabreicht in erhöhter Dosis über 5 Tage (Kaplan und Matthews, 2004). Doch wird auch ein möglicher negativer Effekt auf die Entstehung von Resistenzen mit dem Abtöten der Larvenstadien in Verbindung gebracht. Denn der Erhalt einer empfindlichen Population, dem sog. *refugium*, die keinem anthelminthischen Selektionsdruck ausgesetzt ist, gilt heute als wichtiges Mittel zum Erhalt der Wirkstoffsuszeptibilität (van Wyk, 2001). Nach Matthews (2008) gehören bei kleinen Strongyliden hypobiotische und enzystierte Larven zu diesen nicht selektierten Populationen. Ein Nachweis dafür, dass die verwendeten Anthelminthika keinen Effekt auf die hypobiotischen Stadien haben, fehlt allerdings. Die geringe oder nicht vorhandene Suszeptibilität enzystierter Larven gegenüber den meisten anthelminitischen Wirkstoffen führt dazu, dass infizierte Pferde auch nach Standardbehandlungen und Überführung auf neue Weideflächen diese kontaminieren können (Reinemeyer, 1986).

2.2. Anthelminthika und Resistenzen in Nematoden

Anthelminthische Resistenz wurde durch Prichard et al. (1980) wie folgt definiert: *Resistance is present when there is a greater frequency of individuals within a population able to tolerate doses of a compound than in a normal population of the same species and is inheritable.* Sie entsteht, wenn wirkstoffresistente Parasiten, selektiert durch eine oder mehrere anthelminthische Therapien, ihre Allele an die nächste Generation weitergeben. Die Selektion führt zur Reduzierung der genetischen Variation mit der Folge einer präferenziellen Vermehrung des resistenten Genotyps (Sangster, 1999a).

Die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Resistenzentstehung werden von vielen Faktoren beeinflusst. Grundsätzlich entstehen genetische Mutationen zu jedem Zeitpunkt (Prichard, 1990). Führt eine solche Spontanmutation zu einem evolutiven Vorteil oder schädigt die betroffene Population nicht, kommt es zur generationsübergreifenden Reproduktion der Merkmale (Prichard, 1990). Dabei führt diese genetische Diversität innerhalb einer Population zur erhöhten Anpassungsfähigkeit (Prichard, 1990). In Abhängigkeit von der Fitness der hetero- und homozygoten Merkmalsträger im Vergleich zum sensiblen Genotyp und ihrer Fähigkeit die anthelminthische Therapie zu überleben, kommt es unter anthelminthischem Selektionsdruck zur verstärkten Vermehrung resistenter Individuen (Prichard, 1990; Sangster, 2001). Weitere genetische Faktoren wie Dominanz und Häufigkeit der resistenten Allele, die Anzahl der beteiligten Gene und die Fähigkeit zur genetischen Rekombination beeinflussen diesen Prozess der Resistenzentstehung genauso wie der Anteil des Parasitenpopulation, der keinem Selektionsdruck unterliegt und als Refugium bezeichnet wird (Sangster, 2001; van Wyk, 2001). Frei lebende Stadien, wie sie bei vielen Weideparasiten und auch bei den kleinen Strongyliden vorkommen, werden durch die anthelminthische Therapie nicht erfasst. Bei Reinfektion der Tiere mit diesen nicht-selektierten und häufig suszeptiblen Parasiten kommt es zur "Verdünnung" des resistenten Genotyps im Wirtstier (Prichard, 1990; van Wyk, 2001). Behandlungsstrategien, die eine Beweidung auf nicht parasiten-kontaminierten Weiden im Anschluss an eine anthelminthische Therapie vorsehen, können den Anteil der suszeptiblen Population im Refugium reduzieren und die Resistenzentstehung fördern (Coles et al., 2006).

Anderseits kann eine grundsätzlich geringe Weidekontamination die Infektionsrate und damit die Behandlungshäufigkeit senken, was wiederum den Selektionsdruck reduziert (Sangster, 1999a). Nach Wolstenholme et al. (2004) spielt auch der kurze Lebenszyklus der Parasiten, mit der Möglichkeit zur schnellen Ausbreitung resistenzassoziierter Allele eine Rolle. Merkmalsträger mit einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegen Anthelminthika, aber möglicherweise geringerer Fitness, die sich in einem direkten Lebenszyklus entwickeln, werden außerdem nicht durch einen Zwischenwirt selektiert (Wolstenholme et al., 2004). Weitere Einflüsse bestehen durch die Pharmakokinetik des verwendeten Wirkstoffs (Sangster und Dobson, 2002; Wolstenholme et al., 2004).

Anthelminthikaresistenz ist heute zu einem der wichtigsten Probleme in der Veterinärmedizin geworden, mit Auswirkungen auf Tiergesundheit und, besonders in der Nutztierhaltung, auf Produktionsgewinne (Jones und George, 2005; Sangster, 1999a; Wolstenholme et al., 2004). Bisher gibt es keine Anzeichen dafür, dass es sich bei klinischauffälliger Resistenz um einen reversiblen Prozess handelt (von Samson-Himmelstjerna, 2012; Wolstenholme et al., 2004). Für den Erhalt der Wirksamkeit der zur Verfügung stehenden Wirkstoffe ist besonders der frühe Nachweis einer Resistenz wichtig (Demeler et al., 2010; Molento et al., 2012; Prichard, 1990; von Samson-Himmelstjerna, 2012). Dafür stehen jedoch – mit Ausnahme der BZ Resistenz verschiedener Trichostrongyliden, bei denen molekulare Mechanismen beschrieben wurden – noch keine Analyseverfahren zur Verfügung. Erst ein deutlicher Wirksamkeitsverlust kann mit den etablierten Methoden nachgewiesen werden (Sangster, 1999a; Taylor und Hunt, 1989).

Unterschiedliche *in vivo* und *in vitro* Methoden werden zur Identifizierung resistenter Parasiten-Populationen im Pferd angewandt. Zu den *in vivo* Untersuchungen gehört der kontrollierte Effektivitätstest. Dafür werden parasiten-freie Tiere infiziert und nach der anthelminthischen Therapie zur Ermittlung der Wurmbürde euthanasiert. Dieser Test gilt als Goldstandard mit der höchsten Zuverlässigkeit (Coles et al., 2006). Gleichzeitig ist er sehr kostenintensiv in Bezug auf den Arbeitsaufwand und die Anzahl an Versuchstieren. Er wird daher heute nur noch selten durchgeführt (Coles et al., 2006; Taylor et al., 2002).

Weitgehend ersetzt wurde dieser Test durch einen Eizahlreduktionstest (*Fecal egg count reduction test*/FECRT), ebenfalls ein *in vivo* Verfahren (Coles et al., 2006; von Samson-Himmelstjerna, 2012). Die Durchführung basiert auf den Empfehlungen der *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP), die von Coles et al. (1992) veröffentlicht wurden. Etabliert ist er für Effektivitätsstudien aller verfügbaren anthelminthischen Wirkstoffgruppen (BZ, LEV/PYR, ML), allerdings nicht speziell für die

Anwendung auf Pferdeparasiten (Coles et al., 2006). Innerhalb des Testverfahrens können zwei Parameter bestimmt werden:

- Durch den Vergleich des quantitativen Nachweises von Nematodeneiern in den Faeces am Tag der anthelminthischen Therapie sowie, bei der Verwendung von BZ, am Tag 8-10, oder für ML, am Tag 14-17 nach Behandlung wird die prozentuale Reduktion der Eizahlausscheidung (*Fecal egg count reduction*/FECR) ermittelt.
- Weitere, regelmäßige koproskopische Untersuchungen bis zum erneuten Auftreten von Nematodeneiern im Kot definieren die *Egg reappearance period* (ERP), die aber gerade im Falle von Parasiten mit variablen Hypobiosedauern nur ein sehr variabler Parameter zur Beurteilung von Resistenz ist.

Im Rahmen der Zulassung einiger Anthelminthika wurden diese Messgrößen untersucht und können heute Aufschluss darüber geben, welche Werte für die FECR und ERP bei vollständiger Effektivität der Wirkstoffe zu erwarten sind. Wird die Eiausscheidung nicht nachhaltig verringert oder tritt eine verkürzte ERP auf, können das Hinweise auf einen Wirksamkeitsverlust des Anthelminthikums sein (Coles et al., 2006; Sangster, 2001). Allerdings ist hier in Bezug auf die ERP zu beachten, dass es zahlreiche Faktoren gibt, die die Ergebnisse verfälschen können. Dazu können unterschiedliche Spezies-Verbände bei den Untersuchungen genauso wie Unterschiede im Immunstatus der Wirtstiere gehören. Für Nematoden der Pferde gilt ein FECRT-Ergebnis von <90 % als Resistenznachweis (Coles et al., 2006). Einige Autoren empfehlen die Festlegung unterschiedlicher Schwellenwerte für einzelne Wirkstoffe, auf Grund variierender Wirksamkeiten (Coles et al., 2006; Sangster und Dobson, 2002). Die Kombination dieser Untersuchungen mit einer Speziesbestimmung ist von entscheidender Bedeutung für die Differenzierung der Effektivität anthelminthischer Wirkstoffe gegen unterschiedliche Parasiten (Coles et al., 2006). Der FECRT besitzt allerdings nur eine geringe Sensitivität, die erst bei einer Häufigkeit von >25 % Resistenz-assoziierter Allele innerhalb der Population Veränderungen zeigt (Martin et al., 1989; Sangster, 2001). Zudem kann es zu Ergebnisvariationen kommen, da die Ausscheidungsrate nicht für jede Parasitenspezies den quantitativen Befall mit Adultstadien widerspiegelt (Taylor et al., 2002).

Des Weiteren werden verschiedene *in vitro*-Methoden für den Nachweis von Anthelminthikaresistenzen im Pferd angewendet. Dazu gehören der Eischlupfhemmzest (*Egg hatch assay*/EHA), der erstmals von Le Jambre (1976) etabliert wurde, und ein Larvenentwicklungshemmtest (*larval development assay*/LDA) (Coles et al., 1988). Während

der EHA auf dem hemmenden Einfluss der Benzimidazole die Entwicklung im Ei und auf den folgenden Eischlupf beruht, kann der LDA für verschiedene Wirkstoffklassen angewendet werden (Craven et al., 1999; Taylor et al., 2002). Beim EHA werden aufgereinigte Nematodeneier in definierten Wirkstoff-Konzentrationen inkubiert und anschließend der Anteil an geschlüpften Larven im Verhältnis zu den Eiern bestimmt. Das Verfahren ist für die Verwendung von TBZ standardisiert, auf Grund seiner hohen Wasserlöslichkeit und kommerziellen Verfügbarkeit. Eine Ringuntersuchung zum Nachweis von Benzimidazol-Resistenz bei Nematoden von Wiederkäuern mithilfe eines EHA in verschiedenen Laboren offenbarte ausgeprägte Schwankungen zwischen den Ergebnissen, welche die Notwendigkeit eines einheitlichen Protokolls zur Durchführung verdeutlichte (von Samson-Himmelstjerna et al., 2009). Wie im Fall des FECRT liegt auch für den EHA die Sensitivität bei >25 % resistenten Parasiten innerhalb einer Population (Martin et al., 1989).

Auch beim LDA werden aufgereinigte Nematodeneier in einem Nährmedium (enthält Antibiotikum und Fungizid) mit Zusatz von Anthelminthika in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wird nicht nur der Anteil an Eiern, sondern auch an L1, L2 und L3 in den Proben bestimmt und die Effektivität des Wirkstoffes berechnet. Etabliert ist das Verfahren für BZ, Levamisol und ML. Beide Testverfahren wurden bereits für Suszeptibilitätsstudien kleiner Strongyliden angewendet (Ihler und Bjorn, 1996; Königová et al., 2003; von Samson-Himmelstjerna et al., 2009; Young et al., 1999).

Bis heute ist nur ein *in vitro*-Test für die Detektion der gängigen Anthelminthika (BZ, LEV/PYR, ML) kommerziell erhältlich. Der sog. DrenchRite[™] (Horizon Technology, Sydney, Australia) basiert methodisch auf dem LDA. Zwei Studien ergaben jedoch, dass dieser Test nicht für die Untersuchung von Cyathostomin-Populationen empfohlen werden kann (Lind et al., 2005; Tandon und Kaplan, 2004). Unter anderem konnte auf Grund der unterschiedlichen Zusammensetzung von Mischinfektionen kein Schwellenwert für die Unterscheidung von resistenten und sensiblen Populationen etabliert werden, was die Auswertung erschwerte (Lind et al., 2005).

Auf Grund nur geringer Kenntnisse spezifischer molekularer Resistenzmechanismen sind Nachweisverfahren resistenzassoziierter Gensequenzen bisher nur für BZ beschrieben worden (2.2.1 Benzimidazole).

Besonders wegen eines Mangels an alternativen Behandlungsstrategien ist die anthelminthische Behandlung trotz sich ausweitender Resistenzen bis heute das Mittel der Wahl zur Therapie und Prävention von Helminthosen (Jones und George, 2005; Klokouzas et al., 2003; Prichard et al., 1980). Für die Behandlung von Nematoden des Pferdes werden dabei 3 Wirkstoffklassen verwendet: die BZ, das Tetrahydropyrimidin Pyrantel und vor allem die ML.

2.2.1. Benzimidazole

BZ sind heterozyklische, aromatische Verbindungen, die aus der Zusammenlagerung von Benzol und Imidazol entstehen. Mitte des letzten Jahrhunderts wurde TBZ als erster Wirkstoff dieser Anthelminthika-Klasse entwickelt (Brown et al., 1961). Auf Grund der hervorragenden Wirksamkeit gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Parasiten in Verbindung mit einer geringen Dosierung und hoher Variabilität in der Formulierung und Darreichungsform stellte TBZ das erste Breitbandanthelminthikum dar (Lyons et al., 1999). Von zentraler Bedeutung für den Erfolg dieser Wirkstoffgruppe war auch die selektive Toxizität gegenüber Helminthen und eine große therapeutische Breite im Wirtstier (Silvestre und Cabaret, 2002). Insgesamt wurden 15 BZ-Derivate und Pro-BZ entwickelt, u.a. Mebendazol, Oxibendazol, Fenbendazol und Albendazol (Lacey, 1990; McKellar und Scott, 1990). Es wird davon ausgegangen, dass alle BZ einen ähnlichen Wirkmechanismus besitzen und eine variierende Effektivität gegen Parasiten allein auf der Bioverfügbarkeit, also ihren pharmakokinetischen Eigenschaften beruht (McKellar und Scott, 1990). Doch beschränkt sich ihr Wirkspektrum nicht nur auf Helminthen, sondern umfasst auch Tumorzellen, Protozoen und filamentöse Pilze, wie Penicillium und Aspergillus (Davidse und Flach, 1978). Bei der in vitro Untersuchung des Wirkmechanismus von Oncodazol, einem Benzimidazol mit zytostatischer Aktivität, bestätigten Hoebeke et al. (1976) die Bindung des Stoffes an aufgereinigtes Tubulin, das aus dem Gehirn einer Ratte extrahiert wurde, sowie die Verhinderung der Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli. Dabei kam es jedoch nicht zu einem Abbau bereits bestehender Tubulin-Strukturen (Hoebeke et al., 1976). Diese inhibitorische Wirkung ist die Grundlage der zytostatischen, antimykotischen und anthelminthischen Effekte (Borgers et al., 1975; Davidse und Flach, 1978; Lacey, 1990). Durch die Zusammensetzung von α- und β-Tubulin-Monomeren entstehen unter physiologischen Bedingungen Proteinfilamente, sog. Mikrotubuli. Diese Proteine unterliegen einem "dynamischen Gleichgewicht" aus kontinuierlichem Auf- und Abbau ihrer Untereinheiten, welches durch chemische (z.B. spezifische Inhibitoren) und physikalische (z.B. Hitze) Einflüsse gestört werden kann (Lacey, 1988). Ein bekannter Inhibitor ist Kolchizin, das mit BZ um die gleiche Bindungsstelle am
ß-Tubulin-Monomer konkurriert (Köhler und Bachmann, 1981; Lacey, 1990). Als Bestandteil des Zytoskeletts spielen Mikrotubuli eine wichtige Rolle in der Zellstabilisierung und bei intrazellulären Transportaktivitäten. Außerdem

bilden sie während der Mitose den Spindelapparat, der die Chromatiden zu den jeweiligen Zellpolen zieht und damit entscheidend an der erfolgreichen Zellteilung mitwirkt (Goldstein, 1995). Als Folge der Inhibition der Mikrotubuli-Bildung ist die Glukose-Aufnahme der Zelle gestört und zelluläre Glykogenspeicher werden abgebaut (Lacey, 1988). Auch kommt es zur Unterbrechung der Zellteilung, was besonders für die ovizide Wirkung der BZ von Bedeutung ist (McKellar und Scott, 1990). Untersuchungen am Modelorganismus C. elegans zeigen, dass BZ-Effekte wie eine verminderte Lokomotion und Reproduktion und die Schädigung der Oozyten im Zusammenhang mit fehlenden Mikrotubulistrukturen stehen (Holden-Dye und Walker, 2007). Dennoch gilt die Interaktion von BZ mit bestimmten individuellen Tubulin-Isotypen bis heute als noch unvollständig geklärt (Saunders et al., 2013). Die Wirksamkeit der einzelnen BZ gegen bestimmte Parasiten variiert zwischen den Tierarten. Eine Übersicht dazu findet sich bei McKellar und Scott (1990) u.a. für Rinder, Schafe und Schweine. Bei Anwendung im Pferd sind TBZ und Oxibendazol wirksam gegen Strongyloides, Oxyuris, Luminalstadien der kleinen und großen Strongyliden und bei erhöhter Dosierung auch gegen Parascaris spp.. Fenbendazol zeigt das weiteste Spektrum, welches auch Lungenwurmspezies und Darmwandstadien der kleinen Strongyliden, sowie große Strongyliden während der parenteralen Wanderung miteinschließt. Das Pro-Benzimidazol Febantel ist ausschließlich wirksam gegen Parascaris, Oxyuris und Luminal- und Adultstadien der kleinen und großen Strongyliden. Mebendazol und Oxfendazol sind die einzigen BZ im Pferd, die auch eine Wirkung gegen Trichostronglyus axei besitzen (McKellar und Scott, 1990).

Resistenzen gegen BZ traten bereits kurz nach Zulassung zur anthelminthischen Therapie im Pferd auf (2.3 Anthelminthikaresistenz in kleinen Strongyliden). Doch besonders in der Schaf- und Rinderhaltung sind BZ-Resistenzen von zentraler Bedeutung. Die aktuelle Situation auf dem amerikanischen Kontinent zeigt eine umfassende BZ-Resistenz von bis zu 100 % der untersuchten Betriebe mit Schafhaltung in Brasilien und den USA (Torres-Acosta et al., 2012). Auch in Australien sind BZ-Resistenzen mit einer Prävalenz von bis zu 100 % nachgewiesen worden (Besier und Love, 2003). Im internationalen Vergleich sind die Resistenzprävalenzen für Europa deutlich geringer als in vielen anderen Teilen der Welt (Kaplan und Vidyashankar, 2012). Höchste Prävalenzen wurden in Galizien und Wales nachgewiesen mit jeweils 29 und 82 %. Díez-Baños et al. (2008) führten zum Resistenznachweis einen EHA durch, während die Studie aus Wales auf FECRT-Ergebnissen beruht (Mitchell et al., 2010). Mitchell et al. (2010) wiesen darüber hinaus auf 56 % der walisischen Betriebe eine multiple Resistenz gegen BZ und Levamisol nach. Eine Untersuchung aus Irland bestätigte in 88 % der seit 2002 untersuchten Betriebe eine BZ-Resistenz auf Grund verminderter FECRT-Ergebnisse (Good et al., 2012). In der Slowakei und Schweden hingegen wurde das Vorkommen von BZ-Resistenzen in weniger als 5 % der untersuchten Schafherden nachgewiesen (Čerňanská et al., 2006; Hoglund et al., 2009). Nach Behandlung wurden vor allem *H.* spp., *Trichostronglyus* spp., *Teladorsagia* spp. und *Ostertagia* spp. diagnostiziert (Čerňanská et al., 2006; Díez-Baños et al., 2008).

Auch für die Rinderhaltung entwickelt sich die Anthelminthikaresistenz zu einem bedeutenden Problem, welches jedoch besonders die Avermectine und Milbemycine betrifft. Eine Übersicht der bis 2011 veröffentlichen Fälle weltweit wurden in einer Arbeit von Sutherland und Leathwick (2011) zusammengefasst. In den USA wurde in einer Versuchstierherde die Wirksamkeit von Fenbendazol und Oxfendazol gegen verschiedene Stadien von Ostertagia spp und adulte Cooperia spp. mit FECRT-Ergebnissen von 97,9 - 100 % bestätigt (Edmonds et al., 2010). Eine Ausnahme stellten sich entwickelnde L4 dar, die durch Oxfendazol nur um 82,1 % reduziert wurden (Edmonds et al., 2010). Erste Resistenzen in nordamerikanischen Rinderherden wurden durch Gasbarre et al. (2009) nachgewiesen. In Argentinien führten Studien zu variierenden Ergebnissen für die BZ-Wirksamkeit. Während 2001 noch eine sehr gute Effektivität von Fenbendazol mit 95 - 100 % FECR nachgewiesen wurde, traten auch hier wenige Jahre später BZ-resistente Cooperia spp.- und Haemonchus spp.-Populationen in einer Rinderherde auf (Fiel et al., 2001). Dabei führte die Behandlung mit Ricobendazol nur zu einer 15% igen Reduktion der Eiausscheidung (Anziani et al., 2004). Auch in einer Prävalenzstudie konnten BZ-Resistenzen in Argentinien nachgewiesen werden. Davon waren 8 (32 %) der 25 untersuchten Betriebe betroffen (Suarez und Cristel, 2007). Eine Untersuchung zur Evaluation der Effektivität verschiedener Anthelminthika in Nordeuropa konnte wiederum keinen Verlust der Wirksamkeit von Albendazol feststellen (Demeler et al., 2009). Bei einem Großteil der untersuchten Fälle wurden Cooperia spp. nach der anthelminthischen Therapie nachgewiesen und in deutlich geringerem Umfang Haemonchus spp. (Sutherland und Leathwick, 2011).

Bei der Untersuchung der Effektivität von BZ gegen *P. equorum* wurde für Oxfendazol eine exzellente Wirksamkeit (94 % FECR) nachgewiesen, während Fenbendazol zu einer Eireduktion von durchschnittlich 84 % führte (Lyons et al., 2008a). BZ-Resistenzen wurden bisher für Ascariden der Pferde nicht nachgewiesen, während sie besonders ausgeprägt in kleinen Strongyliden vorkommen (2.3 Anthelminthikaresistenz in kleinen Strongyliden).

Molekulare Resistenzmechanismen wurden für BZ in unterschiedlichsten Organismen und Parasiten untersucht (Gilleard, 2006). Viele wissenschaftliche Ergebnisse bestätigen dabei die besondere Bedeutung spezifischer Polymorphismen im β -Tubulin-Isotyp 1-Gen im Zusammenhang mit einer erhöhten Toleranz gegenüber BZ in Strongyliden (Roos et al., 1995). Die Resistenz gegen BZ besteht demnach eher auf einem Verlust der Suszeptibilität, als auf der Erlangung einer Resistenz. Das bedeutet, im Laufe der Selektion verringert sich die genetische Diversität bestimmter β-Tubulin-Gene (Roos et al., 1995). In *H. contortus* gilt ein Austausch von Phenylalanin zu Tyrosin an Position 200 der Aminosäuresequenz mit der dadurch verringerten Bindungsaffinität von BZ an Mikrotubuli als Hauptursache für BZ-Resistenz. Der gleiche molekulare Mechanismus wurde auch in C. elegans, T. circumcincta, T. colubriformi, O. ostertagi und C. oncophora nachgewiesen (Demeler et al., 2013b; Driscoll et al., 1989; Grant und Mascord, 1996; Kwa et al., 1993; Roos et al., 1993; Silvestre und Humbert, 2002; Winterrowd et al., 2003). Die Bedeutung dieses single nucleotide polymorphism (SNP) in der Vermittlung einer BZ-Resistenz in H. contortus wurde durch die heterologe Expression von resistenten und sensiblen Tubulin-Allelen in C. elegans bewiesen. Die Empfindlichkeit von BZ-resistenten ben-1 Mutanten des Modellorganismus wurde durch die Expression des sensiblen Tubulin-Allels aus H. contortus wiederhergestellt. Während sich derselbe C. elegans-Stamm nach der Transfektion mit resistenz-assoziierten Allelen weiterhin unempfindlich gegenüber dem Anthelminthikum zeigte (Kwa et al., 1995). Zusätzlich wurde bei hochresistenten H. contortus-Stämmen ein Verlust des β -Tubulin-Isotyp-2-Gens festgestellt, der vermutlich zu einem späteren Zeitpunkt während anthelminthischer Selektion auftritt (Roos et al., 1995). Weitere Mutationen am Codon 167 und 198 im β -Tubulin-Isotyp 1-Gen wurde in BZ-resistenten H. contortus, T. circumcincta und in kleinen Strongyliden nachgewiesen (Drogemüller et al., 2004b; Prichard, 2001; Silvestre und Cabaret, 2002). Besonders in Cyathostominen, wo der Einfluss der F200Y-Mutation auf die BZ-Toleranz als lediglich moderat eingeschätzt wird, scheint unter anderem die Mutation am Codon 167 von Bedeutung zu sein (Blackhall et al., 2011; Drogemüller et al., 2004a; Pape et al., 2003; Von Samson-Himmelstjerna et al., 2003). Funktionelle Analysen zur Bedeutung dieser Mutationen fehlen bisher oder waren nicht erfolgreich (Blackhall et al., 2006; von Samson-Himmelstjerna et al., Auch Untersuchungen zum Vorkommen von SNPs in verschiedenen 2007a). Trichostrongyliden-Feldpopulationen zeigten auf Grund variierender Häufigkeit dieser Mutationen, dass weitere, eventuell unspezifische Mechanismen und genetische Veränderungen eine Rolle in der Vermittlung von BZ-Resistenz spielen (AlGusbi et al., 2014; von Samson-Himmelstjerna et al., 2007a).

In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Nachweismethoden zur Identifizierung von Parasitenpopulationen mit resistenz-assoziiertem Genotyp entwickelt. Der Großteil dieser Analysen basiert auf PCR-Verfahren. Dazu gehören eine allel-spezifische PCR zur Genotypisierung von Trichostrongyliden-Spezies und eine real-time PCR für die Anwendung

16

in Individuen und Mischpopulationen kleiner Strongyliden und *H. contortus* (Von Samson-Himmelstjerna et al., 2003; Walsh et al., 2007). Auch Pyrosequenzierung, ein Verfahren mit der Möglichkeit zum hohen Probendurchsatz mit ausgezeichneter Quantifizierbarkeit und im Vergleich zu PCR-basierten Methoden geringem Arbeitsaufwand, wurde zum Nachweis von Punktmutationen im β -Tubulin-Isotyp 1-Gen von Haemonchus spp., O. ostertagi und C. oncophora angewendet (Brasil et al., 2012; Demeler et al., 2013b; von Samson-Himmelstjerna et al., 2007a)

2.2.2. Tetrahydropyrimidine

Die Wirkstoffe Pyrantel, Oxantel und Morantel sind zyklische Amidine, die zur Behandlung von Nematoden in Hunden, Katzen, Schweinen und Pferden verwendet werden (Martin und Robertson, 2007). Kurz nach der Markeinführung von TBZ, als erstem Vertreter der BZ, wurde Pyrantel durch Austin et al. (1966) entwickelt. Als Imidazolderivat wirkt es genau wie z.B. Levamisol und Morantel als selektiver Agonist synaptischer und extrasynaptischer, nikotinerger Acethylcholinrezeptoren (AChR) in den Muskelzellen suszeptibler Nematoden. Durch den Anstieg der Membranleitfähigkeit und ihrer Depolarisation kommt es zur spastischen Paralyse des Parasiten und dadurch zur Expulsion aus dem befallenen Organ des Wirtes (Martin, 1997). Der Aufbau von AChR im Nematoden unterscheidet sich deutlich von dem im Säugetier (Rayes et al., 2001). Pyrantel und Levamisol wirken dabei in Muskelzellen von H. contortus 10-100× stärker als in Muskelzellen der Ratte (Atchison et al., 1992). Die Selektivität des Wirkstoffes ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, doch wurde ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Glyzin-Residuen an spezifischen Untereinheiten der AChR im Säugetier mit einer verminderten Pyrantel-Affinität festgestellt (Bartos et al., 2006; Rayes et al., 2001). Die AChR von A. suum wurden entsprechend ihrer Affinität gegenüber nikotinergen Stoffen in die 3 Subtypen N- (besonders sensitiv für Nikotin, Methyridin und Oxantel), L (besonders sensitiv für Levamisol und Pyrantel) und B (besonders sensitiv für Bephenium) unterteilt (Martin et al., 2004). Der Effekt von Pyrantel wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Bindung an den Subtyp-L vermittelt (Kopp et al., 2008). Eine Erklärung für diese variierenden Affinität des Rezeptors sehen Buxton et al. (2014) in der unterschiedlichen Anordnung seiner 5 Untereinheiten. Dafür exprimierten sie in Xenopus-Oocyten verschiedene Kombination der O. dentatum nAChR-Untereinheiten und verglichen die Sensitivität gegenüber cholinergen Anthelminthika. Dabei konnten sie ebenfalls 4 pharmakologisch-unterschiedliche Rezeptortypen identifizieren (Buxton et al., 2014).

Pyrantel ist erhältlich als Pamoat (Embonat), Tartrat oder Citrat. Diese Salze haben unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften und werden entsprechend für unterschiedliche Indikationen eingesetzt. Pyrantel-Tartrat und -Citrat besitzen eine gute Wasserlöslichkeit mit gastrointestinaler Absorption und systemischer Wirksamkeit, während Pyrantel-Pamoat kaum hydrophil ist und größtenteils mit den Faeces ausgeschieden wird. Pamoat verbleibt auf Grund dessen in hohen Konzentrationen im Magen-Darm-Trakt und besitzt eine gute Wirksamkeit gegen intestinale Parasiten (Bjørn et al., 1996). Zum Wirkspektrum von Pyrantel gehören Hakenwürmer (*Ancylostoma. caninum, Ancylostoma tubaeforme*) und Ascariden (*Toxocara canis, Toxocara leonina, Toxocara cati*) (Klein et al., 1978; Lindquist, 1975; Todd et al., 1975).

Bei Morantel und Oxantel handelt es sich um Pyrantelderivate mit unterschiedlichen Wirtsspektren. Morantel wird als Tartrat für die Therapie gastrointestinaler Nematoden des Rindes und Schafes verwendet, während Oxantel im Gegensatz zu Pyrantel wirksam gegen *Trichuris* spp. ist (Harder, 2002; Howes, 1972; Rajasekariah et al., 1991). Auf Grund vergleichbarer pharmakokinetischer Eigenschaften und eines ähnlichen Wirkmechanismus führen Resistenzen gegen einen der Wirkstoffe durch das Auftreten von Seitenresistenzen immer zum Wirksamkeitsverlust der gesamten Anthelminthika-Klasse (Sangster und Dobson, 2002). Auch Kreuzresistenzen wurden zwischen Levamisol und Tetrahydropyrimidinen beschrieben (Bjørn et al., 1990; Jambre und Martin, 1979). Durch die Unterschiede im Wirkmechanismus können Tetrahydropyrimidine gemeinsam mit anderen anthelminthischen Wirkstoffen angewendet werden, um die Behandlungseffektivität zu erhöhen. Die Kombination aus dem Pro-Benzimidazol Febantel und Pyrantel bewirkt z.B. einen synergistischen Effekt und wird in der Therapie parasitärer Erkrankungen des Hundes verwendet (Kopp et al., 2008).

Resistenzen gegen AChR-Agonisten sind bis heute nicht weit verbreitet. Untersuchungen beziehen sich dabei meist auf Levamisol, das häufig in der Behandlung von Trichostrongylideninfektionen in Schweinen und kleinen Wiederkäuern eingesetzt wird (Sangster und Dobson, 2002). Pyrantel-Resistenz konnte jedoch in *A. caninum* nachgewiesen werden (Kopp et al., 2007). In Dänemark wurden bereits Ende der 80er Jahre PYR-resistente *Oesophagostomum*-Populationen in Schweinen identifiziert (Roepstorff et al., 1987). Auch Morantel-resistente *T. colubriformis* und *T. circumcincta*-Populationen wurden in Schafen nachgewiesen (Sangster et al., 1979). Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass Morantel-resistente *T. colubriformis* wirksam mit Levamisol behandelt werden konnten (McKenna, 1985). Eine Erklärung dafür könnte die Beobachtung von 4 Rezeptortypen sein, die durch variierende Kombinationen aus Untereinheiten des nAChR entstehen und mit einer
starken Veränderung der Affinität gegenüber cholinergen Anthelminthika zusammenhängen (Buxton et al., 2014). Sie gehen davon aus, dass im Falle eines gemeinsamen Auftretens der Rezeptortypen im Nematoden, die Kombination aus Levamisol und Pyrantel zu synergistischen Effekten führen kann. Pyrantelresistenzen in Nematoden des Pferdes sind bisher nur in Populationen kleiner Strongyliden aufgetreten (2.3 Anthelminthikaresistenz in kleinen Strongyliden).

In C. elegans scheint der AChR aus einer transmembranalen Ringstruktur zu bestehen, die sich aus 3 essentiellen (unc-63, unc-38 und unc-29) und 2 nicht-essentiellen (lev-1 und lev-8) Untereinheiten zusammensetzt (Martin et al., 2012; Qian et al., 2008). Knock-out-Mutanten von unc-63, -38 und -29 zeigen neben einer vollständigen Levamisol-Resistenz auch einen Phänotyp mit unkoordinierter Fortbewegung. Der Verlust der Gene, die für nicht-essentielle Untereinheiten kodieren, führte nur zur Teilresistenz (Qian et al., 2008). Fehlen zusätzlich drei weiterer Gene (ric-3, unc-74 und unc-50) kommt es zum vollständigen Ausbleiben der nAChR (Subtyp-L)-Expression in den Muskelzellen der betroffenen Nematoden (Boulin et al., 2011). Untersuchungen zu orthologen Genen in H. contortus zeigen einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Genexpression und Levamisol-Resistenz (Boulin et al., 2011). Bei der Identifizierung von nAChR in weiteren parasitischen Nematoden (T. colubriformis, T. circumcincta, H. contortus) wurde sowohl eine ausgeprägte Diversität von 11 paralogen Sequenzen des C. elegans unc-29 Gens nachgewiesen, als auch eine verkürzte Sequenz der Unc-63 cDNA in resistenten Isolaten amplifiziert (Martin et al., 2012). Ein Zusammenhang zwischen der unvollständigen Unc-63 mRNA mit der Expression eines nicht-funktionellen nAChR und einer Resistenz gegenüber nAChR-Agonisten wird vermutet (Neveu et al., 2010). Auch im Strongyliden Oesophagostomum dentatum wurden Veränderungen an spezifischen AChR mit einer Resistenz gegenüber Pyrantel in Verbindung gebracht (Robertson et al., 2000). Möglicherweise führen auch Veränderungen des Expressionsniveaus zur verminderten Sensitivität (Williamson et al., 2011). Doch trotz eines sehr ähnlichen Wirkmechanismus können sich auf Grund unterschiedlicher nAChR-Affinitäten von Pyrantel und Levamisol Resistenzen auch unabhängig voneinander entwickeln, bedingt durch unterschiedliche strukturelle Voraussetzungen am Rezeptor (Martin und Robertson, 2007).

Bis heute existieren keine molekularbiologischen Nachweismethoden für die Genotypisierung LEV/PYR-resistenter Nematoden.

2.2.3. Makrozyklische Laktone

ML (Avermectine und Milbemycine) spielen seit ihrer Einführung in den 80er Jahren eine Schlüsselrolle in der Behandlung von unterschiedlichsten Parasitosen. Und das nicht nur in der Veterinärmedizin, auch in der Kontrolle der humanen Onchocercose, sind ML die am häufigsten verwendeten Wirkstoffe (Omura und Crump, 2004; Vercruysse und Rew, 2002b). Avermectine, wie Ivermectin (IVM), Selamectin, Doramectin und Abamectin sind semisynthetische Abkömmlinge eines Fermentationsprodukts des myzelbildenen Strahlenpilzes Streptomyces avermilitis, während die sog. Milbemycine, zu denen u.a. Moxidectin (MOX) gehört, aus einer Mischung von Fermentationskomponenten von Streptomyces cyaneogriseus und Streptomyces hygroscopius hervorgehen (Burg et al., 1979; Henessy und Alvinerie, 2002; Takiguchi et al., 1980). Beide Gruppen besitzen bereits in sehr niedriger Dosierung (µg/kg) eine ausgeprägte Wirksamkeit gegen Arthropoden und Nematoden, jedoch nicht gegen Plathelminthen wie z.B. Fasciola hepatica (Campbell und Benz, 1984; González Canga et al., 2009; Shoop et al., 1995b; Wolstenholme und Rogers, 2005). Die halbsynthetischen Derivate IVM und MOX unterscheiden sich nur hinsichtlich einer ungesättigte Seitenkette an Position C25 und der fehlenden Disaccharid-Gruppe an Position C13 des Makrolidringes (Takiguchi et al., 1980). Diese strukturellen Unterschiede führen zu variierenden pharmakokinetischen und auch physikalischen Eigenschaften, während man gleichzeitig davon ausgeht, dass beide Gruppe den gleichen Wirkmechanismus besitzen (Shoop et al., 1995a). Es ist bekannt, dass diese Stoffe mit einer Reihe von Ionenkanälen interagieren, wie Glyzin- und GABA_A Rezeptoren, a7 ACh und P2X₄-Rezeptoren (Adelsberger et al., 2000; Dawson et al., 2000; Khakh et al., 1999; Krause et al., 1998; Shan et al., 2001). Mit Ausnahme der P2X₄ gehören alle diese Ionenkanäle zu der Superfamilie der Cys-Loop-Rezeptoren. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die anthelminthische Wirkung der ML in Nematoden durch die Aktivierung Glutamat-abhängiger Chloridkanäle (GluCl-Kanäle) verursacht wird, die hochaffine Bindungsstellen für ML darstellen (Arena et al., 1991; Arena et al., 1992; Holden-Dye und Walker, 2007; Yates et al., 2003). Sie wurden in C. elegans, A. suum und H. contortus als Bindungsstellen identifiziert und charakterisiert (Cheeseman et al., 2001; Cully et al., 1996; Cully et al., 1994; Dent et al., 1997; Dent et al., 2000; Forrester et al., 1999; Forrester et al., 2002; Jagannathan et al., 1999). Sowohl in C. elegans, als auch in H. contortus sind diese Ionenkanäle von Bedeutung für die Kontrolle pharyngealer Funktion, Lokomotion und möglicherweise auch der Sensorik (Wolstenholme und Rogers, 2005; Yates et al., 2003). Durch die irreversible Öffnung der GluCl-Kanäle kommt es zur erhöhten

Permeabilität der Zellmembran für Chlorid-Ionen, was die Bildung von Aktionspotentialen und damit die Erregungsleitung verhindert. Die Folge sind schlaffe Paralysen der pharyngealen und Körperwandmuskulatur (Avery und Horvitz, 1990; Wolstenholme und Rogers, 2005). IVM ist auch ein potenter Inhibitor der Motilität und Entwicklung frei-lebender Trichostrongyliden-Stadien, ohne diese dabei jedoch direkt abzutöten (Gill et al., 1995). Die selektive Toxizität der ML ist nach Lynagh und Lynch (2012) bedingt durch die unterschiedliche Sensitivität der Cys-Loop-Rezeptoren gegenüber ML in Nematoden, Arthropoden und Vertebraten.. Auch P-Glykoproteine (Pgps), spielen für die geringe Toxizität von IVM im Säugetier eine entscheidende Rolle (Lynagh und Lynch, 2012).

Resistenz gegenüber ML wurde zuerst in gastrointestinalen Nematoden kleiner Wiederkäuer nachgewiesen (Wolstenholme und Kaplan, 2012). Die aktuelle Situation wird zum Teil als besorgniserregend beschrieben und hat bereits zu drastischen Reaktionen wie der Tötung ganzer Herden auf Grund multi-resistenter Nematoden und zur Schließung von Betrieben wegen mangelnder ökonomischer Rentabilität geführt (Blake und Coles, 2007). Resistenzen haben sich in allen bedeutenden Gattungen von Nematoden wie Haemonchus ssp., T. ssp. und Trichostrongylus entwickelt (Wolstenholme und Kaplan, 2012). Der erste beschriebene Fall von IVM-Resistenz trat in einem H. contortus-Stamm in Südafrika im Jahr 1988 auf (van Wyk und Malan, 1988). Seitdem folgten viele weitere Berichte über eine nachlassende Wirksamkeit von ML weltweit, die bereits mehrfach von verschiedenen Autoren zusammengefasst wurden (Jabbar et al., 2006; Kaplan, 2004; Sangster und Gill, 1999; Waller, 1997; Wolstenholme et al., 2004). Auch aktuelle Studien zeigen eine weite Verbreitung von ML-Resistenz in Parasitenpopulationen kleiner Wiederkäuer. In Äthiopien konnte nach der Detektion einer IVM-resistenten Nematodenpopulation in einer Ziegenherde, die Wirksamkeit von IVM durch ein verändertes Management wiederhergestellt werden (Sissay et al., 2006). In der Slowakei wiesen Čerňanská et al. (2006) auf 6 von 27 untersuchten Betrieben Resistenzen mit einem FECRT-Ergebnis von < 95 % nach. Dabei wurden in Kotkulturen nach der Behandlung mit IVM-Generika diverse Nematodenspezies diagnostiziert (Haemonchus spp., Teladorsagia spp., Cooperia spp., Chabertia spp., Oesophagostomum spp., Nematodirus spp., Trichostrongylus spp. und Ostertagia spp.). Eine grundsätzlich geringe Wirksamkeit der verwendeten IVM-Produkte konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden und führte möglicherweise zu falschpositiven Resistenznachweisen (Čerňanská et al., 2006). IVM-resistente Nematoden wurde in den Niederlanden, Algerien, Türkei, der Schweiz, Kanada und Südafrika identifiziert (Artho et al., 2007; Bentounsi et al., 2007; Eysker et al., 2006; Falzon et al., 2013; Kose et al., 2007; Tsotetsi et al., 2013). In bestimmten Regionen Neuseelands gilt ML-Resistenz in Schafherden bereits als weitverbreitet, während sie in Italien z.B. erstmals 2007 auftrat (Hughes et al., 2007; Sutherland et al., 2008; Traversa et al., 2007c). Eine unzureichende Wirksamkeit von Doramectin wurde in einer Alpaka-Herde in Belgien und in den Niederlanden bestätigt. Die Effektivität des Wirkstoffes lag in dieser Studie nur bei 15 % (Borgsteede et al., 2007). Dabei ist jedoch zu beachten, dass ML nicht für die Anwendung in Alpakas zugelassen sind. Die Umwidmung und fehlende Kenntnis der genauen Dosierung können Ursachen einer resistenzfördernden Unterdosierung sein. Dazu kommt, dass für Alpakas und Ziegen ein schnellerer Abbau von ML nachgewiesen wurde. Auch dadurch ist das Risiko einer Unterdosierung deutlich erhöht (Gonzalez-Canga et al., 2012; Jabbar et al., 2013; Scott et al., 1990). Eine Übersicht der Situation in Europa findet sich bei Papadopoulos et al. (2012).

Im Vergleich zu den kleinen Wiederkäuern entwickelten sich Resistenzen in Rindern relativ langsam und die Wirksamkeit von ML galt lange Zeit als uneingeschränkt (Coles, 2002). Erste Nachweise erfolgten in Neuseeland, wo Mitte der 90er Jahre ML zur Behandlung von C. oncophora im Rind nur unzureichend wirksam waren (Vermunt et al., 1996; West et al., 1994). ML-Resistenzen in Nematodenpopulationen wurden besonders in Argentinien, aber auch Großbritannien, Schottland, den USA, Brasilien, Neuseeland, Mexiko, Schweden, Belgien und Deutschland nachgewiesen (Almeida et al., 2013; Anziani et al., 2004; Anziani et al., 2001; Canul-Ku et al., 2012; Demeler et al., 2009; Fiel et al., 2001; Gasbarre et al., 2009; Mason und McKay, 2006; McArthur et al., 2011; Molento et al., 2006; Orpin, 2010; Stafford und Coles, 1999; Suarez und Cristel, 2007). Durch die Untersuchung von Kotkulturen nach anthelminthischer Behandlung wurde in diesen Studien C. oncophora am häufigsten diagnostiziert. Diese Spezies gilt jedoch grundsätzlich als Dosis-limitierend für ML mit einer Wirksamkeit von IVM, die bereits zum Zeitpunkt der Markeinführung nie 100 % erreichte (Stafford und Coles, 1999; Vercruysse und Rew, 2002a). Zusätzlich haben auch H. contortus, Dictyocaulus viviparus und O. ostertagi effektive Resistenzmechanismen gegenüber den Avermectinen/Milbemycinen entwickelt (Anziani et al., 2004; Edmonds et al., 2010). Obwohl IVM der wichtigste Vertreter dieser Wirkstoffklasse in der Behandlung von Rindern ist und womöglich aus diesem Grund am häufigsten in Effektivitätsstudien untersucht wurde, zeigen verschiedene Studien auch Resistenzen gegen MOX, Doramectin und Abamectin (Bartley et al., 2012; Fiel et al., 2001; Molento et al., 2006). Der FECRT, auf dem die Ergebnisse eines Großteils der Untersuchungen beruhen, wurde bis heute jedoch nicht vollständig für die Anwendung im Rind evaluiert. Es existieren daher keine Richtlinien zur Durchführung oder Auswertung der Daten, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nach Wolstenholme und Kaplan (2012) erschwert.

Bei den Parasiten der Pferde sind Resistenzen gegen ML bisher nur in P. equorum und kleinen Strongyliden aufgetreten. In P. equorum, der als bedeutendster Parasit junger Pferde gilt, ist ML-Resistenz bereits weit verbreitet mit nachgewiesenen Fällen aus den USA, Kanada, Schweden, den Niederlanden und Italien (Boersema et al., 2002; Hearn und Peregrine, 2003; Janssen et al., 2013a; Lind und Christensson, 2009; Lindgren et al., 2008; Lyons et al., 2008a; Slocombe et al., 2007; Veronesi et al., 2009; Wolstenholme und Kaplan, 2012). Prävalenzdaten über das Vorkommen von ML-Resistenz in P. equorum lassen sich aus diesen Fallberichten jedoch nicht ableiten. Als weitverbreitet wird die ML-Resistenz in Finnland eingeschätzt, nachdem in allen untersuchten Betrieben IVM-resistente P. equorum gefunden wurden (Näreaho et al., 2011). Im Gegensatz dazu konnte bei einer Effektivitätsstudie in Dänemark für IVM weder eine mangelnde Reduktion der Eiausscheidung, noch ein schnelles Wiederauftreten von Parascaris-Eiern im Kot festgestellt werden (Larsen et al., 2011), obwohl einige Jahr zuvor eine IVM-Resistenz in Fohlen vermutet wurde (Schougaard und Nielsen, 2007). In Frankreich sind ML-Resistenzen im Rahmen einer Prävalenzstudie von P. equorum erstmals 2012 nachgewiesen worden (Laugier et al., 2012). Lind und Christensson (2009) nehmen das Ergebnis ihrer Untersuchungen sogar zum Anlass ML nicht mehr für die Behandlung von Infektionen mit P. equorum zu empfehlen. ML-Resistenz in Cyathostominen spielt eine immer größere Rolle weltweit (2.3 Anthelminthikaresistenz in kleinen Strongyliden). Für weitere Nematoden des Pferdes, wie Habronema spp, Draschia megastoma und Oxyuris equi wird eine ML-Resistenz bisher nur vermutet und konnte nach Wolstenholme und Kaplan (2012) noch nicht bestätigt werden.

Im Zusammenhang mit dem Nachweis von ML-Resistenzen in unterschiedlichen Zielorganismen wurden verschiedene Mechanismen untersucht, von denen zwei nach Wolstenholme und Kaplan (2012) bisher für Nematoden relevant sind:

- 1. Veränderungen der ML-Bindungsstelle
- 2. Veränderungen in der ML-Distribution

Hinweise auf Veränderungen in der Zielstruktur wurden bereits mehrfach gefunden. In *C. elegans* sind insgesamt mehrere Gene identifiziert worden, die für die Untereinheiten (α/β) des pentameren Chloridkanals kodieren. Durch alternatives Spleißen entstehen zusätzlich verschiedene Genprodukte mit variierender IVM-Sensitivität (Cully et al., 1994; Dent et al., 1997). Da die Bindung von IVM nachweislich an α -Untereinheiten des GluCl-Pentamers erfolgt, wird eine veränderte Struktur dieser Elemente als entscheidend für eine mögliche

Resistenzentstehung vermutet (Cully et al., 1994; Dent et al., 1997; Wolstenholme und Rogers, 2005). In C. elegans zeigte sich unter Laborbedingungen, dass erst durch Mutationen in 3 beteiligten Genen (avr-14, avr-15 und glc-1) eine ausgeprägte ML-Resistenz entsteht (Dent et al., 2000). Basierend auf den Erkenntnissen und Sequenzen von C. elegans wurden Untereinheiten von Chloridkanälen parasitischer Nematoden, wie H. contortus/placei, Onchocerca volvulus, C. oncophora, Dirofiliaria immitis und A. suum nachgewiesen (Wolstenholme und Rogers, 2005). Die hohe genetische Diversität führte zu der Annahme, dass die Familie der GluCl zwischen Nematodenspezies eine ausgeprägte Varianz aufweist (Wolstenholme und Rogers, 2005). Das avr-14 Gen wurde jedoch in den meisten dieser untersuchten Spezies nachgewiesen und Mutationen dieses Gens gleichzeitig in Zusammenhang mit einer reduzierten IVM-Wirksamkeit in C. oncophora gebracht (El-Abdellati et al., 2011; Njue et al., 2004; Njue und Prichard, 2004). Der Versuch spezifische Polymorphismen, wie sie in einem resistenten C. oncophora Isolat gefunden wurden, in weiteren Isolaten und anderen parasitischen Nematoden nachzuweisen, war bisher jedoch nicht erfolgreich (El-Abdellati et al., 2011). Auch eine natürlich-vorkommende Mutation in glc-1 in C. elegans wurde als mögliche Ursache einer Abamectin-Resistenz vermutet (Ghosh et al., 2012).

Überraschenderweise wurden Hinweise auf eine Selektion von β -Tubulin-Genen, die vor allem in der Resistenz gegen BZ von entscheidender Bedeutung sind, durch IVM in *O. volvulus* gefunden (Eng et al., 2006; Eng und Prichard, 2005; Nana-Djeunga et al., 2012). Ein ähnlicher Selektionsprozess wurde auch für *H. contortus* nachgewiesen (Eng et al., 2006; Mottier und Prichard, 2008). Möglicherweise prädisponiert die Resistenz gegen ML auf diese Weise für eine verminderte Suszeptibilität gegenüber BZ. Die Ursache für diese Prädisposition ist bis heute nicht ausreichend geklärt (Wolstenholme und Kaplan, 2012).

Pgps sind auf Grund ihrer Bedeutung in der Distribution von ML als mögliche resistenzassoziierte Proteine Bestandteil vieler Untersuchungen. Dabei wurden Hinweise auf eine Beteiligung an erhöhter ML-Toleranz gefunden und gleichzeitig Versuche unternommen durch spezifische Pgp-Inhibitoren die Wirksamkeit dieser Anthelminthika zu erhöhen bzw. wiederherzustellen (2.4.3 P-Glykoproteine und Anthelminthikaresistenz). Jedoch konnten bis heute keine molekularbiologischen Nachweisverfahren für die Genotypisierung von resistenten Nematodenspezies etabliert werden (Wolstenholme und Kaplan, 2012).

24

2.3. Anthelminthikaresistenz in kleinen Strongyliden

Kleine Strongyliden haben heute gegen alle verfügbaren anthelminthischen Wirkstoffklassen Resistenzen entwickelt, was in geringerem Umfang auch die ML miteinschließt. Im Fall von TBZ, dem ersten zugelassenen BZ, wurden bereits 1 Jahr nach Markteinführung resistente Populationen identifiziert (Drudge et al., 1990). Dabei müssen resistente Individuen bereits zur ersten Anwendung von TBZ präsent gewesen sein (Drudge et al., 1990). Seit den 80er Jahren wurde eine Vielzahl von BZ-Resistenzen weltweit nachgewiesen (Kaplan, 2002). Betrachtet man die Prävalenzsituation seit dem Jahr 2000, so hat sich die Lage insgesamt verschärft. In manchen Fällen von BZ-Resistenz hat möglicherweise durch die Verwendung von Phenothiazinen, die ebenso wie BZ die Bildung von Mikrotubuli inhibieren, bereits eine Selektion der Population stattgefunden (Drudge et al., 1990). Entwickelt eine Cyathostomin-Population Resistenzen gegen einen Wirkstoff der BZ, verlieren auch bisher nicht angewendete Vertreter dieser Anthelminthika-Klasse ihre Wirksamkeit (Lester et al., 2013b; Lind et al., 2007; Prichard, 2001). Eine Ausnahme stellt Oxibendazol dar, welches auch bei bereits BZresistenten kleinen Strongyliden eine jedoch temporär begrenzte Wirksamkeit behält (Lyons et al., 1996a; Prichard, 1990). Kaplan (2002) ging bereits vor mehr als 10 Jahren davon aus, dass schwieriger wäre, BZ-suszeptible als BZ-resistente Cyathostomin-Populationen es nachzuweisen. Boersema et al. (1991) kommen sogar noch früher zu dem Schluss BZ, auf Grund ihrer reduzierten Wirksamkeit nicht mehr zur regelmäßigen Entwurmung im Pferd anzuwenden. Tabelle 1 gibt alle Länder mit nachgewiesenen BZ-Resistenzen mit den entsprechenden Publikationen an.

Land	Publikation	BZ	TRP	ML
Australien	Barger und Lisle (1979)	+		
	Kelly et al. (1981)	+		
Brasilien	Molento et al. (2008)	+	+	+
	Canever et al. (2013)	+	+	$+^{1}$
Chile	von Samson-Himmelstjerna et al. (2002)	+		
Dänemark	Bjørn et al. (1991)	+		
	Craven et al. (1998)	+	+	
Deutschland	Bauer et al. (1986)	+		
	Wirtherle et al. (2004)	+		
	Traversa et al. (2009a)	+	+	
	Fischer et al. (2015)		+	
Finnland	Näreaho et al. (2011)		+	+/-
Frankreich	Traversa et al. (2012)	+	+	
	Geurden et al. (2013)	+		

Tabelle 1: Übersicht der Länder in alphabetischer Reihenfolge mit nachgewiesenen Resistenzen kleiner
Strongyliden

Land	Publikation	BZ	TRP	ML
Großbritannien	Fisher et al. (1992)	+	+	
	Comer et al. (2006)	+	+	
	Traversa et al. (2009b)			. 1
	Lester et al. $(2012a)$	+	+	+.
	Existence of all (2013a)	+	+/-	
	Subtroluted al. (2014) Bolf et al. (2014)	+		
Italian	Rell et al. (2014) Transma et al. (2007b)		+	
Italien	$M_{1111} = 4 = 1 (2000)$	+	+	1/2
	$\frac{1}{2009}$	+	+	+/-***
IZ 1	$\frac{1}{100000}$	+	+	+.
Kanada	Slocombe und Cote (1977)	+		
NT 1 1	Slocombe und de Gannes (2006)		+	
Neuseeland	Scott et al. (2015)	+		
Niederlande	Boersema et al. (1991)	+		
Norwegen	Ihler (1995)	+	+	
Schweden	Nilsson et al. (1989)	+		
	Lind et al. (2007)	+	+	
Schweiz	Meier und Hertzberg (2005)	+	+	
Slowenien	Várady et al. (2000)	+		
	Königová et al. (2003)	+		
	Čerňanská et al. (2009)	+		
Ukraine	Borgsteede et al. (1997)	+		
	Kuzmina und Kharchenko (2008)	+		
USA	Slocombe und Cote (1977)	+		
	Herd et al. (1981)	+		
	Uhlinger und Johnstone (1985)	+		
	Herd und Gabel (1990)	+		
	Herd und Majewski (1994)		+	
	Lyons et al. (1996b)	+	+	
	Chapman et al. (1996)	+	+	
	Woods Jr et al. (1998)	+	+	
	Tarigo-Martinie et al. (2001)	+	+	
	Lyons et al. (2001)	+	+	
	Martin-Downum et al. (2001)	+		
	Little et al. (2003)	+	+	
	Kaplan et al. (2004)	+	+	
	Lyons et al. (2007)	+	+	
	Rossano et al. (2010)	+		
	Garcia et al. (2013)	+		
	Smith et al. (2015)	+	+	
Österreich	Becher et al. (2010)	+	+	

Für Pyrantel, einem Vertreter der Tetrahydropyrimidine ist die Resistenzlage weniger ausgeprägt. Die Hypothese, dass eine geringere anthelminthische Effektivität die Entwicklung von Resistenzen verlangsame, könnte das im Vergleich zu den BZ späte Auftreten von resistenten Populationen erklären (Kaplan, 2002). Doch existiert ebenfalls die gegensätzliche Annahme für TBZ, dass eine geringe Effizienz zur rapiden Entwicklung resistenter Populationen führt (Prichard, 2001). Als eine der Hauptursachen für die deutlich verringerte

¹ IVM

² FECR im fraglichen Bereich, Resistenz vermutet

Wirksamkeit von Pyrantel zur Behandlung von kleinen Strongyliden könnte auch eine in den USA und Kanada angewendete Therapieform sein, bei der infizierten Tieren täglich und über einen langen Zeitraum eine geringe Dosis des Wirkstoffes verabreicht wurde. Die regelmäßige, oft sub-therapeutische Behandlung hat möglicherweise zur Entstehung von extremen Resistenzen geführt (Kaplan, 2002; Kaplan et al., 2004). Die Tabelle 1 zeigt in welchen Ländern bisher resistente Populationen nachgewiesen werden konnten.

Aus der Gruppe der ML sind zwei Wirkstoffe für die Behandlung der kleinen Strongyliden zugelassen, IVM und MOX. Besonders IVM wurde über Jahrzehnte intensiv und häufig als einziger anthelminthischer Wirkstoff angewendet (Kaplan, 2002). Mehr als 30 Jahren nach der Markteinführung gelten Resistenzen gegen diese Klasse der Anthelminthika noch immer als selten (Wolstenholme und Kaplan, 2012). Betrachtet man die Ergebnisse aus Effektivitätsstudien mit Verwendung eines FECRT-Verfahrens wurde in vielen Ländern eine nahezu 100% ige Wirksamkeit der ML nachgewiesen (Molento et al., 2012). In Australien untersuchten Pook et al. (2002) die Wirkung von IVM mit Hilfe unterschiedlicher Resistenztests (FECRT, LDA). In allen Betrieben, die in die Studie mit aufgenommen wurden, konnte eine vollständige Effektivität von IVM nachgewiesen werden. Eine in den USA durchgeführte Studie aus dem Jahr 2004 kommt zu einem ähnlichen Ergebnis. In 44 Betrieben aus unterschiedlichen Bundesstaaten wurde durch IVM eine Reduktion der Eiausscheidung um 99,9 % erreicht (Kaplan et al., 2004). In Großbritannien wurde eine volle Wirksamkeit von IVM (98 %) und MOX (100 %), ebenfalls ermittelt durch einen FECRT, in mehreren Hundert Pferden nachgewiesen (Comer et al., 2006). In einer Untersuchung aus Großbritannien konnte sowohl für IVM, als auch für MOX eine mehr als 95% ige Effektivität gezeigt werden (Lester et al., 2013b). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse eines "off-label use" von MOX in einer Esel-Herde. Der Wirkstoff, zugelassen für die intramuskuläre Injektion im Rind, wurde oral an Esel verabreicht. Das anschließende Monitoring ergab eine ERP von 8 Wochen. Daraufhin wurden die Tiere erneut mit MOX behandelt und ein FECRT am Tag 14 (Gruppe 1) und am Tag 25 (Gruppe 2) nach Behandlung durchgeführt. Dabei reduzierte sich die Eiausscheidung in Gruppe 1 um 87 % und in Gruppe 2 um nur 31 %. (Trawford et al., 2005). Für diesen Fall wird eine Resistenz jedoch nur vermutet, da Dosierungsfehler und pharmakokinetische Unterschiede durch die nicht zugelassene Applikation und Tierart die Ursache für die verminderte Wirksamkeit sein könnten (Molento et al., 2012; Trawford et al., 2005). Erste Berichte über resistente bzw. multidrug-resistente Populationen stammen aus Brasilien, Italien und Großbritannien (Canever et al., 2013; Molento et al., 2008; Traversa et al., 2009b). In Deutschland wiesen von Samson-Himmelstjerna et al. (2007b) in 2 Betrieben eine verkürzte ERP von < 5 Wochen für IVM nach, was die Autoren in Anlehnung an Sargison et al. (2005) als einen Hinweis für reduzierte Wirksamkeit interpretierten. Auch in den USA wurden verkürzte ERP von 4 Wochen nachgewiesen und bei der Sektion behandelter Tiere ein erhöhter Anteil an L4 im Lumen des Dickdarms festgestellt bei gleichzeitiger Abwesenheit von Adultstadien in 3 von 4 Tieren. Aus diesem Grund wurde eine mögliche reduzierte Suszeptibilität der vierten Larven vermutet (Lyons et al., 2009; Lyons et al., 2008b). Für MOX wurde ebenfalls eine verkürzte ERP von 5 Wochen mit einer reduzierten Wirksamkeit gegen L4 und möglicherweise auch gegen enzystierte Larvenstadien nachgewiesen (Lyons et al., 2011; Lyons et al., 2010). Der Zusammenhang zwischen ERP und anthelminthischer Resistenz sowie die Festlegung einer einheitlichen Definition dieser Messgrößen sind nach Ansicht von Molento et al. (2012) wichtige Voraussetzungen für weitere Untersuchungen zur Resistenzsituation kleiner Strongyliden. Im Gegensatz zur weitgehend vorhandenen Suszeptibilität der kleinen Strongyliden haben viele nahverwandte Parasiten der kleinen Wiederkäuer und Rinder wie *H. contortus* und *C. oncophora* Resistenzmechanismen gegen ML entwickelt (2.2.3. Makrozyklische Laktone). Die im Vergleich langsame Resistenzentwicklung der Cyathostominen ist möglicherweise zum Teil begründet durch die Wirkung der ML gegen Stadien, die sich in der Darmwand befinden. Während sowohl in H. contortus, als auch in C. oncophora durch die Applikation von ML alle Stadien bei sensiblen Stämmen abgetötet werden, erreichen nur wenige Anthelminthika (MOX und Fenbendazol) enzystierte Larvenstadien der Cyathostominae. Auf diese Weise entwickelt sich ein Großteil der Population ohne anthelminthischen Selektionsdruck und bildet ein sog. Refugium. Der Erhalt eines Refugiums führt nach Ansicht einiger Autoren zur verlangsamten Akkumulation von resistenzassoziierten Allelen und dadurch zum Erhalt der Suszeptibilität (Kaplan, 2002; Sangster, 1999b; van Wyk, 2001). Zudem wird ein Zusammenhang mit der Art der Vererbung (dominant/rezessiv) des Resistenzmerkmals diskutiert. Untersuchungen dazu können allerdings erst nach dem Auftreten von resistenten Individuen unternommen werden (Kaplan, 2002). Einen weiteren Faktor stellt nach Kaplan (2002) die Anzahl der beteiligten Gene dar, die eine Resistenz vermitteln. Bei C. elegans z. B. vermittelt erst ein Funktionsverlust von 3 Genen, die für bestimmte Teile eines Glutamat-abhängigen Calciums-Kanals kodieren, eine IVM-Resistenz (Dent et al., 2000). Es wird angenommen, dass sich solche multigenic resistances deutlich langsamer innerhalb vieler Generationen entwickeln (Vercruysse und Rew, 2002b; Wolstenholme et al., 2004). Auch für ML-resistente Populationen findet sich eine Übersicht in Tabelle 1.

2.4. P-Glykoprotein

2.4.1. Struktur und Funktion

Pgps gehören zur Familie der ATP-Binding-Cassette (ABC)-Transportproteine. Sie sind in der Lage eine Vielzahl an Substraten von Ionen bis hin zu Makromolekülen durch die Zellmembran zu transportieren (Rees et al., 2009). Dafür binden und hydrolysieren Pgps ATP und nutzen die freigesetzte Energie zum konzentrationsunabhängigen Export ihrer Liganden. Diese Transportfunktion begründet ihre physiologisch wichtige Rolle im Zellstoffwechsel. So sind sie beteiligt an der Aufnahme von Nährstoffen, der Elimination von Metaboliten und der Zell-zu-Zell-Kommunikation (Linton, 2007). Kodiert werden diese Membranproteine durch die Gene der ABC-Superfamilie, die bisher in jedem identifizierten Genom nachgewiesen werden konnte (Sarkadi et al., 2006). Darüber hinaus werden ABC-Transporter in jeder Zelle aller Organismen exprimiert (Higgins, 1992). Das menschliche Erbgut enthält 48 Gene dieser Superfamilie, die entsprechend ihrer Sequenzhomologien in 7 Subfamilien von ABCA bis ABCG eingeteilt werden können (Dean und Annilo, 2005). Das humane Pgp wird kodiert durch das ABCB1-Gen. Mäuse besitzen zwei durch Gen-Duplikation entstandene Pgps, die jeweils durch das ABCB1- und ABCB2-Gen kodiert werden (Dean und Annilo, 2005). In Nematoden ist die Anzahl der Pgp-Gene sehr viel höher (14 in C. elegans) mit einer sehr ausgeprägten intra- und interspezifischen Divergenz (Lincke et al., 1992).

Pgps besitzen eine charakteristische Struktur aus 4 Domänen (Rees et al., 2009). Dazu gehören zwei nukleotid-bindende Domänen (NBD), die für die Bindung und hydrolytische Spaltung von ATP verantwortlich sind. Sie befinden sich im Zytoplasma der Zelle und zeichnen sich durch besonders konservierte Sequenzmotive aus. Vom NH₂- zum COOH-terminalen Proteinbereich finden sich der Walker A oder P-Loop, der Q-Loop, das ABC Signaturmotiv, Walker B und ein H-Loop, der auch als His-Switch bezeichnet wird. Während Walker A und B in vielen ATP-hydrolysierenden Proteinen vorkommen, ist das ABC-Signaturmotiv spezifisch für ABC-Transporter (Dean et al., 2001). Darüber hinaus besitzen diese Proteine zwei Transmembrandomänen (TMDs), die in die zelluläre Lipiddoppelmembran eingelagert sind. Im Gegensatz zu den NBDs weisen diese Domänen variierende Strukturen auf, welche die Diversität der zu transportierenden Substrate widerspiegeln (Rees et al., 2009; Sarkadi et al., 2006). Gemeinsam formen je 6 α-Helices eine Transmembrandomäne (Higgins, 2007). TMDs besitzen Substratbindungsstellen und ermöglichen die Translokation der Liganden entlang ihrer Transmembranstrukturen (Rees et al., 2009; Sarkadi et al., 2006). Obwohl die

Substrate sehr unterschiedlich sein können, teilen sie bestimmte Charakteristika. Sie sind amphi- oder lipophil, weisen eine plane Molekülform auf und enthalten häufig eine Ringstruktur (Ford und Hait, 1990).

Unter den humanen ABC-Transportern ist das Pgp das am besten untersuchte (Lawson et al., 2008). Doch es war nicht das humane Pgp, das erstmals 1976 erwähnt wurde. Bei der Untersuchung der Zellmembranbestandteile von Ovarienzellen chinesischer Hamster wurde die Expression eines Glykoproteins entdeckt. Die Menge dieses Proteins, das man ausschließlich in Kolchizin-resistenten Zelllinien nachweisen konnte, korrelierte quantitativ mit dem Grad der festgestellten Resistenz. Es wurde daher eine veränderte Wirkstoffpermeabilität dieser Zellmembranen vermutet und das Protein entsprechend als Permeability-Glykoprotein bezeichnet oder kurz Pgp (Juliano und Ling, 1976).

In ihrer Funktion als Transmembran-Pumpen sind humane Pgps an der Entstehung von sog. *multidrug*-Resistenzen beteiligt. In Tumorzelllinien führt eine Überexpression dieser Proteine zur Ausbildung von Resistenzen gegen eine Vielzahl von chemotherapeutischen Wirkstoffen (Higgins, 2007), weshalb sie bis heute wichtiger Bestandteil humanmedizinischer Forschung sind (Gottesman und Ling, 2006; Silva et al., 2015).

2.4.2. P-Glykoproteine in Nematoden

Mit dem Ziel der funktionellen Charakterisierung von Pgps in normalen und nicht tumorösen Zellen identifizierten (Lincke et al., 1992) vier MDR1/ABCB1-homologe Gene im Modellorganismus *C. elegans*. Diese wurden als *pgp-1*, *pgp-2*, *pgp-3* und *pgp-4* benannt. Die Ergebnisse dieser Studie bilden den Ausgangspunkt für die Erforschung von ABC-Transportern in weiteren Nematoden. Für *C. elegans* wurden nach der vollständigen Entschlüsselung des Genoms mit Hilfe von detaillierten Sequenzanalysen insgesamt 15 Gene für Pgps nachgewiesen (Lespine et al., 2008; Sheps et al., 2004a). Auf Grund ihrer ökonomischen Bedeutung, eines hohen Pathogenitätspotentials und der ausgeprägten Resistenzproblematik wurde das Vorkommen von Pgps besonders in Nematoden der Familie der Trichostrongylinae untersucht (Kerboeuf et al., 2003). Für *H. contortus* fanden sich bereits 1993 Hinweise auf die Expression von Pgps, die Veröffentlichung erster Sequenzen erfolgte jedoch erst einige Jahre später (Kwa et al., 1998; Sangster, 1994). Mit Hilfe bioinformatischer Methoden konnten publizierte Teilsequenzen 11 putativen Pgps in *H. contortus* zugeordnet werden (Kenworthy, 2013). Auch in weiteren Trichostrongyliden wurde die Expression von Pgps nachgewiesen. Aktuell sind 11 partielle Pgp-Sequenzen in *T. circumcincta* sowie 4 Pgp-Sequenzen in *C.*

oncophora veröffentlicht (De Graef et al., 2013; Demeler et al., 2013a; Dicker et al., 2011b). Von besonderer Bedeutung für die Humanmedizin war der Nachweis von potentiell resistenzassoziierten Pgps in O. volvulus, dem Erreger der Flussblindheit. Dabei konnten zwei Nukleotidsequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu humanen und Nematoden-Pgps nachgewiesen werden, wobei eine Sequenz jedoch nur für den N-terminalen Abschnitt des dimerischen Pgps kodiert. Auf Grund der Sequenzhomologien wurde dennoch eine mögliche Transportfunktion angenommen und das korrespondierende Protein als O. volvulus-Pgp-like-Protein (PLP-1) bezeichnet, während die andere, vollständige cDNA-Sequenz als OvoPgp-1 benannt wurde (Huang und Prichard, 1999). Unter Verwendung des gleichen Primer-Paares zur Amplifizierung von Pgp-kodierender cDNA in O. volvulus untersuchten Kwa et al. (1998) weitere Onchocerca spp. auf das Vorkommen von Pgps. Auf diese Weise konnten Teilsequenzen von orthologen Proteinen in Onchocerca gibsoni und Onchocerca ochengi nachgewiesen werden (Kwa et al., 1998). In Dirofilaria immitis wurde bisher ein Pgp-Gen identifiziert und auf resistenzassoziierte SNPs untersucht (Bourguinat et al., 2011). Ebenso enthält das Genom von Brugia malayi, einem weiteren humanpathogenen Fadenwurm, insgesamt 8 Pgps (Ardelli et al., 2010). Bei der Untersuchung von Parascaris equorum, einem vor allem für Jungtiere hochpathogenen Magen-Darm-Nematoden des Pferdes, wurden Orthologe zu C. elegans-PGP-11 und einem unbenannten C. briggsae-Pgp, das basierend auf phylogenetischen Analysen und entsprechend der Nomenklaturregeln nach Beech et al. (2010) als PeqPGP-16 bezeichnet wurde, sequenziert (Janssen et al., 2013a). Bei den kleinen Strongyliden wurde erstmals 2004 die Präsenz von Pgps bewiesen (Drogemüller et al., 2004c). Dabei konnten Teilsequenzen mit einer Länge von 268 oder 416 bp der jeweiligen NBD in den Spezies C. goldi und C. hybridus, C. elongatus, Cylicocyclus insigne, C. radiatus, C. nassatus und in C. coronatum, Cyathostomum pateratum und C. catinatum amplifiziert werden (Drogemüller et al., 2004c).

Während die Liste der identifizierten Sequenzen stetig erweitert wird, ist die natürliche Funktion dieser Proteine bisher weitestgehend unbekannt (Lincke et al., 1993). Funktionelle Analysen, die vor allem für *C. elegans* durchgeführt worden sind, haben für *pgp-2* eine Beteiligung an der Regulierung der Lysosom-Biogenese ergeben. Neben anderen Transmembrantransportern spielen *pgp-1 und pgp-5* im gleichen Modelorganismus eine Rolle in der Resistenz gegenüber Schwermetallen wie Cadmium, Arsen und Kupfer, während *pgp-3* beteiligt ist an einem Resistenzmechanismus gegenüber Cloroquin und Kolchizin (Broeks et al., 1996; Broeks et al., 1995; Kurz et al., 2007). Der *C. elegans*-Stamm NL130 mit einer zweifachen Deletion des *pgp-1-* und *pgp-3-*Gens zeigte sich darüber hinaus deutlich sensibler

gegenüber Phenazinen, toxischen Metaboliten des Bakteriums *Pseudomonas aeroginosa* (Mahajan-Miklos et al., 1999). Doch wie auch für Pgps in Säugerzellen, wurde in Nematoden besonders der Zusammenhang zwischen Pgp-Expression und der Entstehung von *multidrug*-Resistenzen untersucht (2.4.3 P-Glykoproteine und Anthelminthikaresistenz). Obwohl kleine Strongyliden bereits ausgeprägte Resistenzen gegenüber dem Großteil der zur Verfügung stehenden Anthelminthika entwickelt haben, ist bisher ausschließlich das Vorhandensein von Pgps in Cyathostominen untersucht worden (Drogemüller et al., 2004c). Vollständige Sequenzen oder funktionelle Charakterisierungen der korrespondieren Proteine sind bislang nicht verfügbar.

2.4.3. P-Glykoproteine und Anthelminthikaresistenz

Die chemische Struktur einiger anthelminthischer Wirkstoffe, wie z.B. BZ und ML, charakterisiert sie als potentielle Pgp-Substrate (Sangster et al., 1999). Es wurden mehrfach Hinweise auf eine Beteiligung am transmembranalen Transport ML durch Pgps gefunden. Bereits 1994 konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von Pgps und der Sensitivität gegenüber IVM in Mäusen festgestellt werden (Schinkel et al., 1994). Ein ähnliches Phänomen wurde in Collies beobachtet, deren MDR1-Gen eine Mutation aufwies. In beiden Fällen entwickelten die behandelten Tiere zentralnervöse Reaktionen nach der Applikation von IVM. Diese Intoxikationen wurden mit der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke auf Grund der fehlenden Pgp-Expression in Verbindung gebracht (Mealey et al., 2001). Der Nachweis von Pgps im Modelnematoden C. elegans und die Ergebnisse funktioneller Studien über die Beteiligung von Pgps an der Entstehung von Resistenzen in unterschiedlichen Zellen und Organismen, wie z.B. humanen Tumorzellen, Leishmania spp. und Plasmodium falciparum führten zur näheren Untersuchung dieser Proteine in parasitischen Nematoden wie H. contortus (Xu et al., 1998). Dieser wissenschaftliche Ansatz wird auch als candidate gene approach bezeichnet und ist letztendlich die Basis für alle bisherigen Ergebnisse zur Untersuchung von molekularen Resistenzmechanismen in Helminthen (Gilleard, 2006).

In *C. elegans* konnte in methodisch-unterschiedlichen Studien eine Pgp-abhängige ML-Sensitivität festgestellt werden. Unter Laborbedingungen mit IVM selektierte Stämme zeigten neben Kreuz- und Seitenresistenzen eine erhöhte Expression von *mrp-1* und *pgp-1*, die besonders bei Resistenzen gegen hohe Konzentrationen von IVM von Bedeutung waren (James und Davey, 2009). Bei der Untersuchung der Larvenentwicklung unter ML-Einfluss wiesen *knock-out* Mutanten bestimmter Pgp-Isotypen (*pgp-1, -8, -9, -11, -12*, und *-14*) eine verringerte IVM-Suszeptibilität auf als der Wildtyp-Stamm (Bristol N2) (Janssen et al., 2013b). Auch Ardelli und Prichard (2013) zeigten in ihren Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter Pgp-Isotypen und ML-Empfindlichkeit. Allerdings identifizierten sie in ihrer Studie andere Pgps als relevant für eine verringerte IVM-Suszeptibilität (*pgp-2, -5, -7, -12,* und *-13*). Ebenso haben Yan et al. (2012) die Funktion bestimmter ABC-Transporter in der Vermittlung einer IVM-Resistenz in *C. elegans* untersucht. Hier waren, teilweise abhängig von der eingesetzten ML-Konzentration, *pgp-1, -2, -3, -4, -12*, und *pgp-14* von Bedeutung.

Die Expression von Pgps wurde auch in parasitischen Nematoden als möglicher Resistenzmechanismus untersucht. In O. volvulus zeigte PGP-1 eine höhere Expression in Adult- als in Larvenstadien, was negativ mit der IVM-Empfindlichkeit korrelierte, d.h. eine hohe Expression führte zu einer verringerten Suszeptibilität (Huang und Prichard, 1999). Es konnte auch gezeigt werden, das Ovpgp ein Pgp-Homolog in O. volvulus, durch IVM selektiert wird und in der Folge einen reduzierten Allel-Polymorphismus besitzt als das Gen nicht selektierter Stämme (Ardelli et al., 2005, 2006). In H. contortus wurde eine erhöhte Expression von PGP-2 nach ML-Selektion festgestellt, sowie eine Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber IVM und MOX durch Verabreichung von Pgp-Inhibitoren (Xu et al., 1998). In spezifisch-selektierten Stämmen konnte zudem eine Reduzierung des genetischen Polymorphismus in *Hcopgp-2* nachgewiesen werden (Blackhall et al., 1998). Sie konnten darüber hinaus auch in BZ-selektierten Stämmen das erhöhte Vorkommen eines bestimmten Pgp-Allels im Vergleich zu nicht selektierten Stämmen feststellen (Blackhall et al., 2008). Insgesamt scheinen besonders *Hcopgp-2* und *Hcogp-9* eine Rolle in der IVM-Resistenz von *H*. contortus zu spielen (Williamson et al., 2011). In einem Versuch wurde durch den Einsatz kompetitiver Liganden bei heterolog exprimierten HcoPGP-9.1 (in situ-Lokalisierung im Uterus, weiblicher Genitaltrakt) und HcoPGP-2 (in situ-Lokalisierung in Pharynx, Vorderende des Verdauungstrakts und evtl. zugehöriges Nervengewebe) eine deutliche Interaktion der ML mit Ausnahme von MOX mit den Transportproteinen festgestellt (Godoy et al., 2016; Godoy et al., 2015b). Für T. circumcincta wurde ebenfalls pgp-9 als maßgeblicher Faktor für die IVM-Empfindlichkeit identifiziert, nachdem zuvor bereits eine Veränderung dieser Sensitivität durch Pgp-interferierende Wirkstoffe festgestellt worden war (Bartley et al., 2009; Dicker et al., 2011b). In C. oncophora wurden nach der Behandlung mit IVM bzw. MOX Hinweise auf eine erhöhte Expression von Pgps gefunden (Areskog et al., 2013; De Graef et al., 2013), und in der gleichen Nematodenspezies konnte im Rahmen eines in vitro-Testverfahrens auch in nachgewiesen IVM- und multidrug-resistenten Stämmen durch den spezifischen Pgp-Inhibitor Verapamil die Empfindlichkeit gegenüber IVM vollständig wiederhergestellt werden (Demeler et al., 2013a). Neben Verapamil wurde auch für den Zytochrom P450(CyP450)-inhibierenden Wirkstoff Piperonyl Butoxid (PBO) eine deutliche Steigerung der ML-Sensitivität in verschiedenen *in vitro*-Testverfahren für *C. oncophora* und *O. ostertagi* nachgewiesen (AlGusbi et al., 2014). Die Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung von CyP450-Proteinen bei der Detoxifizierung schließen.

Für die Parasiten der Pferde liegen bis heute ausschließlich Daten zu *P. equorum* vor. Durch heterologe Expression von *P. equorum-pgp-11* in einem *pgp-11*-defizienten *C. elegans*-Stamm konnte die Empfindlichkeit des Modellorganismus gegenüber IVM signifikant reduziert werden (Janssen et al., 2015). In vorhergehenden Untersuchungen wurde zusätzlich ein möglicherweise Resistenz-assoziiertes Allel des *pgp-11*-Gens nachgewiesen, das unter anderem als potentieller Marker für ML-Resistenz in diesem Organismus verwendet werden kann (Janssen et al., 2013a). Trotz vieler Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Pgp-Expression und ML-Transport ist dieser molekulare Resistenzmechanismus bis heute in resistenten kleinen Strongyliden nicht untersucht worden.

3. Zielsetzung

Die molekulare Identifizierung von Pgps hat in den vergangenen Jahren die Erforschung ihrer Transportaktivitäten, die Identifizierung von Substraten und den Nachweis von Interaktionen mit unterschiedlichen Wirkstoffen ermöglicht. Zahlreiche Untersuchungsansätze wurden entwickelt, u.a. qRT-PCR-Verfahren, heterologe Expression in Modellorganismen und induzierte Genmutationen oder -deletionen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Amplifizierung und Charakterisierung vollständiger Pgp-3 und Pgp-9-Sequenzen in verschiedenen Spezies kleiner Strongyliden. Als Basis dienten bereits veröffentlichte Teilsequenzen dieser Pgps. Des Weiteren sollten mit Hilfe einer heterologen Expression im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* eine potentielle Interaktion dieser Transporter mit KCON und unterschiedlichen Anthelminthika untersucht werden. Für diese funktionelle Analyse sollte ein Wachstumsassay etabliert werden, welches den Einfluss der Pgp-Expression auf die Wirkstoffsuszeptibilität der Hefestämme nachweisen kann.

4. Material und Methoden

4.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analytik Jena, Jena, Deutschland	Thermomixer TMix
Biometra, Göttingen, Deutschland	Standard Power Pack P25, Power Pack P25 T
BIO-RAD, München, Deutschland	C1000 [™] Thermal Cycler, Gießstände, S1000 [™] Thermal Cycler, Mini-Sub®Cell GT PowerPac Universal Power Supply, Wide Mini-Sub®Cell GT, Mini-Protean® Tetra Cell
Bibby Scientific Limited, Stone, UK	Stuart® gyro-rocker SSL3, Jenway 6051 Colorimeter
Biosan, Riga, Lettland	Schüttelinkubator ES-20
BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland	Synergy 4, Epoch
Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland	Filtertips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland	Kühl-Gefrier-Kombination
Biohit, Helsinki, Finnland	Pipettenfilter, Pipettenspitzen 100-5000 µl, Filtertips 5-300 µl
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Centrifuge 5415 R, Centrifuge 5430 R (Rotoren: FA-45-30-11, F-35-6-30), Kolbenhubpipetten Eppendorf Research: 1- 10µl, 10-100µl, 100-1000µl, 500-5000µl, Concentrator 5301
Erlab D.F.S S.A.S, Köln, Deutschland	Captair® mobiles Filtersystem
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland	Reax 2000
Hereaus Sepatech, Osterode, Deutschland	Biofuge pico, Biofuge 13
IKA, Staufen, Deutschland	Magnetrührer IKAMAG®RET, IKA® Vortex GENIUS 3
INTAS, Göttingen, Deutschland	UV-Illuminator TF-M 20×40cm
Knick, Berlin, Deutschland	pH-Meter 761 Calimatic
Liebherr, Bulle, Schweiz	Gefrierschrank Comfort, Kühl-Gefrier- Kombination Comfort NoFrost
LMS-GROUP, Tokyo, Japan	Minizentrifuge MCF-2360
Memmert, Schwabach, Deutschland	Wasserbäder
Mitsubishi Digital Electronics Inc., Irvine, USA	Digital Monochrom Thermal Printer P93-DW
OHAUS CORPORATIONS, Nänikon, Schweiz	Feinwaage Discovery DV215CDM

PROMEGA, Mannheim, Deutschland	MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand, Maxwell® 16 Research Instrument System
QIAGEN, Hilden, Deutschland	TissueRuptor (230 V, 50/60 Hz)
ROTH, Karlsruhe, Deutschland	Handstückzähler, Neubauer-Zählkammer, Autoklavierband, Chemikalienlöffel, Gewindeflaschen (0,1 l, 0,25 l, 0,5 l, 1 l), KIMTECH Mehrfachwischtücher, Latexhandschuhe, Nitrilhandschuhe, Parafilm M, Rotibo®-Skalpell-Klingen, Rotizell® Tissue-Tücher, Wägeschälchen
SARSTEDT, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland	Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml), Safe Seal Gefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml),
Sartorius Laboratory, Göttingen, Deutschland	Präzisionswaage LC220 S, Waage Acculab ALC-1100.2
Scotsman, Mailand, Italien	Flockeneisbereiter Scotsman® AF 100
Sharp Electronics, Hamburg, Deutschland	Großraummikrowelle
SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, Deutschland	Autoklav
Siemens AG, München, Deutschland	Gefrierschrank ÖKO plus electronic, Kühl- Gefrier-Kombination AntiBacteria
Sony, Berlin, Deutschland	Digital Graphic Printer UP-D897
Syngene, Cambridge, Großbritannien	Geldokumentation G:Box
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	Labor-Tiefkühlschrank Freezer Paket, Sicherheitswerkbank MSC-Advantage, Wärmeschüttelschrank MAX Q 6000
TKA Wasseraufbereitungssysteme, Niederelbert, Deutschland	TKA-GenPure
Welch Rietschle Thomas, Skokie, USA	WOB-L® Press/Vac Pump 2
VWR INTERNATIONAL GmbH, Darmstadt, Deutschland	Pipettierhilfe Pipetus®, Gas-Sicherheitsbrenner Gasprofi 1 SCS micro, Semi-dry-Blotter für Gele bis zu 20 × 20 cm, Schüttelinkubator Biosan ES20, Vortex VV3, Power Source

4.2. Software

BioEdit v7.1.11	(Hall, 1999)
Clone Manager professional Version 9	Scientific & Educational Software, USA
ClustalX version 2 multiple Sequence Alignment Program	(Goujon et al., 2010; Larkin et al., 2007)
Corel DRAW Graphics Suite X5	Corel Corporation, Ottawa, Kanada

Endnote® X5	Thomson Reuters, CA, USA
Gen5 [™] Datenanalyse-Software	BioTek Germany - European Coordination
	Center, Bad Friedrichshall, Deutschland
GeneSnap Version 7.09	Syngene (A Division of Synoptics),
	Cambridge, UK
GraphPad Prism 5.03	GraphPad Software, La Jolla, USA,
	www.graphpad.com
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
R version 2.14.2	R Development Core Team, R Foundation for
	Statistical Computing, Austria
PhyML3.0	(Guindon et al., 2010)
MEGA5	(Tamura et al., 2007)
TopPred 0.01	(Claros und von Heijne, 1994; von Heijne, 1992)
Grofit	(Kahm et al., 2010)

4.3. Reaktionskits

G-BIOSCIENCES: St. Louis, USA	CB-X [™] Protein Assay
Life Technologies GmbH, Darmstadt,	pCR4-TOP10-Cloning Kit, pYes2.1-TOP10-
Deutschland	Cloning Kit
MACHEREY UND NAGEL GmbH,	NucleoSpin Plasmid Kit
Düren, Deutschland	
Merck Chemicals KgAa., Darmstadt,	YeastBuster TM Protein Extraction Reagent
Deutschland	
PEQLAB Biotechnologie GmbH,	peqGold TriFast™ Reagent
Erlangen, Deutschland	
Promega GmbH, Mannheim,	Pure Yield Midi-Prep Kit, simplyRNA
Deutschland	Maxwell Kit 16 LEV
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,	3'/5'-RACE Kit, High pure PCR product
Deutschland	purification Kit
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham,	RevertAid® first strand cDNA synthesis Kit,
USA	SuperSignal® West Pico Chemiluminescent
	Substrate
Zymo Research GmbH, Freiburg,	DNA Clean and Concentrator [™] Kit
Deutschland	

4.4. Chemikalien und Enzyme

ACRIS ANTIBODIES GmbH, Herford,	Pgp-Antikörper (C219)
Deutschland	
Beckmann Coulter, Brea,	Mouse IgG 2a λ Antikörper
, ,	
USA	

Becton, Dickinson and Company, Sparks,	Bacto Agar
USA	
Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe,	Agarose Neo Ultraqualität, Rotiphorese NF
Deutschland	Acrylamid/Bis Lösung 30%, D+Galactose,
	Glycerin, Rotipuran, Hefe-Extrakt, LB-
	Medium, Lithiumacetat, Di-
	Natriumhydrogenphophat, Kanamycin Sulfat,
	Carbenicillin Dinatriumsalz, Lithium Acetat,
	(D+)-Raffinose Pentahydrat, Ethanol reinst
Invitrogen Life Technologies GmbH,	Accu Prime [™] Taq DNA Polymerase, Accu
Darmstadt, Deutschland	Prime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity,
	Oligonucelotide, Primer, Anti-V5-Antikörper
MERCK KGaA, Darmstadt,	D+Glukose Monohydrat
Deutschland	
Sigma Aldrich Chemie GmbH, München,	Polyethylenglykol (PEG)-3350, Uracil, Yeast
Deutschland	synthetic Drop-out Medium supplement
	without Uracil, Yeast Nitrogen Base with
	Amino Acids, Ketoconazol, Ivermectin
Thermo Fisher Scientific, Whaltman,	Restriktionsenzyme; DNAse (1U/ µ l),
USA	Glykogen (20 mg/µl); EDTA (0,5 M; pH 8,0);
	Phusion High Fidelity DNA Polymerase

Becton Dickinson and Company Sparks Bacto A

4.5. Puffer und Lösungen

10× LiAc Puffer	1 M Lithiumacetat (pH 7,5) in bidest H ₂ O
1× LiAc Puffer	1:10 Verdünnung von 10×LiAc Puffer mit
	bidest H ₂ O
$1 \times \text{LiAc}/0, 5 \times \text{TE Puffer}$	100 mM Lithiumacetat (pH 7,5); 5 mM Tris-
	HCL (pH 7,5); 0,5 mM EDTA
1× LiAc/40 % PEG-3350/1×TE Puffer	100 mM Lithiumacetat (pH 7,5); 40 % PEG-
	3350, 10 mM Tris-HCL (pH 7,5); 1 mM
	EDTA
10× TE Puffer	10 mM Tris (pH 7,5); 1 mM EDTA
1× TE Puffer	1:10 Verdünnung von 10×TE Puffer mit
	bidest H ₂ O
B-Agar	15 g Bacto-Agar/l LB-Medium
Blockierungspuffer	BSA 2 mg/ml in PBS
LB-Medium	20 g LB-Medium Fertig Mix (ROTH) /l
	bidest. H ₂ O
Natrium-Acetat	3 M Natriumacetat; bidest. H ₂ O (DEPC
	behandelt) pH 5,5
SDS-Laufpuffer (10×):	0,25 M Tris, 2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS
SDS-Sammelgelpuffer (4×)	0,5 M TRIS, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer (4×):	1,5 M TRIS, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8

Synthetischer Minimalagar	20 g Bacto-Agar/l Synthetisches Minimalmedium
Synthetisches Minimalmedium	6,7 g Yeast nitrogen base with amino acids; 1,6 g Yeast synthetic Drop-out Medium supplement without uracil; 40 ml 50%ige Glucose; ad 1 l bidest. H ₂ O
Synthetisches Induktionsmedium	6,7 g Yeast nitrogen base with amino acids; 1,6 g Yeast synthetic Drop-out Medium supplement without uracil; 100 ml 10%ige Raffinose; 100 ml 20%ige Glucose; ad 1 l bidest H ₂ O
TAE-Puffer	2 M Tris; 5,71 % Eisessig; 1 mM EDTA (pH 8,0)
Transfer-Puffer	24 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % Methanol
TS-Puffer	150 mM NaCl; 10 mM Tris; pH 7,5
TST-Puffer	150 mM NaCl; 10 mM Tris; 0,05 % (v/v) Tween-20; pH 7,5
YPD-Agar	15 g Bacto-Agar/l YPD-Medium
YPD-Medium	20 g Trypton/Pepton; 10 g Hefeextrakt; 100 ml 20%ige Glucose; ad 1 l bidest. H ₂ O
50% ige Trichloressigsäure v/v	5 ml Trichloressigsäure, 5 ml bidest. H ₂ O
Ladungspuffer 6×	10 mM Tris-HCL (pH 7,6), 0,03 % Bromphenolblau, 60 % Glycerol, 60 mM EDTA

4.6. Biologisches Material

4.6.1. Bakterienstämme

Escherichia coli TOP10 Sicherheitsstamm Genotyp: F- *mcr*A D(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ 80*lac*Z Δ M15 Δ *lac*X74 recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G λ -Verwendung: Wirtszellen für Plasmide im Rahmen einer Klonierung Herkunft: Life Technologies GmbH, Darmstadt

4.6.2. Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae AD1-7 (Rogers et al., 2001) Genotyp: Δyor1 Δsnq2 Δpdr5 Δpdr10 Δpdr11 Δycf1 Δpdr3 Verwendung: Wirtsstamm für die Expression von rekombinantem Pgp aus *C. elongatus* Herkunft: Marcin Kolaczkowski, Universität für Medizin Warschau, Fachbereich für Biophysik, Warschau, Polen Saccharomyces cerevisiae JRY8012 (Jeong et al., 2007) Genotyp: Δpdr5 Δsnq2 Δyor1 Verwendung: Wirtsstamm für die Expression von rekombinantem Pgp aus *C. elongatus* Herkunft: Jasper Rine, Department of Molecular and Cell Biology, University of California Berkeley, Berkeley, Kalifornien, USA

4.6.3. Plasmide

pCR4-TOPO

Verwendung: Vektor für die Klonierung, Sequenzierung und Transformation von DNA-Fragmenten in den *E. coli*-Stamm TOP10/ P3 Herkunft: Life Technologies GmbH, Darmstadt

pYes2.1-TOPO

Verwendung: Vektor für die Klonierung, Sequenzierung und Transformation von Pgps in *S. cerevisiae*-Stämme AD1-7 und JRY8012 Herkunft: Life Technologies GmbH, Darmstadt

4.6.4. Parasiten

Vitale präadulte Cyathostomine sowie Adultstadien wurde im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin isoliert. Dafür wurde der Magen-Darmtrakt von im Rahmen finaler parasitologischer Untersuchungen als unbehandelte Kontrolltiere euthanasierter Pferde entnommen und in Abschnitten eröffnet. Die Darmmukosa und -ingesta wurde mit 37 °C warmer, physiologischer Kochsalzlösung über einem Sieb abgespült. Vorhandene Parasiten wurden mit Pinzetten von der Sieboberfläche aufgenommen und ebenfalls in erwärmter, physiologischer Kochsalzlösung gesammelt. Die mikroskopische Differenzierung und Spezieszuordnung der Nematoden erfolgte durch Dr. Tetiana Kuzmina³. Die Parasiten wurden ohne weitere Zugaben in 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäßen einzeln oder gepoolt auf Trockeneis eingefroren und dann bei -80 °C aufbewahrt.

³ Department of Parasitology, Schmalhausen Institute of Zoology; National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Weitere adulte Parasiten stammten aus früheren Sammlungen, die am Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt wurden. Die Proben wurden einzeln oder gepoolt bei -80 °C gelagert.

Nematoden der Spezies *C. elongatus* und *C. insigne* wurden im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit von Dr. Michaela Drogemüller (Pape, 2001) gesammelt und bestimmt. Die Lagerungsbedingungen entsprechen den oben beschriebenen.

4.7. Isolation von Gesamt-RNA

4.7.1. RNA aus Parasiten

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus Nematoden wurde das peqGOLD TriFast[™] Reagenz (PEQLAB) verwendet. Die Durchführung basiert auf der Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (2006). Dafür wurde das gefrorene Parasitenmaterial (< 100 mg) mit Hilfe eines elektrischen Handhomogenisators (QIAGEN) in 1 ml gekühltem TriFast-Reagenz vollständig zerkleinert. Zur Lysierung der Zellen wurde die Probe für 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform (Carl Roth) erfolgte eine kräftige Durchmischung mit einem Vortexgerät und anschließend eine Inkubation bei Raumtemperatur für weitere 5 min. Zur Phasentrennung wurde die Probe bei $12000 \times g$ für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues, steriles 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 µl Glykogen (Thermo Fisher Scientific) und 500 µl auf -20 °C gekühltes Isopropanol (Carl Roth) wurde die enthaltene RNA gefällt. Dafür wurde die Probe bei -20 °C über Nacht inkubiert und dann für 60 min bei 12000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet zweimal mit 75% igem Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgt die Resuspendierung der RNA in 500 µl nuklease-freiem H₂O (Roth) und eine erneute Fällungsreaktion. Dafür wurden der Probe 50 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5) und 500 µl auf -20 °C gekühltes Isopropanol (Carl Roth) zugefügt, kräftig gemischt und erneut über Nacht bei -20 °C inkubiert. Zentrifugation und Waschung der RNA erfolgte wie oben beschrieben. Das getrocknete RNA-Pellet wurde in 50 ul nuklease-freiem H₂O (Roth) gelöst. Der RNA-Gehalt und Reinheitsgrad wurde in einem Photometer (Synergy4, Epoch) bestimmt. Zur Überprüfung der Integrität der RNA-Probe wurde ein 1 µl Aliquot in einer Gelelektrophorese verwendet.

4.7.2. RNA aus Hefezellen

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus S. cerevisiae wurde das Maxwell® 16 LEV simplyRNACells Kit (PROMEGA) verwendet. Das Maxwell® 16-System erlaubt eine automatische Extraktion von RNA, DNA oder Protein abhängig vom verwendeten Kit. Für die RNA-Isolation wurde jeweils eine Kolonie der Hefen in 5 ml Induktionsmedium überführt und für 24-48 h bei 30 °C geschüttelt (250 rpm). Die Kulturen wurden in 15 ml Plastikröhrchen überführt und bei 3000 × g für 2 min zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde bei 4 °C durchgeführt. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Zellpellet anschließend in 200 µl Homogenisationslösung (im Kit enthalten) resuspendiert. Nach der Zugabe von Glaskügelchen (SIGMA ALDRICH) wurde die Probe für 5 min intensiv gemischt und dann sofort auf Eis gelagert. Die Kartuschen und das Maxwell-Gerät wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. Nach der Zugabe von 200 µl Lysispuffer (im Kit enthalten) wurden die Proben erneut für 15 s gemischt und anschließend bei 13800 × g für 3 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden vorsichtig 400 µl abgenommen und in die entsprechende Tasche der Kartusche pipettiert. Nach Einsetzen der Kartusche in das Gerät wurde das "simplyRNA"-Programm gestartet. Das Elutionsvolumen betrug 50 µl nuklease-freies Wasser. Sobald das Isolationsprogramm beendet war, wurden die Proben in einen magnetischen Separationsstand (PROMEGA) eingesetzt und 10 min auf Eis gelagert. Dieser Stand sammelt überführte Isolationskügelchen am Boden des Probengefäßes. Nach der Inkubation wurden die Überstände in neue 0,5 ml Mikrozentrifugationsgefäße pipettiert und ihr RNA-Gehalt photometrisch bestimmt.

4.8. DNase Verdau der RNA

Zur Entfernung kontaminierender, genomischer DNA wurden die RNA-Proben einem enzymatischen Verdau mit DNase (Thermo Fisher Scientific) unterzogen. Ein 10 µl Ansatz enthielt:

	\leq 500 ng	RNA
	1,0 µl	10× DNase Puffer (im Kit enthalten)
	1,0 µl	DNase I (1 U/µl, Thermo Fisher Scientific)
ad	10 µl	bidest. H ₂ O

Die Probe wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Inkubationsschritt wurde nach der Zugabe eines weiteren Mikroliters DNase wiederholt. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde die Reaktion nach dem Hinzufügen von 1 µl EDTA (0,5 M; pH 8,0; Thermo Fisher Scientific) für

10 min bei 65 °C inkubiert. Die RNA wurde direkt im Anschluss für die Erststrang-cDNA-Synthese verwendet. Alternativ wurde sie bei -80 °C gelagert.

4.9. Erststrang-cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kits (Thermo Fisher Scientific) wurde RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt. Um vorwiegend poly(A⁺) mRNA der isolierten Gesamt-RNA in cDNA zu transkribieren, wurde der Oligo(dT)₁₈-Primer verwendet. Für Reaktionen mit degenerierten Primern wurde RNA mit einem Random Hexamer Primer (100 μ M) in cDNA umgeschrieben. In diesem Fall bestand die Primer-Lösung aus einer Mischung von zufälligen, einzelsträngigen Hexanukleotiden. Diese Primer wurden eingesetzt, wenn RNA-Abschnitte mit unbekannter Sequenz, die sich nicht unmittelbar am 5'- oder 3'-Ende der mRNA befanden, in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer PCR amplifiziert wurden. Alle benötigten Komponenten waren im Kit enthalten. Ein 20 μ l Ansatz bestand aus:

4,0 µl	5× Reaktionspuffer
1,0 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1,0 µl	Oligo $(dT)_{18}$ -Primer (100 μ M) bzw.
	Random Hexamer Primer (100 µM)
0,5 µl	RiboLock TM RNase Inhibitor (20 u/µl)
1,0 µl	RevertAid TM Reverse Transkriptase (200 u/µl)
0,05 - 2 μg	Gesamt-RNA

Das Volumen wurde mit nuklease-freiem Wasser (im Kit enthalten) auf 20 µl aufgefüllt und anschließend 30 min bei 50 °C und 5 min bei 85 °C inkubiert. Ein identischer Kontrollansatz wurde ohne Zusatz des Enzyms Reverse Transkriptase hergestellt, um DNA-Kontaminationen der cDNA-Probe auszuschließen. Diese Probe wurde in der sich anschließenden PCR wie ein cDNA-Template verwendet. Kam es zu Amplifikationsreaktionen in dieser Probe, sichtbar als Banden in der Gelelektrophorese, musste davon ausgegangen werden, dass die RNA-Probe noch DNA enthielt. In diesen Fällen wurde eine Wiederholung des DNAse-Verdaus, der cDNA-Synthese sowie der PCR durchgeführt. Nach der Synthese konnten cDNA-Proben kurzfristig bei -20 bzw. für längere Lagerungszeiten bei -80°C aufbewahrt werden.

4.10. Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.10.1. Primer

Tabelle 2: Übersicht über verwendete Primer zur Amplifikation der Zielgene mit Annealingtemperatur, Elongationszeit und Polymerase.

Primer	Sequenz (5'-3')	Ta	T _e	Polymerase
Ceg-Pgp3-vorF1	AARATGAGCAYGGWATBGARMRRATHAARGA YGGWATYGGAGAYAA	50/60 °C	1 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp3-vorF1a	AARATGAGCAYGGWATBGARMRRATHAARGA YGGWATYGGAGAYAA	50/60 °C	1 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp3-vorR1	TCAAAHGGYTGHGCRTTRAADGCCATMACHG TYCKDATHCCRGCRATYACTTCRTTKGC	50/60 °C	1 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp3-3R1	TGGGGCAGGAACCAACTCTCTTCAACATGACC ATT	60 °C	2 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp3-3R2	TTATGTCATTACCAGATGCCTATGACACGGTG GTT	60 °C	2 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp3-5R1	CGATACCACCAGCTGTTG	-	-	cDNA Synthese
Ceg-Pgp3-5R2	ATTTGGCAGCTCTTGAGATGATCTTCGTCGAA	60 °C	7 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp3-5R3	GAGAAGTGCTGGTACCGCAAATATCATCAGCA T	55 °C	7 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp3-5R4	CACTCAGGTAGAAACCTATCGCTATGCCAGCA A	55 °C	7 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp3-full-up	AGCCTTACTCTCCGTTGCTGTTTATTCTGT	50 °C	7 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp3-full-lo	CCACGTGCATATCCTGTACCCTGAGTATTGAT	50 °C	7 min	Accu Prime ¹
pYes-Ceg-Pgp3- Start	AAAAAAATGAAGGCCGCACCTCTGGATAAAG TCAA	63/55°C	2 min	Phusion ³
pYes-Ceg-Pgp3-lo	TTAATGATTCTGACGTTCTACAAGCTTATAGT A	63/55°C	2 min	Phusion ³
pYes-Ceg-Pgp3-His	ATGATTCTGACGTTCTACAAGCTTATAGTACA T	55 °C	5 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp9-vorF2	CTMACNCTNATYATGATGTC	50/60 °C	1 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp9-3R1	GCGCTCATTAGAAATCCTAAAATTC	55 °C	1 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp9-3R2	AATCCTAAAATTCTTCTGCTTGATG	55 °C	1 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp9-5R1	CCGCCAAAGCAACGTCGTATCTT	-	-	cDNA Synthese

Primer	Sequenz (5'-3')	Ta	T _e	Polymerase
Ceg-Pgp9-5R2	GGTTGGCCATTGAAGGCAATGACTGTCCTCAT T	60 °C	1 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp9-5R3	TCCAAAGTAGAATGCGATACCAATACCACAAC ATA	50/60 °C	1 min	Accu Prime ¹
Ceg-Pgp9-full-up	GAGGTAGTCGCATAAATGGGACTGTTCAA	68 °C	2 min	Phusion ³
Ceg-Pgp9-full-lo	TTGCTTACACGTATCGAGATCATAG	68 °C	2 min	Phusion ³
pYes-Ceg-Pgp9- Start	AAAAAAATGGGACTGTTCAAAAAGAAAGAAG AA	55 °C	4 min	Accu Prime ²
pYes-Ceg-Pgp9-lo	AAGATCTAAAGTCAGTTGGTGTGAATATTC	55 °C	4 min	Accu Prime ²
pYes-Ceg-Pgp9-His	GTTGGTGTGAATATTCTGTTTCTGCGTGAG	55 °C	4 min	Accu Prime ²
Oligo d(T)- Ankerprimer	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTV	55 /60 °C	1/2/5/7 min	Accu Prime ¹
PCR Ankerprimer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	55 /60 °C	7 min	Accu Prime ¹
^a Annealingtemperatur	¹ Accu Prime TM Taq DNA Polymerase	³ Phusio	n™ Hot Sta	rt Polymerase

^a Annealingtemperatur

² Accu PrimeTM High fidelty Polymerase

^e Elongationszeit

4.10.2. Synthese von Oligonukleotiden

Mit der Synthese von Oligonukleotiden wurde das Unternehmen Invitrogen Life Technologies GmbH, Deutschland beauftragt.

4.10.3. PCR mit degenerierten Primern

Für die de novo Sequenzierung von bisher unbekannten Pgp-Sequenzen kleiner Strongyliden mussten zunächst mit Hilfe von degenerierten Primern Teilsequenzen amplifiziert werden. Dies wurde als Vorbereitung für die 5'- und 3'-RACE durchgeführt. Degenerierte Primer sind dabei eine mögliche Methode zum Nachweis homologer Gene. Basierend auf einem Sequenz-Alignment von C. elegans-pgp-3 (Wormbase: CE03818), C. briggsae-pgp-3 (Wormbase: BP: CBP26138), H. contortus-pgp-3 und C. oncophora-pgp-3, wurden besonders konservierte Bereiche auf Nukleotidebene identifiziert und Oligonukleotide für Cegpgp-3 innerhalb dieser Sequenzbereiche ausgewählt. Für Cegpgp-9 ist bisher kein homologes Gen in C. oncophora identifiziert worden. Aus diesem Grund sind nur die drei ersten Spezies C. elegans pgp-9 (WB: CE15714), C. briggsae-pgp-9 (BP: CBG05664) und H. contortus-pgp-9 in das Alignment miteinbezogen worden. Alle H. contortus-Sequenzen wurden freundlicherweise durch Prof.

Roger Prichard⁴ zur Verfügung gestellt. Degenerierte Oligonukleotide zeichnen sich durch eine definierte Sequenzvariabilität aus. Der Einsatz dieser Mischung unterschiedlicher Primer in einer PCR erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Bindung an die Template-DNA mit unbekannter Sequenz. Allerdings ist damit auch eine geringere Spezifität des Amplikons verbunden. Zur Optimierung der Ergebnisse wurden unterschiedliche Annealingtemperaturen und Elongationszeiten verwendet. Alle erfolgreich angewendeten Protokolle sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die cDNA Synthese wurden für diese PCR mit einem Random Hexamer Primer (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

Ein 25 µl PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

16,0 µl	bidest H ₂ O
2,5 µl	Vorwärtsprimer (100 μM)
2,5 µl	Rückwärtsprimer (100 µM)
0,5 µl	Accu Prime [™] Taq DNA Polymerase (Life Technologies)
2,5 µl	Accu Prime [™] Puffer 1 (Life Technologies)
1,0 µl	cDNA

Nach Abschluss der Reaktion wurden die Produkte in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. DNA-Fragmente, deren Größe mit der erwarteten Anzahl an Basenpaaren übereinstimmte, wurden aus dem Gel extrahiert und nach der Aufreinigung und Klonierung in *E. coli* durch Sequenzierung überprüft.

Tabelle 3: PCR-Protokolle für RT-PCR mit degenerierten Primern zur Amplifizierung von Teilsequenzen von *Ceg*Pgp-3 und *Ceg*Pgp-9. RNA wurde dafür aus adulten *C. elongatus* isoliert und in cDNA umgeschrieben.

Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Protokoll
	Ceg-Pgp3-vorR1	94 °C - 2 min
Ceg-Pgp3-vorF1		10 Zyklen
		94 °C - 15 s
		50 °C - 30 s
	Ceg-Pgp3-vorR1	68 °C - 1 min
Ceg-Pgp3-vorF1a		30 Zyklen
		94 °C - 15 s
		60 °C - 30 s
Ceg-Pgp9-vorF2	Ceg-Pgp-5R3	68 °C - 1 min
		Kühlung auf 4 °C

⁴ McGill University, Kanada

4.10.4. 3'-RACE

Für die Durchführung der RACE-PCR, einer speziellen Form der RT-PCR, wurde das 3'/5' RACE Kit 2nd generation (ROCHE) verwendet. RACE steht für *rapid amplification of cDNA ends* und umfasst eine cDNA-Synthese, eine PCR sowie eine semi-nested PCR. Dabei können nicht charakterisierte 5'- und 3'-Bereiche einer mRNA mit einer Kombination aus einem spezifischen und einem sog. Ankerprimer amplifiziert werden (Loh et al., 1989; Ohara et al., 1989). Für die cDNA-Synthese zur Durchführung einer 3'-RACE wurde ein Oligo(dT)₁₈-Ankerprimer eingesetzt. Dieser bindet an eine Poly-A-Sequenz, wie sie hinter der 3'-UTR eukaryotischer mRNAs vorkommt. Auf diese Weise wird mRNA der isolierten Gesamt-RNA bevorzugt in cDNA umgeschrieben. Der Ansatz des Synthesegemisches umfasste

4,0 µl	cDNA Synthese Puffer (im Kit enthalten)
2,0 µl	Deoxynucleotid-Mix (10 mM, Thermo Fisher Scientific)
1,0 µl	Oligo(dT) ₁₈ -Ankerprimer (37,4 μ M)
0,05 – 1,2 μg	Gesamt-RNA
1,0 µl	Transkriptor Reverse Transkriptase (25 U/µl)

und wurde mit nuklease-freiem H₂O zu einem Volumen von 20 μ l vervollständigt. Nach vorsichtigem Vermischen der Komponenten und kurzem Zentrifugieren wurde der Syntheseansatz für 60 min bei 55 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 85 °C im Thermocycler beendet. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis gekühlt.

PCR-Reaktionsansätze wurden auf Eis in einem Gesamtvolumen von 25 μ l hergestellt. Darin enthalten waren:

18,75 µl	bidest. H ₂ O (DEPC-behandelt, Carl Roth)
2,5 µl	10× Accu Prime [™] Puffer 1
1,25 µl	spezifischer Vorwärts-Primer (10 µM)
1,0µl	PCR-Ankerprimer (12,5 µM)
0,5 µl	Accu Prime [™] Taq DNA Polymerase (Life Technologies)
1,0 µl	cDNA

Das PCR Protokoll wurde entsprechend der Schmelztemperatur der Primer, der Länge des gesuchten Fragmentes und der verwendeten Polymerase angepasst. Die Protokolle für die Durchführung der PCR unter Verwendung der Accu Prime[™] Taq DNA Polymerase (Life Technologies) sind im Folgenden aufgeführt (Tabelle 4).

Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Protokoll
Ceg-Pgp3-3R1		94 °C - 2 min 40 Zyklen 94 °C - 15 s
Ceg-Pgp3-3R2	Olice(dT) Antemprimer	60 °C - 30 s 72 °C - 2 min Kühlung auf 4 °C
Ceg-Pgp9-3R1	Oligo(d1) ₁₈ -Ankerprimer	94 °C - 2 min 40 Zyklen 94 °C - 15 s 55 °C - 30 s
Ceg-Pgp9-3R2		72 °C - 1 min tE ^a 72 °C - 5 min Kühlung auf 4 °C

Tabelle 4: PCR-Protokolle der 3'-RACE zur Amplifizierug des 3'-Endes von *Ceg*Pgp-3 und –Pgp-9. RNA wurde aus adulten *C. elongatus* extrahiert und in cDNA umgeschrieben.

^a terminale Elongation

Jeder PCR Lauf wurde von einer Negativkontrolle begleitet. Diese enthielt statt des spezifischen Primers 1,25 µl DEPC-behandeltes bidest. H₂O (Carl Roth). Der PCR-Ansatz der nested PCR war mit Ausnahme des spezifischen Vorwärtsprimers zum ersten Ansatz identisch. Die Primersequenz wurde so gewählt, dass die komplementäre Sequenz im Bereich des ersten Amplifikates lag. Die Produkte wurden anschließend in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und das Ergebnis dokumentiert.

4.10.5. 5'-RACE

Die 5'-RACE dient der Amplifikation der 5'-UTR einer Gensequenz. Im Gegensatz zur 3'-RACE trägt die mRNA in diesem Genabschnitt keine Poly-A-Sequenz mit der Möglichkeit zur Bindung eines universellen Oligo(dT)₁₈-Primers. In einem Zwischenschritt, dem sogenannten "Poly-A-Tailing", wird eine solche A-Sequenz an den cDNA-Pool angefügt. In der nachfolgenden PCR kann diese Sequenz als Ankersequenz für die Bindung eines universellen Primers dienen (Ohara et al., 1989). Wie für die 3'-RACE, wurde auch für diese Reaktion das 3'/5' RACE Kit 2nd generation (ROCHE) verwendet.

Der cDNA-Syntheseansatz zur Durchführung der 5'-RACE wurde ebenfalls auf Eis hergestellt. Die benötigten Enzyme und Lösungen mit Ausnahme der hierfür notwendigen Genspezifischen Primer waren im Kit enthalten.

Ein 20 µl Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

4,0 µl	cDNA Synthesepuffer
2,0 µl	Deoxynucleotid-Mix (10 mM)
1,25 µl	spezifischer Rückwärtsprimer (10 μM)
0,05 – 1,2 μg	Gesamt-RNA
1,0 µl	Reverse Transkriptase (25 U/µl)

Das fehlende Volumen wurde mit nuklease-freiem H_2O (Roth) aufgefüllt, gemischt und kurz zentrifugiert. Die Inkubation erfolgte wiederum im Thermocycler für 60 min bei 55 °C und 5 min bei 85 °C. Die Reaktion wurde auf Eis beendet und das Produkt mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kits (ROCHE) nach Herstellerangaben für die PCR vorbereitet. Anschließend erfolgte das Anfügen einer Poly-A-Sequenz mit Hilfe der terminalen Transferase (80 U/µl, Roche) und dATP (2 mM, ROCHE) am 5'-Ende der cDNA. Dafür wurde Folgendes eingesetzt:

19,0 µl	aufgereinigte cDNA
2,5 μL	10× Reaktionspuffer
2,5 µl	dATP (2 mM)

Die Komponenten wurden kurz gemischt und für 3 min bei 94 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Nach einer kurzen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wurde der Ansatz mit 1 µl Terminaler Deyoxynukleotidyl-Transferase (80 U/µl, ROCHE) versetzt. Nach kurzem Mischen erfolgte das Poly-A-Tailing bei 37 °C für 20 min. Die enzymatische Reaktion wurde bei 70 °C innerhalb von 10 min gestoppt und die Probe bis zur Verwendung in einer PCR auf Eis gelagert.

Die sich sofort anschließende PCR enthielt folgende Komponenten:

17,25 µl	bidest. H ₂ O (DEPC behandelt, Carl Roth)
1,0 µl	Oligo(dT) ₁₈ -Ankerprimer (12,5 µM, ROCHE)
1,25 µl	spezifischer Vorwärtsprimer (10 µM)
2,5 µl	10× Accu Prime [™] Puffer 1 (Life Technologies)
0,5 µl	Accu Prime [™] Taq DNA Polymerase (Life Technologies)
2,5 µl	cDNA

Die angewendeten PCR-Protokolle sind in Tabelle 5 aufgelistet. PCR-Produkte wurden über eine Gelelektrophorese aufgetrennt, durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und dokumentiert. Eine semi-nested PCR wurde bei Bedarf im Anschluss durchgeführt. Dafür wurde im Unterschied zum bereits beschriebenen Reaktionsansatz 1,25 μ l des spezifischen nested Primers (10 μ M) und 1 μ l PCR-Produkt als DNA-Template verwendet.

Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Protokoll
Oligo(dT) ₁₈ -Ankerprimer	Ceg-Pgp3-5R2	94 °C - 2 min 40 Zyklen
PCR Ankerprimer	Ceg-Pgp3-5R3	94 °C - 15 s 55 °C - 30 s 72 °C - 7 min Kühlung auf 4 °C
	Ceg-Pgp3-5R4	
Oligo(dT) ₁₈ Ankerprimer	Ceg-Pgp9-5R2	94 °C - 2 min 40 Zyklen 94 °C - 15 s 50 °C - 30 s 72 °C - 1 min tE ^a 72 °C - 7 min Kühlung auf 4 °C

Tabelle 5: PCR-Protokolle der 5'-RACE zur Amplifizierung des 5'-Endes von *Ceg*Pgp-3 und *Ceg*Pgp-9. Die verwendete RNA wurde aus adulten *C. elongatus* extrahiert und in cDNA umgeschrieben.

^a terminale Elongation

4.10.6. PCR zur Amplifikation vollständiger Pgp-Sequenzen in C. elongatus

Ausgehend von sequenzierten mRNA-Abschnitten aus den vorher durchgeführten Reaktionen konnten Primer für die Amplifizierung der vollständigen mRNA von *Ceg*Pgp-3 und *Ceg*Pgp-9 erstellt werden. Die Bindungsstellen dieser Primer lagen am Anfang der 5'-UTR und am Ende der 3'-UTR des jeweiligen transkribierten Gens. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt. Sie wurden in einer PCR unter Verwendung von cDNA der Spezies *C. elongatus* angewendet. Die cDNA wurde mit Hilfe des Oligo(dT)₁₈-Primers (100 μ M, Thermo Fisher Scientific) generiert. Zur Amplifizierung von *Ceg*Pgp-3 wurde die PCR unter Verwendung der Accu PrimeTM Taq DNA Polymerase (Life Technologies) durchgeführt. Ein 25 μ l-Ansatz wurde dafür wie folgt vorbereitet:

19,75 µl	bidest H ₂ O (DEPC-behandelt, Carl Roth)
1,0 µM	Vorwärtsprimer (10 µM)
1,0 µM	Rückwärtsprimer (10 µM)
2,5 µl	10× Accu Prime [™] Puffer 2 (Life Technologies)
0,25 μl	Accu Prime [™] Taq DNA Polymerase (Life Technologies)
1,0 µl	cDNA

Für *Ceg*Pgp-9 führte die PCR mit der Phusion Hot Start Polymerase (Fisher Scientific) zur Amplifizierung der Volllängensequenz. Die Reaktion bestand aus folgenden Komponenten:

10 ul	HF Puffer (Fisher Scientific)
10 µl	Q-Solution (QIAGEN)
2,5 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
2,5 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
1,0 µl	10 mM dNTP-Mix (Thermo Fisher Scientific)
19,5 µlbidest H	H ₂ O (DEPC-behandelt, Carl Roth)
0,5 µl	Phusion Hot Start Polymerase (Fisher Scientific)
4,0 µl	cDNA

Nach Abschluss der jeweiligen Reaktion wurde ein Aliquot der Probe in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und durch UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert. Entsprach das Produkt in der Größe der erwarteten Volllängensequenz wurde eine weitere Elektrophorese durchgeführt. Die DNA wurde dabei nicht der UV-Beleuchtung ausgesetzt, sondern wie in 4.12. DNA-Aufreinigung und Alkoholfällung beschrieben aus dem Gel extrahiert und in *E. coli* kloniert. Die Plasmid-DNA wurde durch Sequenzierung überprüft. Die PCR-Protokolle sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Die angewendeten PCR-Protokolle mit dem Primerpaaren zur Amplifizierung der Volllängensequenzen von *Ceg*Pgp-3 und *Ceg*Pgp-9. RNA wurde aus adulten *C. elongatus* extrahiert und in cDNA umgeschrieben.

Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Protokoll
Ceg-Pgp3-full-up	Ceg-Pgp3-full-lo	94 °C - 2 min
		45 Zyklen
		94 °C - 15 s
		50 °C - 30 s
		68 °C - 5 min
		tE ^a
		68 °C - 7 min
		Kühlung auf 4 °C
	Ceg-Pgp9-full-lo	98 °C - 30 s
		40 Zyklen
Ceg-Pgp9-full-up		98 °C - 10 s
		68 °C - 30 s
		72 °C - 2 min, ,
		tE ^a
		72 °C - 10 min
		Kühlung auf 4 °C

^a terminale Elongation

4.10.7. PCR zur Amplifikation vollständiger Pgp-Sequenzen in C. insigne und C. goldi

Nach der Amplifizierung und Sequenzierung von Pgp-3- und -9-Teilsequenzen von *C. elongatus*, die über mehrere Teilreaktionen erfolgte, lagen Primersequenzen zur Volllängenamplifizierung der offenen Leseraster vor. Diese Primer wurden nun zur Identifizierung von homologen cDNAs in den Spezies *C. insigne* und *C. goldi* eingesetzt. Als Template-DNA wurde die entsprechende cDNA, hergestellt mit Hilfe des Oligo(dT)₁₈-Primer (100 μ M, Thermo Fisher Scientific), der jeweiligen Spezies in der RT-PCR verwendet. Ein 25 μ l PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

5,0 µl	HF-Puffer (Thermo Fisher Scientific)
5,0 µl	Q-Solution (Qiagen)
1,25 µl	spezifischer Vorwärtsprimer (10 μM)
1,25 µl	spezifischer Rückwärtsprimer (10 µM)
0,5 μl	dNTP Mix (je 10 mM, Thermo Fisher))
0,25 µl	Phusion Hot Start DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)
9,75 µl	nuklease-freies H ₂ O (Carl Roth)
2,0 µl	cDNA

Nach Abschluss der PCR wurden die Produkte über eine Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und anschließend durch UV-Licht sichtbar gemacht. Da für beide Spezies schwache Banden in der erwarteten Größe nachgewiesen wurden, wurde das PCR-Produkt als Template in einer weiteren PCR eingesetzt. Unter Verwendung der gleichen Polymerase wurde in diesem Fall ein 50 µl Ansatz hergestellt, um das Volumen des PCR-Produktes und damit die DNA-Ausbeute zu erhöhen. Die Reaktion wurde für beide Spezies mit dem gleichen Primerpaar durchgeführt.

Der Ansatz enthielt:

10,0 µl	HF-Puffer (Thermo Fisher Scientific)
10,0 µl	Q-Solution (QIAGEN)
2,5 µl	spezifischer Vorwärtsprimer (10 µM)
2,5 µl	spezifischer Rückwärtsprimer (10 µM)
1,0 µl	dNTP Mix (10mM, Thermo Fisher Scientific)
0,5 µl	Phusion DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)
21,5 µl	bidest H ₂ O (DEPC-behandelt, Carl Roth)
2,0 µl	PCR Produkt

Die Angaben zum PCR-Protokoll sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Protokoll
Ceg-Pgp3-full-up2	Ceg-Pgp3-full-lo1	98 °C - 2 min 35 Zyklen 98 °C - 15 s 68 °C - 30 s 72 °C - 2 min tE ^a 72 °C - 10 min Kühlung auf 4 °C

Tabelle 7: PCR-Protokolle der Volllängenamplifizierung von Pgp-3 in *C. insigne* und *C. goldi.* RNA wurde aus adulten *C. insigne* und *C. goldi* extrahiert und in cDNA umgeschrieben.

^a terminale Elongation

4.10.8. Mutagenese der Pgp-Sequenz für die Transformation

Für die heterologe Expression von Pgps in Hefezellen wurden diese mit Hilfe eines Plasmidvektors transformiert. Dieser Vektor enthält eine Promotersequenz, die in Anwesenheit von Galaktose die Transkription der eingefügten cDNA initiiert. Für eine effektive Translation der daraus resultierenden mRNA ist zusätzlich die sogenannte Kozak-Sequenz im Bereich des Startcodons von Bedeutung. Die Translationshäufigkeit wird bestimmt durch das Vorhandensein bestimmter Basen in unmittelbarer Umgebung des AUG Startcodons (Hamilton et al., 1987). Die Kozak-Sequenz für *S. cerevisiae* unterscheidet sich deutlich von der Säugetiersequenz (Hamilton et al., 1987) und besitzt folgende Basenfolge:

... a-A-a-A-a-A-U-G-U-C-u ...

Die Positionen eins, drei und fünf vor dem AUG beeinflussen in besonderem Maße die Proteinbiosynthese, genauso wie die Basen eins und zwei nach dem Startcodon. Sie sind daher in Großbuchstaben hervorgehoben. Die Variabilität der Basenpositionen, die in dieser Sequenz als Kleinbuchstaben dargestellt sind, ist ausgeprägter, während der Einfluss auf die Translationsrate geringer ist (Hamilton et al., 1987). Um die Sequenz im 5'-Bereich der Volllängensequenzen von Pgp-3 und Pgp-9 entsprechend den Kozak-Sequenzen zu verändern, wurde eine Mutagenese-PCR angewandt. Vorher wurde die Originalsequenz auf Übereinstimmungen mit der Kozak-Sequenz untersucht. Eine Veränderung der Nukleotidfolge hinter dem Startcodon hätte eine Änderung der Aminosäurezusammensetzung bedeuten können. Auf Grund der vorliegenden Sequenzen wurden ausschließlich im nicht translatierten 5'-Bereich der mRNA zusätzliche Adenin-Nukleotide einfügt. Die verwendeten Primer sind in
Tabelle 2 aufgeführt. Die Primer wiesen im Gegensatz zu den üblicherweise verwendeten eine Länge von über 30 bp auf. Dadurch sollte eine Bindung während der Anlagerungsphase gewährleistet werden, trotz der nicht vollständig komplementären ersten 6 Basen zwischen Template und Oligonukleotid. Als Rückwärtsprimer wurden je 2 Varianten pro Pgp verwendet. Ein Primer lagerte sich an das DNA-Template vor dem Stopcodon an, welches dann innerhalb dieser Reaktion nicht amplifiziert wurde. Nach der heterologen Expression dieser Sequenz, eingefügt in den Transformationsvektor, wurde die Translation des Inserts nicht durch das Stopcodon beendet. Dadurch wurde eine V5/6×His-Markierung, ein Teil der Vektorsequenz, erst an die transkribierte mRNA und anschließend die entsprechenden Aminosäuren an das Protein angefügt. Diese Markierung erlaubt eine gezielte Proteinaufreinigung und die Möglichkeit zur Antikörperbindung. Der zweite Rückwärtsprimer enthielt in seiner Sequenz das Stopcodon und führte dadurch zur Expression des nativen Pgps. Das Synthesegemisch enthielt folgende Komponenten:

41 µl	bidest. H2O (DEPC-behandelt, Carl Roth)
5,0 µl	10× Accu Prime™ Puffer 2
1,0 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
1,0 µl	Rückwärtsprimer (10 μM)
1,0 µl	Accu Prime [™] Taq DNA Polymerase (Life Technologies)
1,0 µl	Plasmid-DNA

Bei Verwendung der Phusion Hot Start Polymerase (Thermo Fisher Scientific) für die Amplifizierung von *Ceg*Pgp-9 bestand der Reaktionsansatz aus folgenden Substanzen:

33 µl	bidest H2O (DEPC-behandelt, Carl Roth)
10 µl	HF Puffer (im Kit enthalten)
2,5 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
2,5 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
1,0 µl	dNTP-Mix (10 mM)
0,5 µl	Phusion Hot Start Polymerase (2u/µl, Thermo Fisher Scientific)
1,0 µl	Plasmid-DNA

Die Tabelle 8 zeigt die eingesetzten Primer, sowie die PCR-Protokolle.

Tabelle 8: Verwendete Primer und die durchgeführten PCR-Protokolle zur Amplifizierung der mutagenisierten
Vollängensequenzen von CegPgp-3 und -9 für die Transformation der Hefezellen. Als DNA-Template wurde
Plasmid-DNA mit enthaltenen Vollängensequenzen verwendet.

Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Protokoll	
r Vac Can Der 2 Stort	pYes-Ceg-Pgp3-lo	98 °C - 30 s 35 Zyklen, 98 °C - 10 s 63 °C - 30 s 72 °C - 2 min tE ^a 72 °C 10 min Kühlung auf 4 °C	
pYes-Ceg-Pgp3-Start	pYes-Ceg-Pgp3-His	94 °C - 2 min 35 Zyklen 94 °C - 15 s 55 °C - 30 s 72 °C - 5 min tE ^a 72 °C - 10 min Kühlung auf 12 °C	
r Vac Can Dario Start	pYes-Ceg-Pgp9-lo	94 °C - 2 min 35 Zyklen 94 °C - 15 s 55 °C - 30 s	
p i cs-Ceg-r gp9-Staft	pYes-Ceg-Pgp9-His	68 °C - 4 min tE ^a 68 °C - 10 min Kühlung auf 4 °C	

^a terminale Elongation

Nach der PCR wurden die Produkte in einer Gelelektrophorese dargestellt. Die DNA wurde aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurde das High Pure PCR Product and Purification Kit (ROCHE) verwendet. Die Extraktion wurde gemäß den Herstellerangaben für die Isolation aus einem Agarosegel durchgeführt. Wurde in der PCR die Phusion Polymerase (Thermo Fisher Scientific) verwendet, mussten nach der Aufreinigung A-Überhänge an das PCR-Produkt angefügt werden.

4.10.9. Anfügen von A-Überhängen an ein blunt-end PCR-Produkt

Da nur Sequenzen mit überhängenden Adenin-Basen an ihrem 5'- und 3'-Ende in den Transformationsvektor (pYes2.1) ligiert werde können, musste den aufgereinigten DNA-Sequenzen, die durch die Phusion Polymerase amplifiziert worden waren, A-Überhänge in einem weiteren Reaktionsschritt angefügt werden. Dabei führt die Terminale TransferaseAktivität einer Taq DNA Polymerase zum Anbau einzelner Adeninbasen an die eingesetzte DNA. Dafür wurden 50 µl Ansätze auf Eis mit folgenden Komponenten vorbereitet:

5,0 µl	10× Taq DNA Polymerase Puffer
5,0 µl	dATP (10 mM)
0,5 µl	Taq DNA Polymerase (5u/µl, Thermo Fisher Scientific)
4,0 µl	$MgCl_2$ (25 nM,)
35,5 µl	aufgereinigte DNA

Der Ansatz wurde 20 min bei 72 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Die enthaltene DNA wurde unter Verwendung des DNA Purification and Concentration Kits (Zymo Research) nach Herstellerangaben konzentriert und in 10 µl bidest. H₂O (DEPCbehandelt, Carl Roth) gelöst. Das Produkt wurde direkt im Anschluss in den entsprechenden Vektor ligiert, da bei einer längeren Lagerung die Möglichkeit des Abbaus der A-Überhänge bestand.

4.10.10. PCR zum Nachweis der Pgp-Transkription in transformierten Hefezellen

Um die Transkription der eingefügten Pgp-Sequenz nachzuweisen, wurde nach der Transformation von Hefezellen eine RT-PCR durchgeführt. Die Pgp-Sequenz wurde als Teil eines Plasmids (pYes2.1 TOPO, Life Technologies) in die Zelle eingeschleust, ähnlich einer Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli*-Bakterien. Das Plasmid trägt gleichzeitig eine genetische Information, den sog. URA-Marker. Diese ermöglicht erfolgreich transformierten Hefezellen das Wachstum auf Uracil-defizienten Nährböden. In der PCR wurde ein Teilstück der mRNA-Sequenz von *Ceg*Pgp-3 und -9 amplifiziert. Die als Template-DNA verwendete cDNA wurde mit Hilfe des Oligo(dT)₁₈-Primers umgeschrieben. Das PCR-Produkt wurde über eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Transkription und damit ebenfalls die Transformation wurden als erfolgreich betrachtet, wenn das nachgewiesene Teilstück die richtige Größe aufwies. Zusätzlich wurde die Expression von Pgp auf Proteinebene überprüft. Für die Amplifizierung der Zielsequenz wurde die Accu PrimeTM Taq DNA Polymerase (Life Technologies) verwendet. Ein 25 µl Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

2,5 µl	10× Accu Prime Puffer™ 1
1,0 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
1,0 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
0,5 µl	Accu Prime [™] Taq DNA Polymerase (Life Technologies)
2,0 µl	cDNA

Die Reaktion wurde jeweils für die Plasmide mit und ohne V5/His-Tag von *Ceg*Pgp-3 und *Ceg*Pgp-9 durchgeführt. Erwartete Fragmentlängen konnten anhand der Volllängensequenzen

mit Hilfe des Clone Manager Programmes für eine korrekte Transkription berechnet werden. Diese waren für *Ceg*Pgp-3 mit Tag 476 bp lang und für das gleiche Pgp ohne V5/His-Tag ergab die Berechnung eine 441 bp lange Sequenz. Für *Ceg*Pgp-9 mit V5/His-Tag sollte eine erfolgreiche Transkription zur Amplifizierung einer 398 bp langen Sequenz führen, ohne Tag war diese Zielsequenz nur 384 bp lang. In Tabelle 9 sind wiederum die verwendeten Primerpaare, sowie die in der Gelelektrophorese bestimmte Größe der amplifizierten Sequenz und das PCR-Protokoll aufgeführt.

Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Erwartete Fragmentgrößen	Protokoll
Ceg-Pgp3-3R1	pYes-Ceg-Pgp-3-lo	441 bp	94 °C - 2 min
Ceg-Pgp3-3R1	pYes-Ceg-Pgp3-His	476 bp	94 °C - 15 s 55 °C - 30 s
Ceg-Pgp9-3R2	pYes-Ceg-Pgp9-lo	384 bp	72 °C - 1 min 35 Zyklen
Ceg-Pgp9-3R2	pYes-Ceg-Pgp9-His	398 bp	Kühlung auf 4 °C

Tabelle 9: PCR-Protokolle zu Überprüfung der Plasmidtranskription.

4.11. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von PCR-Produkten oder restringierten Plasmiden entsprechend ihrer Molekülgrößen erfolgte über eine Elektrophorese in einem Agarosegel. Für die Vorbereitung von flüssigen Agarosegelen verschiedener Konzentrationen wurde Agarose in der entsprechenden Menge abgewogen und in eine 500 ml Glasflasche gefüllt. Die Flasche wurde mit TAE-Puffer auf 500 ml aufgefüllt und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung der Agarose gekocht. Flüssige Gele mit Agarosekonzentrationen zwischen 0,8-2 % wurden im Wasserbad bei 65 °C aufbewahrt. Je nach Probenumfang wurde entweder 40 ml bzw. 100 ml Agarosegel abgemessen und mit 1 µl GRGreen Safe II (10000×in H₂O; LABGENE) zur Färbung der Nukleinsäure je 10 ml Gel versetzt und in einen vorbereiteten Flachschlitten (klein: B 6 cm, L 10 cm; groß: B 15 cm, L 10 cm; BIO-RAD) mit Taschenkamm eingefüllt. Das ausgehärtete Gel wurde nach Entfernung des Kamms in die Gelelektrophorese-Kammer (BIO-RAD) eingesetzt und die Kammer anschließend mit 1×TAE-Puffer aufgefüllt. Entsprechend der zu erwartenden Größe des PCR-Produktes wurden 125 ng des GeneRulerTM 100 bp bzw. 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) als Größenmarker in der Elektrophorese verwendet. Die Probenansätze wurden standardmäßig wie folgt vorbereitet:

5,0 µl	bidest. H_2O			
2,0 µl	6× Ladungspuffer			
5,0 µl	Probenlösung			

Sie wurden anschließend in die Gelvertiefungen pipettiert. Die Kammer wurde verschlossen und die Elektroden an ein Spannungsgerät (BIO-RAD, VWR, BIOMETRA) angeschlossen. Die angelegte Feldstärke lag zwischen 2,5 und 3,5 V/cm. Nach 1,5 bis 2 h war die Elektrophorese abgeschlossen und das Ergebnis konnte unter UV-Licht dokumentiert werden (Geldokumentation G:Box, SYNGENE).

4.12. DNA-Aufreinigung und Alkoholfällung

Für die Isolierung von PCR-Amplifikaten wurden diese zuerst über eine Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend durch einen UV-Licht-Konverter vor den schädigenden Einflüssen der UV-Strahlung geschützt. Dieser Konverter wandelt UV- zu Blaulicht um. Der an die kleine Furche der DNA Doppelhelix bindende Farbstoff (GR Green, LABGENE) wird dabei angeregt. Die Banden wurden mit Hilfe eines sterilen Skalpells manuell aus dem Gel herausgetrennt und in ein präpariertes 2 ml Mikrozentrifugationsgefäß, in das zuvor eine gekürzte 1000 µl-Filterspitze eingefügt wurde, überführt. Dabei befand sich das Gelstück auf dem Filter der vorbereiteten Pipettenspitze. Durch Zentrifugation der Probe bei Raumtemperatur für 10 min bei $4500 \times g$ wurde die im Gel enthaltene DNA mit weiteren flüssigen Bestandteilen des Gels herausgelöst. Das Volumen wurde bestimmt und 1 µl Glykogen, sowie 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat (pH 5,5) und ein Volumen tiefgekühltes Isopropanol dazu pipettiert. Durch mehrmaliges Wenden oder Vortexen des Probengefäßes wurden die Phasen vermischt. Danach wurde die Probe für mindestens 2 h bei -20 °C gelagert. Zur Pelletierung der DNA erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C mit 14000 × g für 45 min. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach der gründlichen Entfernung von Ethanol-Rückständen, trocknete das Pellet für 5 min bzw. bis keine Feuchtigkeit im Probengefäß zu erkennen war. Anschließend wurde die DNA in H_2O Überprüfung bidest. resuspendiert. Zur des **DNA-Gehaltes** sowie der Größenübereinstimmung des Fragmentes wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

4.13. Klonierung von DNA-Sequenzen in chemisch-kompetente E. coli

Für die Klonierung und anschließende Transformation von TOP®10 chemisch kompetenten *E. coli* wurde entweder das TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing oder das pYES2.1 TOPO® TA Expression Kit (Life Technologies) verwendet. Die Klonierungsreaktion bestand aus:

2,0 - 4,0 µl	aufgereinigtes PCR Produkt
1,0 µl	Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl2, Life Technologies)
1,0 µl	pCR®4-TOPO Vektor bzw. pYES2.1/V5-His-TOPO Vektor
· •	(Life Technologies)

Alternativ konnte eine "halber" Ligationsansatz hergestellt werden. Dieser enthielt je nur $0,5 \ \mu$ l der Salzlösung, des Vektorplasmids und 2 μ l der aufgereinigten DNA. Dieser reduzierte Ansatz konnte immer dann eingesetzt werden, wenn hoch konzentrierte DNA vorlag und bzw. nur ein kurzes Fragment (bis ca. 800 bp) ligiert werden sollte.

Der Ligationsansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend auf Eis beendet. Bei -80 °C gelagerte, chemisch-kompetente TOP10® *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 2 μ l der Klonierungsreaktion versetzt. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock der Zellen im Wasserbad bei 42 °C für 30 s erfolgte erneut eine kurze Lagerung auf Eis. Anschließend wurden die Zellen in 250 μ l SOC-Medium, das auf 37 °C erwärmt worden war, suspendiert und für 60 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die so präparierten Bakterien wurden auf vorbereiteten LB-Agarplatten mit einem Carbenicillin- oder Kanamycingehalt von 0,5 μ g/ml mit Hilfe eines hitzesterilisierten Drigalski-Spatels ausgestrichen. Das Wachstum erfolgreich transformierter Bakterien wurde nach 18 h Inkubationszeit bei 37 °C festgestellt. Einzelkolonien wurden steril in je 5 ml LB-Flüssigmedium überführt und für weitere 18 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Das Medium enthielt das entsprechende selektive Antibiotikum in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml. Plasmide wurden aus der Kultur durch eine Plasmid-Präparation gewonnen.

4.14. Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Abhängig vom Probenvolumen wurden die Plasmide mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits (MACHERY und NAGEL) bzw. des PureYieldTM Midi-Prep Kits (PROMEGA) extrahiert. Zur Pelletierung der Bakterien im Rahmen einer Präparation aus Anzuchtkulturen mit einem Volumen von max. 5 ml wurden die Flüssigkulturen bei 11000 × g für 1 min zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde für Kulturen mit einem Volumen von mind. 50 ml bei 2000 × g für 20 min durchgeführt. Anschließend wurden die Proben gemäß den Herstellerprotokollen weiter bearbeitet. Zur Elution der Plasmid-DNA wurde in allen Fällen bidest. H_2O an Stelle eines Elutionspuffers verwendet. Dieses wurde zur vollständigen Desorption der DNA auf 56 °C im Wasserbad erwärmt.

4.15. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Mit der Sequenzierung von DNA-Abschnitten wurde die GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland beauftragt. Die Reaktionen wurden entweder mit Standard- oder mit spezifischen Sequenzierungsprimern durchgeführt. Sequenzinformationen mit einer Länge von bis zu 1000 bp wurden online zur Verfügung gestellt.

4.16. Bioinformatische Methoden

4.16.1. Sequenzbearbeitung und -vergleich

Mit Hilfe der Programmes Clone Manager Professional 9 (Operations, 2004) und BioEdit (Hall, 1999) wurden die amplifizierten Sequenzen überprüft und bearbeitet. Dabei wurden die Nukleotidsequenzen auch auf durchgehende Leseraster untersucht. Ein Vergleich der sequenzierten Abschnitte und der vollständigen cDNA mit bereits veröffentlichten Nucleotidbzw. Proteinsequenzen wurde mit Hilfe des Blast-Algorithmus unter http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ (Altschul et al., 1997) durchgeführt. Die im Alignment verwendeten Proteine sind mit ihrer Zugangsnummer in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: ABC-Transporterproteine, die im Alignment (Blastp) und für die phylogenetische Berechnung verwendet wurden mit Angabe ihrer Zugangsnummer in der jeweiligen Datenbank.

Spezies	Protein	Zugangsnummer protein database	ID WormBase
Ascaris suum	MRP-1	ADY40620	
Ascaris suum	MRP-3a	ADY40644	
Ascaris suum	MRP-3b	ADY40573	
Brugia malayi	MRP-3	XP_001896434	
Brugia malayi	PGP-1	XP_001900095	
Brugia malayi	PGP-1	XP_001897744	
Caenorhabditis briggsae	PGP-1	XP_002634978	BP:CBP17817
Caenorhabditis briggsae	PGP-2		BP:CBP33028
Caenorhabditis briggsae	PGP-3	XP_002643979	BP:CBP26138
Caenorhabditis briggsae	PGP-4	XP_002643978	BP:CBP2677
Caenorhabditis briggsae	PGP-7	XP_002644094	BP:CBP25824
Caenorhabditis briggsae	PGP-8	XP_002644095	BP:CBP34515

G •	D ('	Zugangsnummer	ID
Spezies	Protein	protein database	WormBase
Caenorhabditis briggsae	PGP-9	XP_002638613	BP:CBP25885
Caenorhabditis briggsae	PGP-10	XP_003117716	BP:CBP25360
Caenorhabditis briggsae	PGP-11	XP_002629994	BP:CBP09377
Caenorhabditis briggsae	PGP-12	XP_002645224	BP:CBP35051
Caenorhabditis briggsae	PGP-13		BP:CBP27772
Caenorhabditis briggsae	PGP-14	XP_002645220	BP:CBP35857
Caenorhabditis briggsae	CBG12969	XP 002630530	BP:CBP17602
Caenorhabditis elegans	PGP-1	NP_502413	WP:CE11932
Caenorhabditis elegans	PGP-2	NP_491707	WP:CE41207
Caenorhabditis elegans	PGP-3	NP_509901	WP:CE03818
Caenorhabditis elegans	PGP-4		WP:CE03308
Caenorhabditis elegans	PGP-5	NP_001257116	WP:CE43003
Caenorhabditis elegans	PGP-6	NP_001041287	WP:CE40818
Caenorhabditis elegans	PGP-7	NP_509812	WP:CE36668
Caenorhabditis elegans	PGP-8	NP_509811	WP:CE31624
Caenorhabditis elegans	PGP-9	NP_507487	WP:CE15714
Caenorhabditis elegans	PGP-10	NP_509205	WP:CE40807
Caenorhabditis elegans	PGP-11	NP_495674	WP:CE34788
Caenorhabditis elegans	PGP-12	NP_510126	WP:CE03260
Caenorhabditis elegans	PGP-13	NP_510127	WP:CE40253
Caenorhabditis elegans	PGP-14	NP_510128	WP:CE0262
Cooperia oncophora	PGP-3	AGJ71177.1	
Cooperia oncophora	PGP-2	AGJ71178.1	
Drosophila melanogaster	MDR-50	AAA16186	
Drosophila melanogaster	MDR-49	AAA28679.1	
Drosophila melanogaster	MDR-65	AAA28680	
Haemonchus contortus	PGP-2	AAC38987	
Mus muculus	MDR-1B	NP_035205	
Mus muculus	PGP	AAA39514	
Mytilus californianus	ABCB-L	ABS83556	
Mytilus galloprovincialis	ABCB-L	CAX46411	
Onchocerca volvulus	PGP	AAD49436	
Onchocerca volvulus	PGP	AAX82635	
Onchocerca volvulus	PGP-L	AAD49563	
Parascaris equorum	PGP-16	JX308230	
Parascaris equorum	PGP-11	JX308231	
Pediculus hominis corporis	MRP-1	XP_002425149	
Pediculus hominis corporis	MRP-2	XP_002432260	
Pediculus hominis corporis	MRP-3	XP_002426586	
Pediculus hominis corporis	MRP-4	XP_002425021	
Pristionchus pacificus	PGP-1		PP:PP30697
Pristionchus pacificus	PGP-9		PP:PP30465
Schistosoma mansoni	PGP-1,-2,-3	XP_002574196	

Neben dem Sequenzvergleich auf Nukleotid- und Proteinebene, können auch Strukturelemente innerhalb der Aminosäuresequenz erkannt werden. NCBI bietet dafür eine

Datenbank von konservierten Domänen, bekannt als conserved domain database (CDD) (Marchler-Bauer et al., 2011). Durch ein Alignment mit Informationen dieser Datenbank können Hinweise einerseits auf die Zugehörigkeit zu bestimmten Proteinfamilien und andererseits auf die Funktion des korrespondierenden Proteins bzw. der Domäne abgeleitet werden. Dabei werden Proteinmotive identifiziert und ihre Lage innerhalb der Primärstruktur angegeben. Für ABC-Transporter sind dabei vor allem das ABC-Signaturmotiv, der Walker A/P-Loop, Walker B und der D-, H-, und Q-Loop von Bedeutung. Sie bilden gemeinsam die funktionelle Einheit zur Bindung von Nukleotiden. Ein weiteres charakteristisches Strukturelement ist die ABC-Transporter Transmembran Region (CDD: pfam00664), die in Pgps aus 6 a-Helices besteht. Diese Helices zeichnen sich durch eine Hydrophobizität aus, die mit Hilfe verschiedener online verfügbarer Programme in der Sequenz analysiert wird. Alle in dieser Arbeit angegeben Transmembranhelices wurden mit TopPred 1.01 (Claros und von Heijne, 1994; von Heijne, 1992) ermittelt. Dabei sind die berechneten Helices nur als ungefähre Angaben zu verwenden, da möglicherweise nicht alle Transmembranstrukturen durch das Programm identifiziert werden können. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse für alle innerhalb dieser Arbeit charakterisierten Pgps mit den entsprechenden Pgps von C. elegans verglichen. Basierend auf diesem Vergleich wurden die putativen Helices ausgewählt.

Um die Verwandtschaft und evolutionären Beziehungen der identifizierten Sequenzen mit ABC-Transportern anderer Nematoden zu vergleichen, wurde ein phylogenetischer Baum berechnet. Dafür wurden zunächst Sequenzen von den Spezies C. elegans (Cel), C. briggsae (Cbr), C. oncophora (Con), P. equorum (Peq), H. contortus (Hco), B. malayi (Bma), Ascaris. suum (Asu), O. volvulus (Ovo), Pristionchus pacificus (Ppa), C. elongatus (Ceg), C. goldi (Cgo) und C. insigne (Cin) mit Clustal X2 (Larkin et al., 2007) in einem Alignment verglichen. Um einen hypothetischen Ursprung des Phylograms ableiten zu können, wurde eine sogenannte "Outgroup" aus den Pgp-Sequenzen der Hausmaus Mus musculus (Mmu), der Fruchtfliege Drosophila melanogaster (Dme), der Kleiderlaus Pediculus hominis corporis (Phu), des Pärchenegels Schistosoma mansoni (Sma) und der Miesmuschel Mytilus galloprovincialis (Mga) in das Alignment miteinbezogen. Damit sind Transporterproteine aus den Klassen der Säugetiere und Muscheln sowie den Stämmen der Arthropoden und Plattwürmer in dieser Gruppe vertreten. Die Zugangsnummern der verwendeten Proteine sind in Tabelle 10 angegeben. Ein Alignment der Proteinsequenzen wurde mit ClustalX2 unter Verwendung der voreingestellten Standardparameter erzeugt. Basierend auf diesem Sequenzvergleich wurde das optimale Modell für Aminosäuresubstitutionen durch Prottest 3.0 (Abascal et al., 2005; Darriba et al., 2011) berechnet.

Die Anzahl an Kategorien für unterschiedliche Aminosäuresubstitutionsraten wurde dafür auf 8 heraufgesetzt (Voreinstellung 4). Anschließend wurde mit Hilfe des Programmes PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) die Verwandtschaft der ABC-Transporter analysiert. Dabei wurde die Maximum-likelihood Methode verwendet. der eine statistische Annahme von Wahrscheinlichkeiten für Aminosäuresubstitutionen zu Grunde liegt. Zunächst wurden ausgehend von 5 randomisierten Bäumen und einem mittels "neighbour-joining" berechneten Ausgangsbaum und anschließend der Stammbaum mit der höchsten Wahrscheinlichkeit ausgewählt. Die Werte, die für die Verwandtschaft der einzelnen Proteine angegeben werden, wurden mit einem approximate likelihood Test berechnet, der sowohl mit einer Bayesianischem Transformation als auch nach Shimodaira-Hasegawa modifiziert durchgeführt wurde. Die erste graphische Darstellung erfolgte mit MEGA5 (Tamura et al., 2011). Dabei konnte die Darstellung des Phylograms, d.h. die Anordnung der Proteine zueinander, geändert werden, um die Lesbarkeit zu optimieren, ohne jedoch die zugrundeliegende Topologie zu verändern. Gleichzeitig wurde die Wurzel des Baumes entsprechend der "Outgroup" gesetzt, die sich auf Grund ihrer geringeren Übereinstimmung mit den Nematoden-Pgps als eigene Gruppe deutlich von diesen Pgps absetzten. Weitere graphische Änderungen erfolgten dann mit Hilfe des Programms Coral Draw X5 (COREL CORPORATION, Kanada).

4.17. Heterologe Expression von Pgp und β-Galactosidase in S. cerevisiae

4.17.1. Kultivierung von S. cerevisiae-Stämmen

Die Anzucht nicht transformierter Hefen erfolgte auf YPD-Agarplatten. Dafür wurden in einer Sterilwerkbank Kolonien in je 5 ml YPD-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 30 °C und 250 rpm geschüttelt. Nach 24 h konnten die Kulturen mit Hilfe einer hitzesterilisierten Impföse auf den vorbereiteten YPD-Agarplatten ausgestrichen werden. Die Platten wurden bei 30 °C im Wärmeschrank inkubiert. Für transformierte Hefestämme wurde anstatt des YPD-Mediums und -Agars ein synthetisches Minimalmedium bzw. ein Minimalagar verwendet. Die Kultivierungsschritte blieben unverändert. Für transformierte Hefestämme, die aktuell im jeweiligen Versuch verwendet wurden, wurden Stock-Kulturen für die Dauer von 14 Tagen angelegt. Dafür wurden Einzelkolonien von Minimalagarplatten aufgenommen und in 5 ml synthetisches Minimalmedium überführt. Die Anzüchtung erfolgte entweder in Glaskulturröhrchen oder in Erlenmeyerkolben. Die Kulturen wurden für ca. 24 h bei 30 °C im Wärmeschrank geschüttelt (250 rpm). Anschließend konnten die Hefekulturen in 15 ml Plastikröhrchen überführt und die Zellen pelletiert werden. Dafür wurden die Proben bei 3000 \times g für 2 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde einmal in 5 ml bidest. H₂O gewaschen und erneut pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 5 ml Induktionsmedium ersetzt. Die Kulturen konnten für 14 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, wobei das Probengefäß nicht vollständig verschlossen wurde, um Gärprozesse zu vermeiden.

4.17.2. Transformation von kompetenten Hefenzellen

Für die Transformation von CegPgp-3 und Pgp-9 in S. cerevisiae-Stämme wurde das pYes2.1 TOPO®TA Expression Kit (Life Technologies) verwendet. Die Transformation wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurde eine Kolonie des S. cerevisiae-Stammes in 10 ml YPD-Medium überführt und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Die OD₆₀₀ wurde dann auf 0,4 in 50 ml frischem YPD-Medium eingestellt und die Kultur weitere 3-4 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Hefen durch Zentrifugation pelletiert $(2500 \times g, 2 \text{ min}, \text{Raumtemperatur})$ und in 40 ml 1×TE-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung der Zellen unter denselben Bedingungen und einer Resuspendierung in 2 ml 1×LiAc/0,5×TE-Puffer erfolgte eine 10minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Der Transformationsansatz enthielt 1 µg Expressionsvektor, 100 µg denaturierte und gescherte DNA aus Lachssperma (SIGMA ALDRICH) und 100 µl der Hefesuspension. Dem Ansatz wurden 700 µl 1×LiAc/40%PEG-3350/1×TE-Puffer hinzugefügt und gut vermischt. Die Inkubation erfolgte im Thermoblock bei 30 °C für 30 min. Nach der Zugabe von 88 µl DMSO wurden die Hefen einem 7minütigem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad unterzogen. In einer Mikrozentrifuge wurden die Hefen pelletiert und der Überstand verworfen. Nach der Resuspendierung in 1 ml 1×TE-Puffer wurden die Zellen erneut pelletiert und wiederum der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 50-100 µl 1×TE resuspendiert und die Hefen auf selektiven Agarplatten ohne Uracil mit Hilfe eines hitzesterilisierten Drigalski-Spatels ausgestrichen. Das Wachstum transformierter Hefen konnte nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30 °C beobachtet werden.

4.17.3. Induktion der Proteinexpression in transformierten Hefezellen

Der Vektor pYes2.1 TOPO (Life Technologies) enthält neben der Ligationsstelle zum direkten Einfügen eines PCR-Produktes und weiteren funktionellen genetischen Informationen eine *gal1*-Promotorsequenz. Der *gal1*-Promotor erlaubt die kontrollierte Induktion der

Transkription des Zielgens (Giniger et al., 1985; West et al., 1984). In Anwesenheit von Glukose, wie es im synthetischen Minimalmedium verwendet wird, wird die Transkription unterdrückt. Im Induktionsmedium wird daher Glukose durch eine Mischung aus Raffinose und Galaktose ersetzt. Während Raffinose keinen Einfluss auf den *gal1*-Promotor hat, aktiviert Galaktose diesen und führt so zur Transkription des im Plasmid integrierten Gens. Um entsprechend die heterologe Expression in transformierten Hefen zu initiieren, wurden 5 ml Induktionsmedium in Erlenmeyerkolben vorgelegt und mit 100 µl der Hefekulturen beimpft. Die Inkubation entsprach den Standardbedingungen. Die auf diese Weise vorbereiteten Hefen konnten nach ca. 24 h zur Erstellung von Hefewachstumskurven oder für Untersuchungen zur Proteinexpression verwendet werden.

4.17.4. Erstellung von Wachstumskurven

Das Protokoll für die Erstellung von Wachstumskurven basierte auf einer Publikation von Toussaint und Conconi (Toussaint und Conconi, 2006). Die Wachstumskurven dienten der funktionellen Überprüfung der identifizierten Pgps.

Die Stammlösungen aller Wirkstoffe wurden hergestellt, indem die Wirkstoffsubstanz auf einer Feinwaage abgewogen und anschließend in der entsprechenden Menge DMSO (Carl Roth) gelöst wurde. Für KCON (M_w = 531,43 g/M) wurden die Verdünnungsstufen durch serielles Verdünnen der Ausgangslösung (20 mg/ml) mit DMSO hergestellt, anschließend aliquotiert und bei – 20 °C gelagert. Die Stammlösung von TBZ (M_w = 201,24 g/M; 50 mg/ml) wurde vor dem Aliquotieren für 24 h bei Raumtemperatur gelagert. Die Verdünnungsstufen für den Versuch wurden direkt vor dem Gebrauch durch serielles Verdünnen der Stammlösung hergestellt.

Für IVM und EPM wurden 10 mM Stammlösungen (8,71 mg/ml für IVM bzw. 9,001 mg/ml für EPM bei -20 °C gelagert.

Die Kulturen der zu untersuchenden Hefestämme wurden angezüchtet indem 5 ml Induktionsmedium in einen 50 ml Erlenmeyerkolben pipettiert und anschließend mit 50 – 100 µl Hefestammlösung beimpft wurden. Nach kurzem und kräftigem Durchmischen der Probe erfolgte eine Inkubation für 24 h bei 30 °C und 250 rpm. Die Zellkonzentration der Kultur wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Der entsprechende Anteil der Kultur zum Erreichen einer Konzentration von 0.8×10^8 Zellen/ml wurde in ein 2 ml Probengefäß überführt und bei Raumtemperatur und 3000 × g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 1 ml Induktionsmedium resuspendiert. Um die gewünschte Konzentration von 0.8×10^7 Zellen/ml zu erhalten, wurden 100 µl der hergestellten Hefekultur mit 900 µl Induktionsmedium verdünnt.

Zunächst wurde die Suszeptibilität gegenüber KCON der Pgp-exprimierenden Hefestämme mit Hefezellen, die mit einem Kontrollplasmid ohne eingefügte Pgp-Sequenz transformiert worden waren, verglichen.

Um das Induktionsmedium für den Versuch mit der entsprechenden Menge an Wirkstoff zu versetzen, wurden Aliquote der Stammlösungen bei Raumtemperatur aufgetaut. Bei Verwendung der JRY8012 Hefestämme im Wachstumsassay wurden 1990 μl Induktionsmedium in 2 ml Mikrozentrifugationsgefäße vorgelegt und mit 10 µl der jeweiligen KCON-Stammlösung versetzt. Die DMSO-Konzentration entsprach in diesen Ansätzen 0,5 %. Für alle Hefen des AD1-7-Stammes wurde die DMSO Konzentration in allen Verdünnungsstufen und Kontrollen auf 1 % erhöht, indem nur 1980 µl Medium in Mikrozentrifugationsgefäße vorgelegt wurden und nach der Zugabe von 10 µl der KCON-Stammlösung zusätzlich 10 DMSO noch μl dazu pipettiert wurden. Die Konzentrationssteigerung des Lösungsmittels entsprach dem Versuchsaufbau zur Überprüfung der kompetitiven Hemmung, in dessen Verlauf dem Medium gleichzeitig zwei Wirkstoffe hinzugefügt wurden. Für KCON allein wurden insgesamt 6 Verdünnungsstufen untersucht.

Zum Vergleich der Wirksamkeit von TBZ (SIGMA ALDRICH) zwischen den Hefestämmen wurden 5 Konzentrationen untersucht. Um in den einzelnen Vertiefungen effektive Konzentrationen zu erreichen, wurden je 20 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe zu 1980 µl Induktionsmedium gegeben. Die Konzentration der Stammlösung ließ sich auf Grund der Löslichkeit des Wirkstoffes nicht erhöhen.

Für die Untersuchung der kompetitiven Hemmung des KCON-Transports durch IVM, MOX und EPM wurde KCON in einer Endkonzentration von 0,73 μ M (Stammlösung 3) bzw. 0,18 μ M mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen der ML kombiniert (Tabelle 11). Darüber hinaus wurde im selben Versuchsansatz die Wirkung der ML auf das Hefewachstum ohne KCON-Zusatz analysiert.

Für diese Versuchsansätze wurde jeweils nur ein Pgp-exprimierender Hefestamm pro Platte verwendet. Die Hefekultur wurde wie oben beschrieben vorbereitet. Um das Medium mit den Wirkstoffen zu versetzen, wurden ebenfalls 1980 μ l Induktionsmedium in 2 ml Mikrozentrifugationsgefäße vorgelegt. Zur Untersuchung der direkten Wirkung der ML auf das Hefewachstum wurden dem Medium je 10 μ l der fünf IVM-, EPM- oder MOX-Verdünnungsstufen hinzugefügt. Anschließend wurden diese Proben mit 10 μ l DMSO versetzt.

Für die kompetitive Hemmung wurden dem Medium sowohl 10 µl der KCON-Lösung (Konzentration der Stammlösung: 78 mg/l) zugesetzt als auch 10 µl der ML-Lösungen.

Als Negativkontrolle wurde in allen Versuchen Induktionsmedium mit 1 % DMSO versetzt und nicht mit der Hefekultur beimpft. Die OD-Werte der Negativkontrolle dienten als Nullwerte und wurden von den OD-Werten der anderen Proben subtrahiert. Gleichzeitig konnte auf diese Weise eine mögliche Kontamination des Mediums mit Hefezellen nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle, die ebenfalls für alle Versuche hergestellt wurde, diente Induktionsmedium mit 1 % DMSO, welches mit der entsprechenden Menge Hefezellen pro Vertiefung versehen wurde. Darüber hinaus wurde Medium mit 10 µl der KCON-Stammlösung und 10 µl DMSO versetzt. Diese Probe diente als weitere Positivkontrolle und wurde nur in Versuchsansätzen mit Verwendung von ML vorbereitet.

Standardmäßig wurden in allen Versuchsansätzen die Vertiefungen einer unbehandelten 96 Well-Platte mit 5 μ l der Hefekultur beimpft. Das entsprach einer Konzentration von 4 \times 10⁴ Zellen pro Vertiefung. Anschließend wurden 95 µl Induktionsmedium mit dem entsprechend konzentrierten Wirkstoff zu der Hefesuspension pipettiert. Es wurden 6 Vertiefungen für jede Konzentration beimpft. In vier Vertiefungen der letzten Reihe wurden je 100 µl der Negativkontrolle pipettiert. Alle weiteren Wells der ersten und letzten Reihe der Platte wurden mit 100 µl bidest. H₂O gefüllt. Nach der Vorbereitung der Platte konnte sie mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen und anschließend zur Vermeidung von Verdunstung während der Inkubationszeit mit Parafilm® M abgedichtet werden. Das entsprechende Programm des Multifunktions-Plattenlesegerätes (Synergy4, BIOTEK) wurde im Gen5-Programm gestartet. Sobald die Inkubationstemperatur von 30 °C im Messgerät erreicht war und die vorbereitete Platte in den Schlitten eingesetzt werden konnte, wurde die automatische Messung und Inkubation gestartet. Die Versuchsdauer lag bei 48 h. Dabei wurde die Platte zwischen den Messungen für 9,58 min in mittlerer Intensität geschüttelt und nach kurzer Wartezeit von 2 s die OD bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Während der Inkubation wurden im Abstand von 10 min 280 Messungen durchgeführt. Die Daten wurden exportiert und mit Hilfe von Excel formatiert. Angaben zur statistischen Auswertung finden sich in Kapitel 4.17.5 Statistische Auswertung der Wachstumsdaten.

Ketoconazol		Eprinomectin					
Sta	mmlsg.		Well	Sta	ammlsg.		Well
mg/l	μΜ	mg/l	μM	mg/l	μΜ	mg/l	μΜ
19,5	36,7	0,1	0,2	33,0	36,7	0,2	0,2
39,0	73,4	0,2	0,4	66,0	73,3	0,3	0,4
78,0	146,8	0,4	0,7	132,0	146,7	0,7	0,7
156,0	293,6	0,8	1,5	264,0	293,3	1,3	1,5
234,0	440,3	1,2	2,2	528,0	587,6	2,6	2,9
312,0	587,1	1,6	2,9	792,0	879,9	4,0	4,4
		•		1056,0	1173,2	5,3	5,9
Ivermectin			Moxidectin				
Sta	ummlsg.		Well	Sta	ammlsg.		Well
mg/l	μM	mg/l	μΜ	mg/l	μΜ	mg/l	μΜ
32,0	36,7	0,2	0,2	24,0	36,7	0,1	0,2
64,0	73,4	0,3	0,4	47,0	73,5	0,2	0,4
128,0	146,9	0,6	0,7	94,0	146,9	0,5	0,7
256,0	293,7	1,3	1,5	188,0	293,8	0,9	1,5
512,0	587,4	2,6	2,9	376,0	587,7	1,9	2,9
767,0	881,1	3,8	4,4	564,0	881,5	2,8	4,4
1023,0	1174,8	5,1	5,9	752,0	1175,3	3,8	5,9
Thiabendazol							
Sta	mmlsg.		Well				
g/1	mM	mg/l	mM				
3,1	15,5	31,3	0,2]			
6,3	31,1	62,5	0,3				

Tabelle 11: Verwendete Wirkstoffkonzentrationen für das Hefewachstumsassay

4.17.5. Statistische Auswertung der Wachstumsdaten

125,0

250,0

500,0

0,6

1,2

2,5

12,5

25,0

50,0

62,1

124,2

248,6

Die OD₆₀₀-Messdaten wurden mit Hilfe des R-Programmes statistisch bearbeitet und ausgewertet (R Development Core Team, 2011). Dabei wurde das grofit-Paket angewendet (Kahm et al., 2010). Mit Hilfe dieses Programmes wurde das Integral der Wachstumskurve (*area under the curve*/AUC) berechnet und die Hefestämme hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften unter Wirkstoffeinfluss verglichen. Für die weitere statistische Auswertung und die graphische Darstellung wurde das GraphPad Prism 5-Programm (Version 5.04 für Windows, GraphPad Software, California, USA, www.graphpad.com) verwendet. Zur Normalisierung der Daten wurden die AUC-Werte durch den Durchschnittswert ihrer

Kontrolle, die entweder ausschließlich 0,5 bzw. 1 % DMSO oder 0,18 bzw. 0,73 µM KCON enthielt, geteilt. Die abgeleiteten Werte beschreiben das relative Wachstum (rel. Wachstum). Für alle Assays, bei denen nur ein Wirkstoff (KCON, TBZ) verwendet wurde, wurde mit Hilfe einer logistischen Regression mit 4 Parametern die EC50 ermittelt und auf statistischsignifikante Abweichungen zwischen den Hefestämmen untersucht. Dabei wurde das Maximum der Regressionskurve aufgrund der durchgeführten Normalisierung auf 1 festgelegt. Die graphische Darstellung erfolgte als Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Für alle Versuche mit Verwendung von zwei Wirkstoffen (KCON und ML) wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse und ein Posthoc-Test (Bonferroni) durchgeführt, um statistische Unterschiede der Wirkstoffeffekte in Einzelanwendung, im Vergleich zu der Kombination aus ML und KCON zu untersuchen. Gleichzeitig konnten im Rahmen dieser Analyse potentielle Interaktionen zwischen den Faktoren ML mit und ohne Zusatz von KCON nachgewiesen werden. Entsprechend erfolgte der statistische Vergleich der ML-Effekte untereinander mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und Posthoc-Test (Bonferroni). Direkte Effekte der ML auf das Hefewachstum wurden durch eine einfaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Posthoc-Test nach Dunnett auf ihre Signifikanz untersucht. Die Ergebnisse wurden graphisch als Balkendiagramme dargestellt

4.18. Proteinisolation aus Hefezellen

Für die Isolation von Gesamtprotein aus Hefezellen wurden Einzelkolonien für 24 – 48 h in 5 ml Induktionsmedium unter Standardbedingungen angezüchtet. Anschließend erfolgte die Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation (5000 × g, 3 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Gewicht des Zellpellets wurde mit Hilfe einer Feinwaage bestimmt. Bis zu einem Gewicht von ≤ 100 mg wurden die Zellen in 500 µl YeastBusterTM Protein Extraction Reagent (MERCK KGaA) resuspendiert. Diesem Ansatz wurden 50 µl THP Lösung (MERCK KGaA) und 1 µl 500 mM PMSF hinzugefügt. Die Zelllyse erfolgte während einer 45minütigen Inkubation in einem Schüttler bei Raumtemperatur und 300 rpm. Um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen, wurde die Probe weitere 15 min bei 16000 × g und 4 °C zentrifugiert. Die Probe wurde bei -20 °C gelagert.

4.19. Bestimmung der Proteinmenge

Zur Quantifizierung von Proteinmengen in isolierten Gesamtproteinfraktionen wurde das CBXTM Protein Assay (G-BIOSCIENCES) durchgeführt, das auf dem Prinzip des Bradford-Tests basiert. Dabei bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G250 einen Komplex mit den basischen Seitenketten von Aminosäuren. Das führt zur unspezifischen Anfärbung von Proteinen. Der in Relation zur Proteinmenge entstehende Farbumschlag von rötlich-violett zu blau konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt werden. Das Assay wurde gemäß den Herstellerangaben für Proteinproben mit interferierenden Stoffen (Protokoll 2) durchgeführt. Dafür wurde ein 5-10 µl Aliquot der Proteinprobe entnommen und in eines neues 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäß überführt. Die Zugabe von 1 ml gekühlter CB-XTM-Lösung (G-BIOSCIENCES) zum Aliquot und die anschließende kräftige Durchmischung der Probe führte zur Ausfällung der enthaltenden Proteine. Diese Proteinfraktion konnte in einem Zentrifugationsschritt bei 16000 × g für 5 min pelletiert werden. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet nach der Zugabe von je 50 µl CB-X[™] Solubilization Buffer-1 und -2 (G-BIOSCIENCES) resuspendiert. Die vollständige Resuspendierung erforderte mitunter eine längere Durchmischung mit Hilfe eines Vortex-Gerätes. Nach der Zugabe von 1 ml CB-X[™] Assay Dye (G-BIOSCIENCES), der vor der Verwendung $2-3 \times \text{vorsichtig}$ geschwenkt wurde, folgte eine 5minütige Inkubation. Die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm wurde in einem Photometer durchgeführt. Der Proteingehalt des Aliquot konnte durch einen Vergleich der Messergebnisse mit einer dem Reaktionskit beigefügten, Lot-spezifischen Tabelle bestimmt werden.

4.20. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

4.20.1. Vorbereitung der Proben

Nach der Bestimmung des Proteingehaltes in den isolierten Gesamtproteinfraktionen wurden die Proben für eine SDS-PAGE vorbereitet. Dafür wurde die erforderliche Proteinmenge der ursprünglichen Probe entnommen und mit 5 μ l Roti-Load 4× (Carl Roth) versetzt. Das Probenvolumen wurde auf 20 μ l mit bidest. H₂O aufgefüllt und anschließend in einem Schüttler bei 105 °C für 5 min erhitzt. Danach wurden die Proben entweder bei -20 °C gelagert oder direkt im SDS-PAGE verwendet.

4.20.2. SDS-Page

Die in der Proteinfraktion enthaltenen Proteine wurden entsprechend ihrer Molekülmasse elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurde die erstmals von Laemmli (1970) beschriebene Methode der vertikalen. diskontinuierlichen Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Für die Durchführung wurde die Mini-Protean SDS-PAGE Apparatur (BIO-RAD) verwendet. Zur Herstellung der verwendeten Gele wurde eine radikalische Polymerisation von 30% igem Acrylamid/Bisacrylamid (Stocklösung) im Mischungsverhältnis 37,5 : 1 (Carl Roth) zu Polyacrylamid durch APS initiiert und durch TEMED katalysiert. Trenngele wurden je nach Proteingröße in variierenden Konzentrationen von Acrylamid zwischen 7,5 und 12,5 % hergestellt, wobei die Sammelgele stets eine 4,5%ige Acrylamidkonzentration aufwiesen. Die Gele hatten eine Größe von 8×10 cm. Das Probenvolumen betrug 20 µl 1× Roti-Load (Carl Roth) mit einem Proteingehalt von 10-40 µg und wurde in die Taschen pipettiert. Als Größenmarker diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Zur Konzentrierung der Proben wurde zu Beginn der Elektrophorese eine Spannung von 50 V angelegt bis sich die Proteine als schmale Linie am Übergang vom Sammel- zum Trenngel darstellten. Dann wurde die Spannung auf 80 V erhöht. Nach Abschluss der Elektrophorese konnte das Gel nach Herstellerangaben für eine Coomassie-Färbung oder für einen Western Blot weiterverwendet werden.

4.20.3. Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel vorsichtig von der Glasplatte entfernt und $3 \times$ für 15 min in ca. 40 ml bidest. H₂O auf einem Schwenktisch gewaschen. Anschließend wurde die Probe mit der Färbelösung (Thermo Fisher Scientific) überschichtet und für eine Stunde auf dem Schwenktisch inkubiert. Zur Verstärkung des Kontrastes erfolgte, gemäß den Herstellerangaben, ein weiterer einstündiger Inkubationsschritt mit bidest. H₂O. Das Ergebnis wurde mit Hilfe des GeneSnap-Programmes in einer Photokammer (G:Box, SYNGENE) digital dokumentiert.

4.21. Proteintransfer auf eine Membran und Immundetektion (Western Blot)

4.21.1. Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran

Nach Abschluss der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran zur Durchführung eines Western Blots übertragen. Dafür wurde eine Semi-dry Blotting Apparatur (Biostep) verwendet. Das Gel wurde dafür aus der Gelkammer herausgenommen, von der Glasplatte gelöst und. in Transferpuffer gewaschen. Die obere Sammelgelschicht konnte dabei vom unteren Trenngel vorsichtig abgelöst werden, da nur das Trenngel weiterverwendet wurde. Für jedes Gel wurden 6 Filterpapierzuschnitte sowie ein Membranzuschnitt aus Nitrocellulose (WHATMAN) vorbereitet und ebenfalls in Transferpuffer angefeuchtet. Die Filterpapiere, das Gel und die Nitrocellulosemembran wurden nach Herstellerangaben in der Blotting-Apparatur gestapelt und an ein Spannungsgerät angeschlossen. Bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² wurden die Proteine auf die Membran übertragen. Die Dauer des Blottens richtete sich nach der Größe der gesuchten Proteine (≈ 140 kD) und lag bei 2 h.

4.21.2. Immundetektion

Im Anschluss an den Proteintransfer wurde die Nitrocellusosemembran (WHATMAN) zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen in 1× Roti-Block-Lösung (Carl Roth) gewaschen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 2-4 h. Ausgehend von einer 10× Roti-Block-Stammlösung wurde die benötigte Verdünnung mit TST-Puffer hergestellt. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 bzw. 1:1000 in 1× Roti-Block-Lösung verwendet und die Membran damit überschichtet. Nach einer Inkubation von 2-6 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 10 °C auf dem Schwenktisch wurde die Membran dreimal für je 10 min in 1× TST-Puffer gewaschen. Auf diese Weise sollten unspezifisch gebundene Antikörper von der Membranoberfläche entfernt werden. Die Verdünnung des sekundären Antikörpers lag bei 1:5000. Die Inkubation dauerte zwischen 1 und 2 h und wurde ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde die Membran zweimal für jeweils 10 min in $1 \times TST$ -Puffer und einmal in $1 \times TS$ -Puffer gewaschen. Dann wurde die Chemilumineszenz-Reaktion angesetzt durch das Mischen von 1 ml der Lösung 1 mit 1 ml der Lösung 2. Beide Lösungen waren Bestandteil des SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate-Kits (Thermo Fisher Scientific). Die Membran wurde für 5 min in der Lösung inkubiert, anschließend kurz in TS-Puffer getaucht und zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Die digitale Dokumentation der Chemilumineszenz erfolgte in einer Photokammer (INTAS). Dabei wurden mit einer Belichtungszeit von 1 min 20 aufeinanderfolgende Aufnahmen der behandelten Membran gemacht. Die Aufnahmen konnten dann mit Hilfe des Programmes Intas professional (INTAS) übereinandergelegt werden, um Signale zu addieren. Die Bilderserie wurde gespeichert und konnte bei Bedarf ausgedruckt und exportiert werden.

4.22. Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Proteinexpression in S. cerevisiae

Diese Analysemethode beruht auf der Identifizierung von Zellen anhand der von ihnen verursachten Lichtstreuung beim Passieren eines gebündelten Laserstrahls. Beim Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) wird dabei die Photonenemission von Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt und quantifiziert. Der Flüssigkeitsstrom mit den zu untersuchenden Zellen wird durch eine feine Kapillare geleitet. Auf diese Weise werden die Zellen in der Flüssigkeitssäule derart angeordnet, dass im Idealfall ein Flüssigkeitsstrom aus hintereinanderliegenden Einzelzellen entsteht. Diese passieren anschließend einen gebündelten Laserstrahl mit einer für den jeweiligen Versuch festgelegten Wellenlänge. Sogenannte Photomultiplier nehmen dabei die Lichtstreuung sowie Fluoreszenzsignale auf, die durch die Zellen ausgelöst werden. Bei der Analyse werden zwei Parameter unterschieden: Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter), das durch die Zellgröße beeinflusst wird, und das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter), das Aussagen über die Granulierung und Komplexität der Zelle ermöglicht. Fluoreszenzsignale, die häufig auf einer Reaktion zwischen einem Antigen und einem fluoreszierenden Antikörper beruhen, werden gemessen und lassen durch ihre Intensität Rückschlüsse auf spezifische Eigenschaften zu, wie z.B. der Expression bestimmter Proteine oder auch der Viabilität der Zelle. Dafür werden die Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Mit Hilfe dieser Methode sollte neben der Untersuchung im Western Blot die heterologe Expression von Pgp in S. cerevisiae nachgewiesen werden. Die Versuchsreihe wurde am Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) in Nouzilly, Frankreich in Kooperation mit Dr. Dominique Kerboeuf durchgeführt.

Zunächst wurden die transformierten Hefestämme in Flüssigkulturen angezüchtet und anschließend die Proteinexpression durch die Verwendung von Galaktose im Medium induziert. Die Hefen wurden durch Zentrifugation bei $3000 \times g$ für 2 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde zweimal in 3 ml PBS gewaschen, pelletiert und wieder in 3 ml PBS resuspendiert. Von dieser Zelllösung wurden je 10 µl in drei 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäße überführt. Nach der Zugabe von je 1 ml Blockierungspuffer wurden die Proben für 10 min zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Die

Zellen wurden vor der Zugabe des spezifischen Antikörpers erneut gewaschen. Dafür wurden sie zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 3 ml PBS resuspendiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden einer Probe 35 µl eines Pgp-spezifischen Antikörpers (UIC2-PE, DRAKO) hinzugefügt. Dieser Antikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff R-Phycoerythrin gekoppelt. Bei einer erfolgreichen Bindung kann die maximale Photonenemission bei einer Wellenlänge von 575 nm gemessen werden. Die weiteren Proben wurden als Kontrollen zum Ausschluss von Kontamination und zur Überprüfung der Spezifizität verwendet. Dafür wurde ein Pellet in 35 µl PBS resuspendiert, während die dritte Probe mit 35 µl eines isotypischen Antikörpers (mouse IgG 2aλ, Klon HOPC-1, BECKMAN COULTER) inkubiert wurde. Die Inkubationsdauer betrug 2 h und erfolgte lichtgeschützt. Die Proben wurden zweimal in 3 ml PBS gewaschen und pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS gelöst und musste vor der Anwendung im FACS durch Filtration von Zellagglomeraten befreit werden. Dafür wurden Nylonfilter mit einer Maschenweite von 30 µm verwendet. Das Ansaugen der Probe erfolgte automatisch. Die Flüssigkeit wurde durch eine Kapillare mit einem Durchmesser von 200 µm geleitet. Die feine Flüssigkeitssäule aus einzelnen Zellen passierte anschließend einen gebündelten Argon-Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm. Die Lichtstreuung wurde im SSC und FFC gemessen während die Fluoreszenzemission durch einen 575/26 nm Bandfilter bestimmt und quantifiziert wurde. Alle Messergebnisse wurden mit Hilfe der LYSIS II Software (Beckton Dickinson) ausgewertet und graphisch aufgearbeitet.

5. Ergebnisse

5.1. Molekulare Identifizierung von P-Glykoproteinen in kleinen Strongyliden

5.1.1. Cylicocyclus elongatus-Pgp-3

In vorherigen Arbeiten konnte bereits das Vorkommen, sowie eine Diversität von Pgps in kleinen Strongyliden nachgewiesen werden (Drogemüller et al., 2004c). Bekannte Teilsequenzen (NBD 2.1 und 2.2) von Pgp-3 der Spezies *C. elongatus* und die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Abschnitte sind in Abbildung 1 dargestellt.

5'UTR (66 bp)	ORF CegPgp-3	3'UTR (69 bp)
deg. Primer A	-Produkt (267 bp)	NBD 2.1 (268 bp)
deg. Primer E	B-Produkt (288 bp)	NBD 2.2 (268 bp)
5'RACE-Produkt (647 bp)		3'RACE-Produkt (466 bp)
Volllängen-RT-PCR Produl	at (3924 bp)	>

Abbildung 1: Schematische Darstellung der bekannten und in dieser Arbeit amplifizierten PCR-Produkte und ihre Lage in der vollständigen mRNA-Sequenz von CegPgp-3.

Bereits publizierte Sequenzen waren Bestandteil der NDB 2. Ihre Zugangsnummer und Nukleotidsequenz sind im Anhang aufgeführt. Ausgehend von diesen Sequenzen konnten Primer für die schrittweise Amplifizierung einer vollständigen mRNA des gesuchten Proteins konstruiert werden. Die 3'- und 5'-Enden der transkribierten Gensequenz wurden mit Hilfe einer RACE-PCR identifiziert. Im Rahmen der 3'-RACE konnte ein 466 bp langes Fragment amplifiziert werden. Anschließend folgte eine nested RT-PCR unter Verwendung von degenerierten Primern. Zwei Amplifikate von 267 bzw. 288 bp Länge wurden sequenziert. Innerhalb dieser Sequenzen lagen die Bindungsstellen der Primer, die in der 5'-RACE verwendet wurden. Die anschließend durchgeführte RT-PCR ergab eine Sequenz mit einer Länge von 647 bp. Anhand der nachgewiesenen Fragmente konnten Volllängenprimer im Bereich der 5'- und 3'-UTR der Pgp-Sequenz erstellt und in einer RT-PCR angewendet werden. Die durchgeführte PCR führte zur erfolgreichen Amplifizierung der vollständigen mRNA. Auf Nukleotidebene weist diese vom Start- bis zum Stopcodon eine Länge von 3924 bp auf und umfasst eine 5'-UTR aus 66 bp sowie eine 3'-UTR aus 69 bp. Die verwendeten Primer und ihre isolierten Genabschnitte sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Produkt
Ceg-Pgp3-3R1	Oligo(dT) ₁₈ -Ankerprimer	Template für nested PCR
Ceg-Pgp3-3R2	Oligo(dT) ₁₈ -Ankerprimer	466 bp
Ceg-Pgp-3vorF1	Ceg-Pgp3-vorR1	288 bp
Ceg-Pgp-3vorF1a	Ceg-Pgp3-vorR1	267 bp
Ceg-Pgp3-5R1	-	cDNA Synthese
Ceg-Pgp3-5R2	Oligo(dT) ₁₈ -Ankerprimer	Template für nested PCR
Ceg-Pgp3-5R3	PCR Ankerprimer	Template für nested PCR
Ceg-Pgp3-5R4	PCR Ankerprimer	647bp
Ceg-Pgp3-full-up2	Ceg-Pgp3-full-lo1	3924 bp

Tabelle 12: Primerpaare, die für die Amplifizierung von *Ceg*Pgp-3 verwendet wurden. Für sequenzierte PCR-Produkte wird eine Länge in Basenpaaren angeben. Alle weiteren Produkte wurden im Rahmen der RACE-PCR weiterverwendet.

Es konnte ein durchgehendes Leseraster (*open reading frame*, ORF) über 3790 bp ermittelt werden. Der ORF kodiert für eine putative Proteinsequenz bestehend aus 1262 Aminosäuren. Ausgehend von dieser Proteinsequenz konnte ein Molekulargewicht von 138,92 kDa berechnet werden (Gateway, ScienceLab.com. "Protein Molecular Weight Calculator." *Science Gateway*). Alle Teilsequenzen sowie die Volllängensequenz sind im Anhang aufgeführt.

Vollständige mRNA-Sequenzen für *Cgo*Pgp-3 und *Cin*Pgp-3 konnten mit den Primern zur Identifizierung von *Ceg*Pgp-3 in einer PCR amplifiziert werden. Die mRNA von *Cgo*Pgp-3 hat eine Länge von 3926 bp, *Cin*Pgp-3 umfasst 3927 bp. Für beide Sequenzen wurde ein ORF über 3788 bp nachgewiesen. Dabei befindet sich in *Cgo*Pgp-3 das Startcodon an Position 67 der Nukleotidsequenz und in *Cin*Pgp-3 an Position 68. Daraus ergibt sich eine 5'-UTR von 66 bp für *Cgo*Pgp-3 und von 67 bp für *Cin*Pgp-3. Die 3'-UTR hat in beiden Spezies eine Länge von 71 bp. Der jeweilige ORF kodiert für ein Protein mit einer Länge von 1262 AS. Mit Hilfe eines Online Tools konnten die Molekulargewichte der korrespondierenden Proteine berechnet werden (Gateway, ScienceLab.com. "Protein Molecular Weight Calculator." *Science Gateway*). Für *Cgo*PGP-3 wurde eine Größe von 139,3 kDa ermittelt. Für *Cin*PGP-3 ergab sich eine Molekülmasse von 139,27 kDa.

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Blastp-Algorithmus auf Übereinstimmungen mit bekannten Proteinsequenzen weiterer Nematoden untersucht. Für das hypothetische PGP-3 Protein von *C. elongatus* ergab sich die höchste speziesübergreifende Übereinstimmung mit *C. insigne* PGP-3. Die Ergebnisse des Alignments sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Sequenz	Accessionnr.	max. Identität	E-Wert
Cylicocyclus insigne PGP-3	-	95%	0.0
Cylicostephanus goldi PGP-3	-	92%	0.0
Cooperia oncophora PGP-3	CAA91495.1	71%	0.0
Pristionchus pacificus PGP-1	PP30687	67%	0.0
Caenorhabditis elegans PGP-3	NM_077500	62%	0.0
Caenorhabditis briggsae PGP-3	BP:CBP26138	61%	0.0

Tabelle 13: Ergebnis des Blastp-Alignments von CegPGP-3

Für *Ceg*PGP-3, *Cin*PGP-3 und *Cgo*PGP-3 konnten Motive der ABC Transporter Superfamilie festgestellt werden. Dazu gehören Transmembrandomänen, A-, D-, H-, und Q-Loop-Motive sowie die Walker A/P- und B-Loop und das ABC-Signaturmotiv, das auch als Walker C bezeichnet wird. Die Positionen dieser Domänen innerhalb der Primärstruktur der Pgps sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Konservierte Proteinmotive der PGP-3. Die Bereiche der nukleotidbindenden Domänen wurden durch den CD Blast gegen Sequenzen in der CD-Datenbank (*conserved domain database*, CDD) ermittelt. Transmembrandomänen, die sich durch eine spezifische Hydrophobizität auszeichnen, konnten mit Hilfe eines Online-Tools TopPred 1.01 bestimmt werden.

Protein	NBD-1 [AS]	TMD-1 [AS]	NBD-2 [AS]	TMD-2 [AS]
CegPGP-3 CinPGP-3	Walker A: 403-410 Walker B: 530-535 Walker C: 510-520 D-Loop: 538-541 H-Loop: 562-568	35-55 88-108 166-186	Walker A: 1058-1065 Walker B: 1182-1187 Walker C: 1162-1171	712-732 745-765 828-850 ^a
CgoPGP-3	Walker A: 403-410 Walker B: 530-535 Walker C: 510-519 D-Loop: 538-541 H-Loop: 562-568	190-210 278-298 326-346	D-Loop: 1190-1193 H-Loop: 1214-1220	855-874* 933-953 965-985

Entsprechend des dimerischen Aufbaus der Pgps konnten alle Motive zweimal nachgewiesen werden. Beide Proteinhälften enthalten dabei mehrere Transmembransegmente, zusammengefasst zu je einer Transmembrandomäne. Diese bestehen aus je 6 α -Helices. Darüber hinaus wurden zwei NBD mit hochkonservierten Bereichen identifiziert.

Die Abbildung 2 gibt eine schematische Übersicht über die Lage dieser funktionellen Bereiche auf Nukleotidebene in allen identifizierten Pgps.



Abbildung 2: Darstellung der Proteinmotive innerhalb der mRNA der identifizierten Pgps. TMD=Transmembrandomäne, A/P=Walker A/P-Loop, Q=Q-Loop, C=Walker C/ABC Signaturmotiv,B=Walker B, D=D-Loop, H=H-Loop.

5.1.2. Cylicocyclus elongatus Pgp-9

Zu Beginn der Arbeiten waren zwei DNA-Abschnitte für Cegpgp-9 bekannt (NBD 2.1 und 2.2). Die erste Sequenz hatte eine Länge von 549 bp und lag im Bereich der NBD-2. Die zweite Sequenz war mit 404 bp etwas kürzer und lag insgesamt näher am 3'-Ende der mRNA von CegPgp-9 befand sich aber ebenfalls in der NBD-2 (Abb 3). Die Identifizierung des Pgp-9 der Spezies C. elongatus erfolgte durch Teilamplifikationen im Rahmen einer 3'/5'-RACE und einer nested RT-PCR mit Verwendung von degenerierten Primern. Eine Übersicht über die verwendeten Primer findet sich in Tabelle 15. Aus den Nukleotidsequenzen, die sowohl das 5'-, als auch das 3'-Ende der gesamten mRNA umschreiben, wurden im vorliegenden Fall Primer für die vollständige Amplifizierung erstellt und in einer nested RT-PCR angewendet. Die 3'-RACE ergab eine Sequenz von 431 bp, die das Stopcodon der transkribierten RNA enthält. Das Produkt der RT-PCR mit degenerierten Primern wies eine Länge von mehr als 1045 bp auf. Es wurde nicht das gesamte Fragment sequenziert, da die nötigen Informationen zur Herstellung der Primer für die 5'-RACE bereits in einer ersten Teilsequenz vorhanden waren. Die anschließend durchgeführte 5'-RACE ergab ein 803 bp langes Amplifikat, das sowohl die 5'-UTR, als auch das Startcodon der mRNA enthielt. Alle Teilstücke sind im Verhältnis zur vollständigen Sequenz in Abbildung 3 dargestellt.

Tabelle 15: Primerpaare, die für die Amplifizierung von CegPgp-9 verwendet wurden. Für sequenzierte PCR-
Produkte wird eine Länge in Basenpaaren angeben. Alle weiteren Produkte wurden im Rahmen der RACE-PCR
weiterverwendet.

Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer		Produkt	
Ceg-Pgp9-3R1	Oligo(dT) ₁₈ -Ankerprimer	Template für nested PCR	
Ceg-Pgp9-3R2	Oligo(dT) ₁₈ -Ankerprimer	431 bp	
Ceg-Pgp9-vorF2	Ceg-Pgp9-5R3	> 1045 bp (nicht vollständig sequenziert)	
Ceg-Pgp9-5R1		cDNA Synthese	
Ceg-Pgp9-5R2	Oligo(dT) ₁₈ -Ankerprimer	803 bp	
Ceg-Pgp9-full-up	Ceg-Pgp9-full-lo	3939 bp	

Die Länge der gesuchten mRNA-Sequenz umfasst 3929 bp. Sie enthält eine 15 bp lange 5'-UTR, einen offenen Leserahmen (ORF) über 3821 bp, sowie eine 3'-UTR mit einer Länge von 102 Basenpaaren. Eine *in silico* durchgeführte Translation des ORF ergab ein Protein bestehend aus 1273 Aminosäuren. Ein Molekulargewicht dieses Proteins von 140,21 kDa wurde mit Hilfe eines Online Tools berechnet (Gateway, ScienceLab.com. "Protein Molecular Weight Calculator." *Science Gateway*). Die Nucleotid- und Aminosäuresequenz von *Ceg*Pgp-9 sind im Anhang aufgeführt.

5'UTR (15 bp)	ORF Ceg	°gp-9	3'UTR (102 bp)
	deg. Primer-Produkt (1045 bp)	NBD 2.1 (511 bp)	
		l F	NBD 2.2 (389 bp)
5'RACE-Produ	kt (803 bp) ➡	3'RAC	E-Produkt (431 bp)
Volllängen-RT-	PCR Produkt (3929 bp)		

Abbildung 3: Schematische Darstellung der bekannten und in dieser Arbeit amplifizierten PCR-Produkte und ihre Lage in der vollständigen mRNA-Sequenz von *Ceg*Pgp-9.

Ein Alignment mit dem Blastp-Algorithmus ergab die höchste Übereinstimmung mit *C. briggsae* PGP-9. Die Aminosäuresequenzen stimmten zu 68 % überein. Mit einem E-Wert von 0,0 ist eine zufällige Übereinstimmung der Sequenzen höchst unwahrscheinlich.

Sequenz	Accessionnr.	max. Identität	E-Wert
Caenorhabditis briggsae PGP-9	CBG05664	68%	0.0
Caenorhabditis elegans PGP-9	NM_075086.3	67%	0.0
Pristionchus pacificus PGP-9	PP30465	60%	0.0
Caenorhabditis briggsae PGP-1	CBP17817	54%	0.0
Caenorhabditis elegans PGP-1	WP:CE11932	54%	0.0
Pristionchus pacificus PGP-1	PP30687	51%	0.0

Tabelle 16: Ergebnis des Blastp-Alignments von CegPGP-9.

Auch *Ceg*Pgp-9 wurde mit Hilfe der Datenbank CDD (Marchler-Bauer et al., 2013) auf konservierte Proteinmotive untersucht. Wie bereits für Pgp-3 konnte für die vorliegende mRNA das ABC Signaturmotiv oder Walker C, das Merkmal der ABC-Transporter Superfamilie, identifiziert werden. Neben diesem Motiv wurden ebenfalls der Walker A oder P-Loop, Walker B und der D-, H- und Q-Loop nachgewiesen. Alle Motive kamen in der Sequenz zweimal vor und konnten zwei NBDs zugeordnet werden. Die Berechnung der TMDs erfolgte mit Hilfe eines Online-Tools TMpred (Hofmann, 1993) und ergab insgesamt 12 mögliche Transmembransegmente. Beide Domänen setzten sich aus 6 α-Helices zusammen wobei die erste Helix von extrazellulär nach intrazellulär orientiert ist. Alle Domänen und Motive sind mit ihrer genauen Position innerhalb der Proteinsequenz in Tabelle 17 aufgeführt.

Der Versuch den gleichen Pgp-Isotyp in den Spezies *C. goldi* und *C. insigne* nachzuweisen, blieb ohne Ergebnis. Bei Verwendung der Volllängenprimer, die für *C. elongatus*-Pgp-9 eingesetzt wurden, konnten keine Sequenzen amplifiziert werden.

Protein	NBD-1 [As]	NBD-2 [As]	TMD-1 [As]	TMD-2 [As]
CegPGP-9	Walker A: 413-420 Walker B: 537-542 Walker C: 517-526 D-Loop: 545-548 H-Loop: 569-575	Walker A: 1064-1071 Walker B: 1190-1195 Walker C: 1170-1179 D-Loop: 1198-1201 H-Loop: 1222-1228	47-71 104-126 178-194 202-225 317-335 337-355	705-727 749-767 831-850 848-867 931-952 972-991

Tabelle 17: Konservierte Proteinmotive von *Ceg*PGP-9. Die Bereiche der NBDs wurden durch die CDD berechnet. TMDs konnten mit Hilfe eines Online-Tools TMpred (Hofmann, 1993) bestimmt werden.

5.1.3. Phylogenie der identifizierten P-Glykoproteine

Die Berechnung des Phylogramms, für die das von Prottest 3.0 (Darriba et al., 2011) ermittelte Substitionsmodell LG+I+F+G verwendet wurde, bestätigt die Ergebnisse, die aus dem Sequenzvergleich bereits hervorgegangen sind. Alle Pgps, die in kleinen Strongyliden identifiziert worden sind, finden sich in unmittelbarer Nähe zu ihren Orthologen in weiteren Nematoden-Spezies. Dabei wird ein hoher Verwandtschaftsgrad der Pgp-3-Gruppe zu Pgp-3-Transportern aus C. oncophora, C. elegans und C. briggsae deutlich. Beide Varianten des approximate likelihood ratio Tests ergeben eine Wahrscheinlichkeit von 100 %, dass die Pgp-3 Proteine von C. oncophora und der kleinen Strongvliden Orthologe von Pgp-3 und Pgp-4 der Gattung Caenorhabditis sind. Nur P. pacificus-Pgp-1 zeigte im Sequenzvergleich eine ausgeprägte Übereinstimmung (Tabelle 13) liegt jedoch im Phylogramm deutlich entfernt. Für CegPgp-9 sind Pgp-9 aus Caenorhabditis und P. pacificus die nächst-verwandten Sequenzen. Die Wahrscheinlichkeit einer Verwandtschaft unterscheidet sich entsprechend den Berechnungsmethoden. Nach der Shimodaira-Hasegawa Modifizierung liegen die Werte zwischen 95-99 %, wurden sie Bayesianisch berechnet ergibt sich eine 100%ige Wahrscheinlichkeit der Verwandtschaft. Auch dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem Sequenzvergleich (Tabelle 16). Die Nummerierung der Pgps spiegelt ihre Orthologie wieder, d.h. CegPgp-9 findet sich in Nachbarschaft zu weiteren Pgp-9 Proteinen. Dies gilt ebenso für alle Pgp-3 Proteine. Die "Outgroup" setzt sich deutlich von allen anderen Pgps ab und bildet im Stammbaum eine hypothetische Wurzel, die zeigt, dass die Pgps der Nematoden monophyletisch sind und sich während der Evolution des Stammes diversifiziert haben (Abbildung 4)



Abbildung 4: Phylogenetischer Stammbaum der Pgps. Die Sequenzen wurden mit Clustal X2 (Larkin et al., 2007) verglichen und die Verwandtschaft nach der Bestimmung des optimalen Modells der Aminosäuresubstitutionen durch Prottest 3.0 (Abascal et al., 2005; Darriba et al., 2011) mit PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) berechnet. Dabei wurde die Maximum-likelihood Methode angewandt und die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass bestimmte Proteine eine monophyletische Gruppe bilden durch die Modifikation des approximate likelihood Tests nach Shimodaira-Hasegawa bzw. durch eine Bayesianische Transformation. Bei Abweichungen zwischen den Ergebnissen wird der nach Shimodaira-Hasegawa berechnete Wert hinter dem Schrägstrich angegeben. Graphische Bearbeitungen erfolgten mit Hilfe der Programme MEGA5 (Tamura et al., 2007) und Coral Graphics Suite (COREL CORPORATION, Kanada).

5.2. Heterologe Expression von CegPgp-3 und -9 in S. cerevisiae

5.2.1. Nachweis der Transkription der cDNA

Nach der Transformation beider Hefestämme mit den jeweils zwei cDNA-Varianten für CegPgp-3 und Pgp-9 (mit bzw. ohne V5/6×His Tag) wurden die behandelten Zellen auf Agarplatten angezüchtet, denen kein Uracil hinzugefügt wurde. Der URA3-Marker, der die Auxotrophie für Uracil aufhebt und Teil des Vektorplasmids ist, ermöglicht das selektive Wachstum erfolgreich transformierter Hefezellen. Nach 48 h Inkubationszeit bei 30 °C konnte letztendlich das Wachstum Kolonien für alle von gewünschten Hefestamm-Plasmidkombinationen festgestellt werden. Die transformierten Hefestämme sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Übersicht über transformierte Hefestämme und die verwendete cDNA. Alle Klone wurden auf Transkription der cDNA mit Hilfe einer RT-PCR untersucht.

cDNA	Hefestämme		
	AD1-7	JRY8012	
CegPgp-3	+	+	
CegPgp-3 V5/His	+	+	
CegPgp-9	+	+	
CegPgp-9 V5/His	+	+	
LacZ (Kontrolle)	+	+	

Allerdings ist das selektive Wachstum nur ein Nachweis für die Expression der Markersequenz und erlaubt weder eine sichere Aussage darüber, ob das vollständige Plasmid mit eingefügter cDNA in der Zelle vorliegt, noch ob diese cDNA auch transkribiert wurde oder funktional ist. Da die Transkription eine unbedingte Vorrausetzung für die Proteinbiosynthese und damit ein wichtiger Teilprozess der Genexpression ist, sollten durch eine RT-PCR die eingefügten Pgp-Sequenzen nachgewiesen werden. Durch die RT-PCR konnten Hefezelllinien mit Transkription beider Pgps, jeweils mit und ohne V5/6×His-Tag, nachgewiesen werden. Als positiv wurden solche PCR-Ergebnisse gewertet, für die in der Agarosegelelektrophorese Produkte in richtiger Größe dargestellt werden konnten bei gleichzeitig negativen Ergebnissen in den Kontrollansätzen ohne Reverse Transkriptase (noRT) und ohne Zusatz von cDNA (noTemplate). Die Größe der erwarteten Produkte wurde mit Clone Manager Professional 9 (Operations, 2004) basierend auf der Volllängensequenz, der Vektorsequenz und den verwendeten Primern berechnet. Die Produktgrößen sind in Abbildung 5 angegeben. Die Abbildung 5 stellt die Ergebnisse der RT-PCR, aufgetrennt in einer Gelelektrophorese, dar. Die

Fragmente wurden nicht sequenziert, sondern anhand von Größenmarkern im Gel bestimmt. Es konnten auf diese Weise für alle transformierten Hefestämme PCR-Produkte, die bei korrekter Transkription der eingefügten cDNA erwartet wurden, nachgewiesen werden.



Abbildung 5: Transkriptionsnachweis von *Ceg*Pgp-3 und Pgp-9 in *S. cerevisiae* AD1-7 und JRY8012 Gelelektrophoresebild nach RT-PCR. **A und D** Erwartete Fragmentgröße (FG) für *Ceg*Pgp-9 V5/His: 398 bp; FG für *Ceg*Pgp-9: 384 bp **B und E** FG für *Ceg*Pgp-3 V5/His: 476 bp **C** FG für *Ceg*Pgp-3: 441 bp.

5.2.2. Nachweis der Expression rekombinanter Proteine

Im Western Blot konnte die Expression der rekombinanten Proteine trotz Modifizierungen und Anwendung des Pgp-spezifischen Antikörpers C219 und eines V5-Antikörpers nicht nachgewiesen werden. Die Expression des Kontrollplasmids konnte für JRY8012 mit LacZ im Westernblot nachgewiesen werden. Für AD1-7 waren die darzustellenden Banden sehr viel schwächer (Daten nicht dargestellt).

Die FACS Analyse bestand aus zwei Einzelschritten. Zuerst wurden die Zellen durch die Ergebnisse des Forward Scatters (FSC) und des Side Scatter (SSC) auf ihre Populationszusammensetzung untersucht. Während mit Hilfe des FSC die Zellgröße bestimmt wurde, erlaubte der SSC eine Unterscheidung in Bezug auf die Granulierung der Zelle. Handelt es sich um eine homogene Zellpopulation, dann zeigten sich mehr oder weniger dichte Punktwolken, die im FSC und SSC ähnliche Eigenschaften aufweisen. Im Fall von inhomogenen Populationen können mehrere Regionen voneinander unterschieden werden. Erst nach der Definition putativer Zellgruppen wurde die Fluoreszenz bestimmt.

Die Analysen wurden für alle Stämme durchgeführt, die mit *Ceg*Pgp-3 und Pgp-9 transformiert wurden. Als Vergleich dienten JRY8012 und AD1-7-Hefen, die durch die Transformation mit einem Kontrollplasmid LacZ exprimierten. Jede Probe wurde als Duplikat für das FACS vorbereitet und in drei unterschiedlichen Versuchsansätzen getestet. Zur Analyse möglicher Auto-Fluoreszenz der Zellen wurde jeweils eine Probe ohne Antikörper inkubiert. Ein isotypischer Antikörper führte in Reaktion mit der zweiten Probe zur Detektion unspezifischer Fluoreszenz durch die Bindung über das Fc-Fragment, während die dritte Probe mit dem spezifischen Pgp-Antikörper behandelt wurde. Dafür wurde der Pgp-Antikörper UIC-2 verwendet, der an ein in aktiven Pgps nachweisbares, hoch konserviertes Epitop bindet. Nur ein Fluoreszenzsignal, welches sich von den beiden ersten Kontrollreaktionen unterschied, wurde als spezifischer Nachweis der Expression eines Pgps betrachtet.

JRY8012 mit CegPgp-3

Die Analyse ergab eine homogene Zellpopulation. Die Fluoreszenzsignale konnten jedoch nicht auf eine Bindung des spezifischen Antikörpers zurückgeführt werden. Das bedeutet, dass die festgestellte Fluoreszenz weder von der des Kontrollstammes mit LacZ-Expression, noch von der unspezifischen Fluoreszenz durch Bindung des isotypischen Antikörpers unterschiedlich war.

AD1-7 CegPgp-3

Für AD1-7 wurden basierend auf den FSC-Ergebnissen zwei Zellpopulationen unterschiedlicher Größe identifiziert. Die Regionen wurden für weitere Analysen definiert und als R1 (kleinere Zellen) und R2 (größere Zellen) benannt. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Regionen bestimmt. Durch Subtraktion der unspezifischen Fluoreszenz wurde der Prozentsatz Pgp-exprimierender Zellen berechnet. Dabei konnte ausschließlich in Zellen der R2 spezifische Fluoreszenz ermittelt werden. Die Analyse ergab für AD1-7 *Ceg*Pgp-3 ohne V5/His-Tag einen Anteil positiver Zellen von 2,35 % und 2,3 % in den durchgeführten Replikaten. Für die Expression des V5/His-markierten Proteins konnte in der ersten Probe ein Anteil von 2,75 % und im Duplikat von 2,3 % nachgewiesen werden.

JRY8012 CegPgp-9

Für diesen Hefestamm konnten ebenfalls im FSC anhand von Größenunterschieden zwei Zelltypen unterschieden werden. Zwei Regionen wurden entsprechend als R1 (kleinere Zellen) und R2 (größere Zellen) definiert und auf spezifische Fluoreszenz untersucht. In beiden Regionen wurden positive Zellen identifiziert. Für die Expression des nativen Proteins ergab sich in R1 ein Anteil von 0,67 % und 0,84 % in den jeweiligen Duplikaten. In R2 lag der Anteil bei 1,99 % und 1,33 % positiven Zellen. Für das V5/His-markierte Pgp ergaben sich ähnliche Anteile an Pgp-exprimierenden Zellen innerhalb der Regionen. Für R1 zeigten 0,58 % und 0,74 % der Zellen eine spezifische Fluoreszenz, während in R2 1,15 % und 1,39 % positive Zellen gezählt wurden.

AD1-7 CegPgp-9

Es konnten wiederum innerhalb der Population zwei Zellgruppen nach Größe unterschieden werden. Die im FSC identifizierten kleineren Zellen wurden als R1 zusammengefasst und die größeren Zellen als R2 (Abbildung 6). Die spezifische Fluoreszenz und damit zusammenhängend die höhere Expression an Pgp konnte grundsätzlich in der R2 Population festgestellt werden. R1 zeigte für das native Protein einen Anteil an positiven Zellen von 5,4 % und 8,9 %. In R2 lag dieser Anteil bei 15,9 % und 20,4 %. Für das Pgp mit V5/His-Tag konnten in R1 4,9 % und 4,4 % exprimierende Zellen gezählt werden. Diese Expressionsrate lag innerhalb der R2 bei 18,9 % und 16,3 % (Abbildung 6).





Abbildung 6: Ergebnis der Scanning-Analyse für AD1-7 mit *Ceg*Pgp-9 V5/6×His. **Oben**: Darstellung der zwei analysierten Regionen R1 und R2 im Forward Scatter. **Links**: Fluoreszenzsignale in R1/R2 mit spezifischem und unspezifischem Antikörper. **Rechts**: Fluoreszenzsignale in R1/R2 mit spezifischem und unspezifischem Subtraktion der Ergebnisse.

5.3. P-Glykoprotein-Expression und Wirkstoffsuszeptibilität

Nachdem die Transkription der Pgp-Sequenzen in den Hefestämmen nachgewiesen werden konnte, sollte die Suszeptibilität der Zellen gegenüber bestimmten Wirkstoffen festgestellt werden. Dabei ging es um den Nachweis, ob heterolog exprimierte Pgps die Fähigkeit besitzen, eine erhöhte Toleranz oder Resistenz gegenüber den Testsubstanzen zu vermitteln.

Im ersten Schritt wurde die Wirkung von bekannten Antimykotika auf transformierte Hefezellen untersucht. Das Imidazol-Derivat Ketoconazol (KCON) besitzt eine breite, antimykotische Wirksamkeit. Als zweiter Wirkstoff wurde TBZ (TBZ), ein Benzimidazol, verwendet. Obwohl TBZ zur Wirkstoffgruppe der Anthelminthika gezählt wird, besitzt es ebenso eine ausgeprägte fungizide Wirkung.

Die Versuchsreihen zur Suszeptibilitätsmessung gegenüber KCON wurden auf Grund der stabileren Wachstumseigenschaften mit transformierten JRY8012 begonnen. Als Wachstumsparameter wurde entsprechend der OD₆₀₀-Werte, die während der Inkubation über 48 h ermittelt wurden, die area under the curve (AUC) berechnet. Parameter wie die maximale Wachstumsgeschwindigkeit oder die Dauer der Lag-Phase erwiesen sich als nicht praktikabel, da deren Bestimmung in Proben, in denen kein oder nur sehr wenig Wachstum stattgefunden hatte, die verwendeten Programme überforderte. Zum Beispiel wurden mangels nennenswerter Anstiege der OD₆₀₀ über den gesamten Versuchsverlauf, kleine Spitzen im Signalrauschen von der Software als hohe maximale Wachstumsgeschwindigkeiten interpretiert. Im Gegensatz zur Latenzzeit und Wachstumsgeschwindigkeit, die nicht verlässlich bestimmt werden konnten, sobald nur eine sehr geringe OD-Zunahme erfolgte, erwies sich die AUC als robuster und sensitiver Wachstumsparameter. Durch ihren Einfluss auf den Kurvenverlauf haben alle anderen Kennzahlen, wie die Latenzphase, die max. Wachstumsgeschwindigkeit und die max. OD₆₀₀ Einfluss auf die AUC. Das relative Wachstum (rel. Wachstum) wurde berechnet, indem alle AUC-Werte durch den AUC-Mittelwert der Kontrolle (0,5 bzw. 1 % DMSO-Zusatz, 0,18 bzw. 0,72 μM KCON) des jeweiligen Versuches korrigiert wurden. Dieser Parameter gibt also entsprechend das Wachstum der Hefekulturen im Verhältnis zur ihrer Kontrolle an.

5.3.1. Vergleich der Wirkung von KCON zwischen transformierten Hefestämmen

JRY8012 mit CegPgp-9

KCON wirkte konzentrationsabhängig auf das relative Wachstum von JRY8012-Hefen. Sowohl für den LacZ-exprimierenden, als auch für *Ceg*Pgp-3 transformierte Hefen konnte mit
den angewendeten Konzentrationen bis 5,88 μ M keine vollständige Inhibition des Zellwachstums erreicht werden.

Bei der Berechnung einer Konzentrations-Wirkungskurve ergaben sich keine signifikanten Abweichungen für beide untersuchten Hefestämme (p=0,9240). Die logistische Regression ergab eine übereinstimmende EC_{50} von 0,47 µM mit abweichenden 95 % Konfidenzintervallen (95 % CI JRY8012 *Ceg*Pgp-9: 0,46 - 0,49 µM; JRY8012 LacZ: 0,46 - 0,48 µM). Die Expression von *Ceg*Pgp-3 führte in JRY8012 zu keiner Änderung der Sensitivität gegenüber KCON im Vergleich zum Kontrollstamm.



Abbildung 7: Konzentrations-Wirkungskurve von KCON getestet in JRY8012 mit LacZ und *Ceg*Pgp-3-Expression. Das rel. Wachstum wurde normalisiert, der Maximalwert auf 1 festgelegt. Die Negativkontrolle wurde auf eine Konzentration von $10^{-3} \mu M$ KCON gesetzt. Die Berechnung der EC₅₀ ergab keine signifikante Abweichung zwischen beiden Hefestämmen (p=0,9240). Die Punkte zeigen Mittelwerte ± SEM.

JRY8012 mit CegPgp-9

Nach der Untersuchung von *Ceg*Pgp-3 in diesem Hefestamm wurden JRY8012 Hefen mit *Ceg*Pgp-9 im Wachstumsassay eingesetzt. Auch für diese Versuche wurde jeweils der Pgpexprimierende, sowie ein LacZ-Kontrollstamm verwendet, um potentielle Unterschiede in der KCON-Sensitivität festzustellen. Für diesen Ansatz wurde nur ein Versuch durchgeführt (n=6). KCON hatte auf beide Stämme konzentrationsabhängig eine wachstumsmindernde Wirkung, wie die Abbildung 8 zeigt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von JRY8012 *Ceg*Pgp-3 ist der Effekt auf das Hefewachstum sehr abrupt. Die Kurvenverläufe sind annähernd identisch. Entsprechend zeigt auch das Ergebnis der log. Regression keine signifikanten Unterschiede der EC_{50} (p=0,2565). Sie lag für den LacZ-exprimierenden Stamm bei 0,48 μ M (95 % CI: 0,46 -0,5 μ M). Mit *Ceg*Pgp-9-Expression lag die EC₅₀ bei 0,49 μ M (95 % CI: 0,47 - 0,51 μ M). Nach diesem Versuch wurde das Assay auf die Verwendung des AD1-7-Hefestammes umgestellt.



Abbildung 8: Konz.-Wirkungskurve von JRY8012 mit LacZ und *Ceg*Pgp-9-Expression unter KCON-Einfluss. Die Negativkontrolle wurde auf eine Konzentration von $10^{-3} \mu$ M KCON gesetzt. Es konnte keine signifikanten Unterschiede der EC₅₀ zwischen beiden Stämmen festgestellt werden.

AD1-7 CegPgp-3

Entsprechend der Ergebnisse der FACS-Analyse ergab sich keine spezifische Pgp-Expression für diesen Hefestamm. Daher wurde auf weitere Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung verzichtet.

AD1-7 CegPgp-9

Ein LacZ exprimierender Kontrollstamm (AD1-7 LacZ) wurde in diesem Versuchsansatz mit AD1-7 *Ceg*Pgp-9 mit und ohne V5/6×His-Tag vergleichend untersucht. Die Markierung des exprimierten Proteins sollte eine Detektion mit einem spezifischen V5-Antikörper erlauben, die allerdings im Rahmen des Projektes nicht gelang. Bei der Untersuchung zeigten sich signifikante Unterschiede im Wachstum bei 0,37 μ M und 0,73 μ M KCON. Die log. Regression mit vier Parametern ergab für alle Hefestämme signifikant unterschiedliche EC₅₀-Werte (p<0,0001). Für AD1-7 LacZ lag die EC₅₀ bei 0,39 μ M (95 % CI: 0,38 - 0,42 μ M). Für AD1-7 mit *Ceg*Pgp-9 wurden 0,87 μ M (95 % CI: 0,67 - 1,13 μ M) und mit *Ceg*Pgp-9 V5/6×His 1,18 μ M (95 % CI: 0,99 - 1,40 μ M) berechnet. Die letzte Konzentration, bei der noch ein vollständiges Wachstum für den Kontrollstamm festgestellt werden konnte, lag bei 0,18 μ M KCON. Beide Pgp-9-exprimierende Stämme tolerierten bis 0,73 μ M KCON ohne Wachstumsminderung. Entsprechend wurden 0,18 und 0,73 μ M als kritische Konzentrationen für die jeweiligen Hefestämme definiert. Die Konzentration-Wirkungskurve ist in Abbildung 9 dargestellt.



Abbildung 9: Konz.-Wirkungskurve für AD1-7 mit LacZ und *Ceg*Pgp-9/*Ceg*Pgp-9 V5/6×His-Expression unter KCON-Einfluss. Wirkstoffkonzentrationen wurden logarithmiert, die Werte des rel. Wachstums normalisiert. Der Maximalwert wurde auf 1 festgesetzt. Die Negativkontrolle wurde auf eine Konzentration von $10^{-3} \mu M$ KCON gesetzt. Eine log. Regression ergab signifikant unterschiedliche EC₅₀ der Hefestämme (p<0,001)

5.3.2. Vergleich der Wirkung von TBZ zwischen transformierten Hefestämmen



Abbildung 10: Konz.-Wirkungskurve von TBZ getestet in AD1-7 mit LacZ und CegPgp-9. TBZ-Konzentrationen wurde logarithmiert und das rel. Wachstums normalisiert. Die Berechnung der EC50 ergab keine signifikante Abweichung zwischen beiden Hefestämmen (p=0,4836). Die Punkte zeigen Mittelwerte \pm SEM.

Für die Untersuchung von TBZ wurden ebenfalls AD1-7-Kulturen, die *Ceg*Pgp-9 exprimierten, mit AD1-7 LacZ-Kulturen hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften verglichen. Das rel. Wachstum, basierend auf den AUC-Werten, zeigte einen konzentrationsabhängigen Einfluss von TBZ auf beide Hefestämme. Die logistische Regression ergab keine signifikanten Unterschiede in der EC₅₀ (p=0,4836). Sie lag für AD1-7 *Ceg*Pgp-9 bei 0,41 mM (95 % CI: 0,31 – 0,55). Für AD1-7 LacZ lag dieser Wert bei 0,38 (95 % CI: 0,34

– 0,41). In Abbildung 10 ist die Konzentrations-Wirkungskurve für diese Versuchsreihe dargestellt.

5.3.3. Einfluss von makrozyklischen Laktonen auf die Ketoconazol-Suszeptibilität

Basierend auf den Unterschieden in der Suszeptibilität gegenüber KCON wurde der Einfluss der ML auf die KCON-Wirkung untersucht. Im Versuch wurde der Hefestamm AD1-7 verwendet, da dieser in den FACS Versuchen die höhere Expression der transgenen Pgps und eine geringere Suszeptibilität gegenüber KCON aufwies. Zwei Kontrollen waren zum Nachweis einer möglichen Wirkstoffinteraktion nötig. Die erste Kontrolle enthielt 1 % DMSO (Kontrolle 1) während die zweite mit 0,18 µM (LacZ) bzw. 0,73 µM (CegPgp-9) KCON (Kontrolle 2) versetzt wurde. Darüber hinaus erfolgte eine Behandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen ML ohne Zusatz von KCON, um einen möglichen direkten Einfluss auf das Hefewachstum zu untersuchen. Bei gleichbleibender Konzentration von KCON wurden steigende ML-Konzentrationen in kombinierten Ansätzen angewendet, um den Einfluss auf die KCON-Wirkung zu analysieren. Anschließend wurden die Wachstumsdaten der Ansätze, die nur ML enthielten, normalisiert nach der durchschnittlichen AUC der Kontrolle 1 und im Rahmen einer einfaktoriellen Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede untersucht. Kombinierte Ansätze wurden entsprechend nach der Kontrolle 2 normalisiert und das rel. Wachstums daraus abgeleitet. Es folgte die Berechnung einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und eines Posthoc-Tests zum Nachweis von signifikanten Unterschieden und möglichen Interaktionen der Faktoren.

			AD1-7	Ce	gPgp-9		AD1-7 LacZ							
Ivermectin	μΜ	ohne K	CON		mit 0,73 µM KCON			лМ	ohne KCON			mit 0,18 µM KCON		
		Ø	SEM	n	Ø	SEM	n	μΜ	Ø	SEM	n	Ø	SEM	n
	0,00	1,00	0,03	18	1,00	0,04	18	0,00	1,00	0,03	18	1,00	0,03	18
	0,73	0,93	0,03	18	0,46	0,05	18	0,18	0,99	0,03	18	1,00	0,04	18
	1,47	0,89	0,04	18	0,07	0,01	18	0,37	1,00	0,03	18	0,89	0,03	18
	2,94	0,71	0,04	18	0,02	0,01	13	0,73	0,93	0,03	18	0,85	0,02	18
	4,40	0,77	0,08	18	0,02	0,00	16	1,47	0,94	0,05	18	0,69	0,04	18
	5,87	0,52	0,02	18	0,03	0,01	14	2,94	0,97	0,04	18	0,43	0,04	18

Tabelle 19: Durchschnittliches rel. Wachstum von AD1-7 *Ceg*Pgp-9 und LacZ unter Einfluss von IVM. Ø=Durchschnitt des rel Wachstums, SEM=durchschnittlicher Standardfehler, n=Probenanzahl

Das durchschnittliche rel. Wachstum für beide Hefestämme unter Einfluss von IVM ist in Tabelle 19 zusammengefasst. Für AD1-7 *Ceg*Pgp-9 ist der wachstumsmindernde Effekt von IVM ab einer Konzentration von 2,94 µM höchst signifikant (p<0,001), während die ersten beiden Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle 1 aufweisen. Für den Kontrollstamm konnte kein direkter Einfluss von IVM auf die Wachstumsraten festgestellt werden (Abbildung 11).



Abbildung 11: Einfluss von IVM auf das Hefewachstum. Die Balken zeigen das rel. Wachstum +/- SEM. Signifikante Unterschiede wurden durch eine einfaktorielle Varianzanalyse berechnet mit anschließendem Posthoc-Test (Dunnett) im Vergleich zur Kontrolle ohne IVM (weißer Balken).

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass IVM in Verbindung mit KCON zur signifikanten Wachstumsreduktion in AD1-7 *Ceg*Pgp-9 führt. Schon bei einem molaren Verhältnis von 1:1 (0,73 μ M) zeigte die Hefekultur nur noch ein rel. Wachstum von 0,46, was einer Reduktion um mehr als 50 % im Vergleich zur Kontrolle entspricht. Auch für alle weiteren Konzentrationsstufen konnte im Vergleich zu den Ansätzen ohne KCON-Zusatz ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (p<0,001). Das rel. Wachstum lag bei Werten unter 0,05 ab einer Konzentration von 2,94 μ M IVM. Das heißt ab einer molaren Relation von 1:4 für IVM inhibierte die Kombination aus KCON und ML das Wachstum von AD1-7 *Ceg*Pgp-9 fast vollständig. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab zudem eine signifikante Interaktion der beiden unabhängigen Faktoren IVM-Konzentration und Anwesenheit von KCON (p<0,0001).

Im Kontrollstamm (AD1-7 LacZ) war bei den kombinierten Ansätzen ab einem molaren Verhältnis von 1:8 von KCON zu IVM (1,47 μ M) das Wachstum signifikant verringert. Wie im Fall von AD1-7 *Ceg*Pgp-9 wurde eine signifikante Interaktion der unabhängigen Faktoren nachgewiesen (p<0,0001). Die Ergebnisse beider Hefestämme sind in Abbildung 12 dargestellt.



Abbildung 12: Darstellung des rel. Wachstums (+/- SEM) von AD1-7 CegPgp-9 und LacZ unter Einfluss von IVM mit und ohne Zusatz von 0,73 μ M bzw. 0,18 μ M KCON.

Eprinomectin (EPM) ist ein weiterer Vertreter der Avermectine und wurde ebenfalls im gleichen Versuchsaufbau wie IVM getestet. Die Wachstumsergebnisse von AD1-7 *Ceg*Pgp-9 und LacZ sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

			AD1-7	Ce	gPgp-9		AD1-7 LacZ							
EPRINOMECTIN	μΜ	ohne	KCON	J	mit 0,73 µM KCON				ohne KCON			mit 0,18 µM KCON		
		Ø	SEM	n	Ø	SEM	n	μΜ	Ø	SEM	n	Ø	SEM	n
	0,00	1,00	0,05	18	1,00	0,06	18	0,00	1,00	0,03	18	1,00	0,03	18
	0,73	0,83	0,05	18	0,21	0,02	18	0,18	0,95	0,02	18	0,89	0,03	18
	1,47	0,78	0,05	18	0,04	0,00	18	0,37	1,07	0,04	18	0,78	0,03	18
	2,94	0,89	0,03	18	0,06	0,01	18	0,73	0,94	0,03	18	0,78	0,03	18
	4,40	0,71	0,04	18	0,05	0,01	18	1,47	0,95	0,04	18	0,66	0,04	18
	5,87	0,54	0,04	18	0,03	0,01	18	2,94	0,84	0,04	18	0,22	0,03	18

Tabelle 20: Durchschnittliches rel. Wachstum von AD1-7 *Ceg*Pgp-9 und LacZ unter Einfluss von EPM. Ø=Durchschnitt des rel Wachstums, SEM=durchschnittlicher Standardfehler, n=Probenanzahl

Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle 1 eine signifikante Wachstumshemmung durch EPM im Pgp-9 exprimierenden Stamm bei allen eingesetzten Konzentrationen mit Ausnahme von 2,94 μ M. Der Wirkstoff in Einzelanwendung reduzierte das rel. Wachstum auf 0,83 bei 0,73 μ M (p<0,0281), bei 1,46 μ M EPM erreichte der Wert noch 0,78 (p<0,0025), und fiel auf 0,71 bei 4,40 μ M (p<0,0001). Der Zusatz von 5,87 μ M EPM reduzierte das rel. Wachstum schließlich auf 0,54 (p<0,0001). Obwohl auch 2,94 μ M EPM zur Verringerung des Wachstums führte, war dieser Effekt nicht statistisch signifikant. Es konnte demnach wie bereits für IVM ein wachstumsmindernder Effekt für EPM gezeigt werden.

Beim Versuchsansatz mit dem Kontrollstamm AD1-7 LacZ wurde für EPM ohne Zusatz von KCON bei 2,94 μ M EPM eine signifikante Reduktion des Wachstums festgestellt (p<0,0039). Das rel. Wachstum aller weiteren Konzentrationsstufen wich nicht statistisch signifikant von der Kontrolle 1 ab (Abbildung 13).



Abbildung 13: Wachstumsergebnisse von AD1-7 *Ceg*Pgp-9 und LacZ unter Einfluss von EPM. Die Balken zeigen das rel. Wachstums +/- SEM. Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und anschließendem Posthoc-Test (Dunnett) im Vergleich zur Kontrolle ohne ML-Zusatz (weißer Balken) berechnet.

Wurden die Hefezellen mit KCON und EPM in Kombination inkubiert, führte das im Fall von AD1-7 *Ceg*Pgp-9 in allen Konzentrationsstufen zu einer signifikanten Reduktion des Wachstums (Tabelle 20 und Abbildung 14).

Der Zusatz von 0,73 μ M EPM zur Hefekultur mit 0,73 μ M KCON verringerte das Wachstum bereits auf einen Wert von 0,21 im Durchschnitt. Die Wirkung von EPM ab einem Konzentrationsverhältnis von 1:2 mit KCON reduzierte die Wachstumswerte auf unter 0,05. Eine Ausnahme stellt 2,94 μ M dar. Hier wird noch ein durchschnittliches rel. Wachstum von 0,06 erreicht. Alle Unterschiede sind trotz der wachstumsmindernden Wirkung von EPM allein höchst signifikant (p<0,0001). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von IVM zeigte sich auch für diesen Wirkstoff eine signifikante Interaktion der unabhängigen Faktoren (p<0,0001). Für den Kontrollstamm konnte beim Vergleich der kombinierten Ansätze aus ML und 0,18 μ M KCON ab einer Konzentration von 0,37 μ M EPM ein signifikanter Einfluss auf das Zellwachstum festgestellt werden (Tabelle 20 und Abbildung 14). Die berechnete Interaktion zwischen dem Faktor mit und ohne Zugabe von EPM zeigte sich auch für den Kontrollstamm signifikant (p<0,0001).



Abbildung 14: Darstellung des rel. Wachstums +/- SEM von AD1-7 CegPgp-9 und LacZ unter Einfluss von EPM mit und ohne Zusatz von 0,73 μ M bzw. 0,18 μ M KCON.

Abschließend wurde die Wirkung von MOX im Wachstumsassay untersucht. Die Daten wurden wie für IVM und EPM beschrieben berechnet und normalisiert. Die Tabelle 21 zeigt das durchschnittliche rel. Wachstum für beide Hefestämme im Vergleich.

		A	D1-7	CegPg	p-9		AD1-7 LacZ							
MOXIDECTIN	μΜ	ohn	e KCOl	mit 0,73 μM KCON			μM	ohne KCON			mit 0,18 μM KCON			
		Ø	SEM	n	Ø	SEM	n		Ø	SEM	n	Ø	SEM	n
	0,00	1,00	0,03	34	1,00	0,03	34	0,00	1,00	0,05	18	1,00	0,04	18
	0,73	1,09	0,03	34	0,69	0,05	34	0,18	1,00	0,05	18	0,99	0,06	18
	1,47	1,05	0,04	34	0,41	0,04	34	0,37	1,13	0,07	18	0,87	0,04	18
	2,94	1,13	0,03	24	0,08	0,01	24	0,73	1,02	0,04	18	0,94	0,04	18
	4,40	0,95	0,05	24	0,08	0,01	24	1,47	1,05	0,05	18	0,76	0,04	18
	5,87	0,92	0,04	24	0,08	0,01	24	2,94	0,98	0,05	18	0,53	0,05	18

Tabelle 21: Ergebnisse der Wachstumsassays mit Verwendung von MOX. Ø=Durchschnitt des rel Wachstums, SEM=durchschnittlicher Standardfehler, n=Probenanzahl

Eine direkte Wachstumsminderung durch MOX wurde in keinem der Hefestämme nachgewiesen. Dafür ist im Fall von AD1-7 *Ceg*Pgp-9 mit Zusatz von 2,94 μ M MOX eine signifikante Steigerung des rel. Wachstums auf durchschnittlich 1,13 feststellbar (p<0,0352).



Abbildung 15: Wachstumsergebnisse von AD1-7 *Ceg*Pgp-9 und LacZ unter Einfluss von MOX. Die Balken zeigen das rel. Wachstums +/- SEM. Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und anschließendem Posthoc-Test (Dunnett) im Vergleich zur Kontrolle ohne ML-Zusatz (weißer Balken) berechnet.

In Kombination mit 0,73 bzw. 0,18 μ M KCON zeigten sich dagegen deutliche Änderungen des Wachstumsverhaltens in beiden Stämmen. Die zweifaktorielle Varianzanalyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur der α -Fehler bestätigt eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit der Wachstumsraten. Darüber hinaus weichen die Ergebnisse mit und ohne Zusatz von KCON signifikant voneinander ab. Beide Faktoren (ML-Konzentration ohne und mit Zugabe von KCON) interagieren sowohl in AD1-7 *Ceg*Pgp-9, als auch in AD1-7 LacZ in statistisch signifikantem Maß (p<0,0001). Die Ausprägung der Effekte variiert zwischen beiden Stämmen allerdings erheblich. Bei Expression von *Ceg*Pgp-9 führt die Zugabe von 0,73 μ M KCON zusammen mit 0,73 μ M MOX zur signifikanten Verringerung des rel. Wachstums auf 0,69. Ab einem Verhältnis von 1:4 von KCON zu ML ist kein Hefewachstum mehr feststellbar. Für den Kontrollstamm ist eine signifikante Wachstumsminderung ab einem Verhältnis von 1:2 nachgewiesen worden (p<0,002). Die nächsthöhere ML-Konzentration hatte keinen Einfluss auf das Wachstum. Erst ab einem Verhältnis von 1:6 (1,47 μ M MOX) wird erneut ein signifikant reduziertes rel. Wachstum von 0,76 festgestellt (p<0,001). Auch 2,94 μ M MOX führten in Kombination mit KCON zur signifikanten Wachstumsminderung in AD1-7 LacZ (p<0,0001), dabei liegt die Reduktion des Wachstums bei 47 % (Abbildung 16).



Abbildung 16: Darstellung des rel. Wachstums +/- SEM von AD1-7 CegPgp-9 und LacZ unter Einfluss von MOX mit und ohne Zusatz von $0,73 \mu$ M bzw. $0,18 \mu$ M KCON

Versuche haben für IVM Die vorangegangenen und EPM eine direkte. wachstumshemmende Wirkung auf S. cerevisiae mit Pgp-9-Expression gezeigt. EPM zeigte darüber hinaus bei 2,94 µM eine hemmende Wirkung auf AD1-7 LacZ. Die Wirkung auf das Wachstum ohne Zugabe von KCON variierte dabei im Fall von AD1-7 CegPgp-9 zwischen den Wirkstoffen signifikant. Ein konzentrationsabhängiger Effekt ist für IVM und EPM zu erkennen, der jedoch für EPM am deutlichsten ist und bereits ab einer Konzentration von 0,73 µM beginnt. Die Werte von IVM und EPM weisen außer für 5,87 µM keine signifikanten Unterschiede zueinander auf. MOX unterscheidet sich im Gegensatz dazu hinsichtlich einer Wachstumsminderung bereits ab der niedrigsten Konzentration von 0,73 μ M signifikant von EPM. Die Effekte von MOX und EPM unterschieden sich in allen Konzentrationsstufen signifikant voneinander. Beim Vergleich der Wirkung der ML auf die KCON-Wirkung zeigen sich ebenfalls unterschiedliche Ausprägungen. Obwohl im Einzelvergleich für alle ML bereits ab einem Verhältnis von 1:1 mit KCON der Einfluss als signifikant mit dem equimolaren ML-Ansatz ohne KCON-Zugabe berechnet wurde, bestehen quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Wirkstoffen. Die Ergebnisse für IVM und EPM unterscheiden sich in der niedrigsten Konzentrationsstufe signifikant voneinander. Das rel. Wachstum der Hefen unter Einfluss von MOX und KCON ist in allen Konzentrationen höher als das der anderen ML. Signifikant ist dieser Unterschied jedoch nur für die beiden niedrigsten Konzentrationen. Im Kontrollstamm weichen EPM und MOX bei 0,73 und 2,94 μ M signifikant voneinander ab. Im Gegensatz zu IVM zeigt EPM bei 2,94 μ M einen signifikant größeren Einfluss auf das rel. Wachstum (Abbildung 17).



Abbildung 17: Darstellung des Effekts auf das rel. Wachstum von AD1-7 mit *Ceg*Pgp-9 und LacZ durch IVM, EPM und MOX ohne und mit Zusatz von 0,73 μ M bzw. 0,18 μ M KCON. Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und Bonferroni-Korrektur der a-Fehler berechnet. *= p<0,05 **= p<0,01 *** =p<0,001.

6. Diskussion

Kleine Strongyliden gehören nicht nur auf Grund ihrer hohen Prävalenz weltweit zu den bedeutendsten Nematoden des Pferdes, sondern auch wegen ausgeprägter Anthelminthika-Resistenzen. Fast alle Untersuchungen der letzten Jahre führten zum Nachweis von resistenten Cyathostomin-Populationen. Dabei sind Resistenzen gegen BZ am verbreitetsten. Doch wird immer häufiger auch eine verringerte oder unzureichende Effektivität von ML festgestellt (Molento et al., 2012). Die Aufklärung von Resistenzmechanismen geht Hand in Hand mit der Untersuchung von Möglichkeiten zum Erhalt der Wirksamkeit von Anthelminthika oder suszeptibler Nematodenpopulationen. Molekularbiologische Untersuchungen ermöglichen bereits die Identifizierung von BZ-resistenten Genotypen, ein entscheidender Schritt zum Nachweis subklinischer Resistenz. Doch gerade für BZ-Resistenzen in kleinen Strongyliden sind mit hoher Wahrscheinlichkeit weitere genetische Modifikationen als ein einzelner, spezifischer Polymorphismus am β -Tubulin-Gen von Bedeutung (Drogemüller et al., 2004a; Pape et al., 2003; Von Samson-Himmelstjerna et al., 2003). Für ML sind die Ursachen einer reduzierten Sensitivität bisher besonders im Modelnematoden C. elegans und in H. contortus untersucht worden. Neben Veränderungen an der ML-Bindungsstelle an Untereinheiten Glutamat-abhängiger Chloridkanäle, wird eine veränderte Wirkstoffverteilung oder ein verstärkter Export als ein sehr wichtiger Resistenzmechanismus vermutet (Higgins, 2007; Wolstenholme und Kaplan, 2012). Die Schlüsselrolle der Pgps in der Distribution von IVM im Säugetier wurde mehrfach bewiesen (Roulet et al., 2003; Schinkel et al., 1994). Auch in parasitischen Nematoden deutet vieles auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von ABC-Transportern und ML-Resistenz hin (Godoy et al., 2015a; Godoy et al., 2016; Godoy et al., 2015b; Kerboeuf et al., 2003). Im Vergleich zu den humanen oder murinen Pgps besitzen Nematoden mehr und genetisch sehr variable Pgp-Gene. Mittlerweile sind zwar einige vollständige Sequenzen einzelner Pgp-Isotypen für Spezies wie H. contortus, O. volvulus, O. ostertagi und P. equorum bekannt, doch fehlen für viele parasitische Nematoden einschließlich der Cyathostominae umfassende genetische Informationen (2.4.2. P-Glykoproteine in Nematoden). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zum einen die Identifizierung von Pgps in kleinen Strongyliden und die Untersuchung einer möglichen Beteiligung am Anthelminthika-Transport.

6.1. Identifizierung von Pgp-Sequenzen

Insgesamt vier vollständige cDNA-Sequenzen in drei Cyathostominen-Spezies (C. elongatus, C. insigne und C. goldi) wurden erfolgreich identifiziert. Im Gegensatz zu anderen Nematoden stellt die hohe Anzahl an morphologisch sehr ähnlichen Spezies in der Unterfamilie der kleinen Strongyliden eine besondere Schwierigkeit dar, was ihrem fast ausschließlichen Auftreten Mischinfektionen geschuldet ist. Obwohl in molekularbiologische Differenzierungsmethoden für einige Spezies bekannt sind, gelten sie als noch nicht gänzlich etabliert (Hodgkinson, 2006) und fanden aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit keine Anwendung. Die morphologische Zuordnung gilt noch immer als Standardmethode, die von wenigen Experten weltweit mit hoher Sicherheit durchgeführt werden kann (Hodgkinson, 2006).

Auf Grund von Alignments und phylogenetischen Berechnungen unter Verwendung von Pgp-Sequenzen unterschiedlicher Nematoden wurden die amplifizierten Sequenzen als ortholog zu Pgp-3 bzw. Pgp-9 von C. elegans bestimmt. Damit bestätigten sich die Ergebnisse einer Zuordnung von Teilsequenzen hochkonservierter Nukleotid-bindender Domänen, die bereits zu Beginn der Arbeit bekannt waren (Drogemüller et al., 2004c). Der Isotyp 3 konnte über eine schrittweise RT-PCR, wie sie z.B. für Toxocara canis unc-49 beschrieben wurde (Miltsch et al., 2012), zunächst in C. elongatus amplifiziert und sequenziert werden. Die Verwendung des Primerpaares, das in C. elongatus für die Volllängen-RT-PCR eingesetzt wurde, ermöglichte auch die Identifizierung dieses Pgp-Isotyps in C. insigne und C. goldi. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen haben eine Länge von ca. 1300 aa, was der Größe in C. elegans als auch dem humanen MDR-1 entspricht (Chen et al., 1986; Sheps et al., 2004b). Die ausgeprägte Ähnlichkeit zwischen den Pgp-3-Sequenzen der untersuchten Spezies wird auch im Alignment deutlich. Hier zeigen die Aminosäuresequenzen eine max. Identität von mehr als 90 % zueinander. Die Zuordnung zur Proteinfamilie der ABC-Transporter und dabei speziell zu den Pgps wurde durch die Untersuchung von konservierten Proteindomänen bestätigt. Das ABC-Signatur-Motiv, spezifisch für die ABC-Transporter Superfamilie, sowie weitere funktionelle Einheiten der NBD, wie Walker A und B und D-/H- und Q-Loop wurden dabei in der Primärstruktur der identifizierten Pgps nachgewiesen (Higgins, 2001). Substrate der Pgps werden entlang von 6 α-Helices, die die Zellmembran durchspannen, aus dem Zellinneren exportiert (Sarkadi et al., 2006). Diese Helices wurden ebenfalls in den untersuchten Sequenzen gefunden. Alle Motive, Domänen und helicalen Strukturelemente kommen in den vollständigen

Sequenzen jeweils doppelt vor und können den beiden ähnlichen Hälften des Proteindimers zugeordnet werden.

Vollständige Pgp-3-Sequenzen sind von *C. elegans* und *C. briggsae*, sowie von *C. oncophora* veröffentlich worden (Consortium, 1998; Demeler et al., 2013a; Stein et al., 2003). Funktionell ist nur wenig zur Bedeutung dieses Proteins bekannt. Ein möglicher Transport von Colchizin und Chloroquin wird in *C. elegans* vermutet (2.4.2. P-Glykoproteine in Nematoden). Bei der Untersuchung von *pgp-3 C. elegans knock-out* Mutanten zeigten diese bei Yan et al. (2012) und Ardelli und Prichard (2013) keine signifikante Änderung der ML-Sensitivität im Vergleich zum Wildstamm, während Janssen et al. (2013b) in einem Entwicklungsassay einen geringe Abnahme der ML-Toleranz nachwiesen.

Ein sehr ähnlicher RT-PCR-Versuchsaufbau mit schrittweiser Amplifikation führte zur Identifizierung des Pgp-Isotyp-9 in C. elongatus. Im Alignment zeigt das korrespondierende Protein eine Übereinstimmung auf Aminosäurebene von mehr als 60 % mit C. briggsae PGP-9, während die Ähnlichkeit zu PGP-3 in weiteren kleinen Strongyliden-Spezies nur bei 39 % liegt. Es ist bekannt, dass Nematoden-Pgps im Gegensatz zu humanen Pgps eine hohe Divergenz aufweisen (Lincke et al., 1992). Bei dem Versuch das Primerpaar der Volllängenamplifizierung in C. elongatus mit cDNA der beiden anderen Spezies zu kombinieren, konnte keine Sequenz amplifiziert werden. Da die Zielsequenz dieser Primer im nicht translatierten und wenig konservierten Bereich der cDNA des Pgps liegt, war diese Inkompatibilität zu erwarten. Vielmehr ist das diesbezügliche Ergebnis für Pgp-3 überraschend, das eine hohe Ähnlichkeit der 5'/3'-UTR zwischen den Spezies vermuten lässt. Durch die Verwendung von spezifischen Primern, deren komplementäre Sequenz sich innerhalb des offenen Leserahmens befindet und einer anschließenden RACE-PCR können möglicherweise die 5'- und 3'-Bereiche der Pgp-9 mRNA in C. goldi und C. insigne identifiziert werden. Das wäre besonders für weitere funktionelle Untersuchungen von Bedeutung, da CegPgp-9exprimierende Hefezellen eine signifikant reduzierte KCON-Empfindlichkeit zeigen. Auf diese Ergebnisse wird im Abschnitt 5.3.1 noch genauer eingegangen.

Wie alle in dieser Arbeit identifizierten Pgp-Sequenzen konnte auch *Ceg*Pgp-9 den ABC-Transportern und innerhalb dieser Gruppe den Pgps zugeordnet werden. Alle bekannten konservierten Proteindomänen und Transmembranstrukturen wurden in der Sequenz detektiert und konnten entsprechend der Pgp-Proteinstruktur den beiden dimerischen Hälften zugeordnet werden (Higgins, 2001).

Pgp-9 wurde bisher vor allem in Modellnematoden (C. elegans, C. briggsae und P. pacificus) als vollständige Sequenz nachgewiesen. Dabei handelt es sich um einen überaus

interessanten Isotyp auf Grund einer resistenzassoziierten Aktivität. Hinweise auf einen Zusammenhang mit Veränderungen der ML-Suszeptibilität konnten in mehreren parasitischen Nematoden beobachtet werden (2.4.3. P-Glykoproteine und Anthelminthikaresistenz). Pgp-9 ist im Zusammenhang mit einer verringerten ML-Empfindlichkeit in *T. circumcincta* und *H. contortus* untersucht worden. Das Expressionsniveau dieses Pgps war in beiden Parasitenspezies mit nachgewiesenen Resistenzen signifikant erhöht im Vergleich zu empfindlichen Isolaten (Dicker et al., 2011b; Williamson et al., 2011) oder zeigte bei heterologer Expression eine deutliche Beeinflussung des Pgp-vermittelten Rhodamin-Exports (Godoy et al., 2016). Es besteht die Möglichkeit, dass dieser Isotyp speziesübergreifend durch seine Substratspezifität für Anthelminthikaresistenzen oder eine verminderte Wirksamkeit bestimmter Anthelminthika verantwortlich sein könnte. In diesem Fall stellt die Expression oder Überexpression von Pgp-9 einen potentiellen Resistenzmechanismus dar.

Eine Transkriptomanalyse der Spezies C. goldi, die vor kurzem veröffentlicht wurde, ergab keinen Nachweis transkribierter Pgp-Sequenzen (Cwiklinski et al., 2013). Es ist bekannt, dass erst ab einer gewissen "Tiefe" dieser Analyse davon ausgegangen werden kann, ein vollständiges Transkriptom, also die Gesamtheit aller exprimierten Gensequenzen zu einem bestimmten Zeitpunkt erfasst zu haben. Von besonderer Bedeutung ist das für Gene mit einer geringen oder variablen Expressionsrate. Die "Tiefe" entspricht dabei der Anzahl an sequenzierten Fragmenten (reads), ist aber gleichzeitig abhängig von der Länge der generierten Sequenzen. Verschiedene Systeme wie z.B. Pyrosequencing oder Illumina Sequenzierung werden aktuell für umfangreiche RNA-Sequenzierungen verwendet und produzieren reads unterschiedlicher Länge (Liu et al., 2012; Quail et al., 2012). In A. caninum ermöglichten mehr als 1,5 Mio. reads (Pyrosequencing und Sanger Sequenzierung) eine Erfassung des Transkriptoms zu 93 % (Wang et al., 2010). Mit etwas mehr als 400.000 expressed sequence tags (EST's), die durch Pyrosequencing (454 Sequenzierung) generiert wurden, ist die Analyse des T. circumcinta-Tanskriptoms deutlich weniger umfangreich. Hier finden sich keine Angaben zur prozentualen Erfassung aller transkribierter Gene oder zur Identifizierung von Pgp-Sequenzen (Menon et al., 2012). Mit nur 50.000 reads wurden im Gegensatz dazu in einer früheren Studie mit IVM-selektierten Nematoden zwei Pgp-korrespondierende Sequenzen im T. circumcincta-Transkriptom nachgewiesen (Dicker et al., 2011a). Mit 450.000 reads (454 pyrosequencing) weist die Transkriptomanalyse von C. goldi eine durchschnittliche Tiefe auf. Der fehlende Nachweis kann mit einer zu geringen coverage der identifizierten Sequenzen zusammenhängen. Denkbar ist auch eine ausgeprägte Expressionsvariabiliät abhängig vom Entwicklungsstadium, wie es bereits für *T. circumcincta* untersucht worden ist (Dicker et al.,

2011b). Dabei zeigte sich vor allem in den Nematodeneiern eine ausgeprägte Expressionssteigerung von Pgp-9 unter IVM-Einfluss. Doch unabhängig von den Ergebnissen der Transkriptomanalyse von *C. goldi* belegen die Resultate der vorliegenden Arbeit und die bereits 2004 amplifizierten Pgp-Teilsequenzen das Vorkommen von Pgps in 9 Cyathostomin-Spezies.

6.2. Heterologe Expression in S. cerevisiae

Eine Beteiligung von Pgps an der Entstehung von Anthelminthikaresistenz wurde häufig generalisiert untersucht, indem durch mehr oder weniger spezifische Pgp-Inhibitoren dieser Exportmechanismus unterdrückt und anschließend die Wirkstoffsuszeptibilität der Nematoden bestimmt wurde (AlGusbi et al., 2014; Bartley et al., 2009; Demeler et al., 2013a). Der Nachweis von Substratspezifitäten besonders in C. elegans zeigt jedoch, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht alle Mitglieder dieser Protein-Familie in der Lage sind, anthelminthische Wirkstoffe zu transportieren (2.4.3.**P-Glykoproteine** und Anthelminthikaresistenz). Daher führt erst die Untersuchung von einzelnen Pgp-Isotypen zur Identifizierung potentieller Resistenzfaktoren. Die qRT-PCR ist dabei eine Methode zum Nachweis spezifischer Expressionsmuster zu einem bestimmten Zeitpunkt (steady state) oder zum Nachweis von Allel-Frequenzen unterschiedlicher Pgps nach Selektion mit Anthelmintika. Sie wird häufig zum Vergleich von phänotypisch-suszeptiblen und -resistenten Populationen angewendet (2.4.3. P-Glykoproteine und Anthelminthikaresistenz). Die Änderung der mRNA-Quantität kann Hinweise geben auf eine erhöhte bzw. verringerte Expression des korrespondieren Proteins, welches z.B. mit einer Anthelminthika-Toleranz in Verbindung gebracht wird. Im Gegensatz zur heterologen Expression müssen für diese Art der Untersuchung lediglich Teile der Zielsequenz bekannt sein. Untersuchungen in H. contortus haben gezeigt, dass starke Expressionsschwankungen innerhalb einer Population mit gleichem Resistenzstatus auftreten können (Williamson und Wolstenholme, 2012). Diese Schwankungen haben einen nachteiligen Effekt auf die Aussagekraft der qRT-PCR-Ergebnisse. Im Fall eines multi-genen Resistenzmechanismus kann darüber hinaus das mRNA-Vorkommen eines einzelnen Gens eventuell nur minimal erhöht sein und zu quantitativen Unterschieden führen, die nicht immer nachgewiesen werden oder unterhalb der statistischen Signifikanzgrenze liegen (Williamson und Wolstenholme, 2012). Gerade für ML wird ein Resistenzmechanismus vermutet, an dem mehrere Proteine beteiligt sind (2.2.3. Makrozyklische Laktone). Durch die Isolation und Expression der gesuchten Gene in Modellorganismen können im Gegensatz dazu nicht nur allgemeine (Pgp-Inhibitoren) oder korrelative Hinweise (mRNA-Quantifizierung) auf die funktionelle Beteiligung von Pgps an diversen transmembranalen Transportaktivitäten gefunden, sondern direkt eine Interaktion potentieller Substrate mit spezifischen Pgp-Isotypen auf Proteinebene untersucht werden. Dafür sind jedoch zeit- und arbeitsintensive Genidentifizierungen notwendig. Durch die erstmals vollständige Sequenzierung der 4 Pgp-Isotypen in Cyathostominen konnte in der vorliegenden Arbeit für eines dieser Proteine Substratinteraktionen durch heterologe Expression ermittelt werden.

Humane Pgps und Pgp-Homologe aus dem Parasit Plasmodium falciparum sind bereits in einer Vielzahl von Expressionssystemen untersucht worden. Dazu zählen Säugetier- und Insektenzellen, Xenopus laevis-Oozyten und auch S. cerevisiae (Sanchez et al., 2008; van Es et al., 1994; Volkman et al., 1995). Die Wahl eines geeigneten Modellorganismus hängt dabei von unterschiedlichen Faktoren ab, wie den Ansprüchen an die Erzeugung und Kultivierung, den Transformations- bzw. Transfektionsmethoden und dem Untersuchungsziel. Die Bäckerhefe Saccharomyces ist ein genetisch vollständig identifizierter Organismus, der bereits seit mehreren Jahrzehnten in der funktionellen Untersuchung von Proteinen verwendet wird (Goffeau et al., 1996). Die Kultivierung und Vermehrung sind einfach und auch kostengünstig durchzuführen, was einen Vorteil gegenüber den anderen Modellsystemen darstellt (Sarramegna et al., 2003). Da es sich um eukaryotische Zellen handelt, sind sie besonders geeignet für die heterologe Expression eukaryotischer Proteine. Ein weiterer Vorteil ist die einfache genetische Manipulation mit Hilfe von unterschiedlichen, kommerziell erhältlichen oder frei verfügbaren Plasmidvektoren, die eine Selektion erfolgreich transformierter Hefezellen als auch die Regulation der Expression erlauben (Sarramegna et al., 2003). Auf Grund dieser positiven Eigenschaften wurden zwei Hefestämme in der vorliegenden Arbeit verwendet:

- 1. JRY8012 mit einer Deletion von 3 endogenen ABC-Transportern
- 2. AD1-7 mit einer Deletion von 7 endogenen ABC-Transportern

In beiden Hefelinien sind eine unterschiedliche Anzahl endogener Transmembrantransporter nicht funktionsfähig (Jeong et al., 2007; Rogers et al., 2001). Die durch den *knock-out* bedingte hohe Ausgangssensitivität dieser Hefestämme prädestiniert sie für Untersuchungen von heterolog-exprimierten ABC-Transportern (Niimi et al., 2005). Die Modifikation für die Expression im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* gelang sowohl für die vollständige cDNA-Sequenz von *Ceg*Pgp-3, als auch von *Ceg*Pgp-9. Während im 5'-Bereich eine hefespezifische Kozak-Sequenz angefügt wurde, führte die mutagene PCR im 3'-Bereich zur Amplifizierung der cDNA mit und ohne Stopcodon. In beiden Sequenzen konnten jeweils 3 Basen der 5'-UTR in unmittelbarer Nähe zum Startkodon ersetzt werden. Dadurch wurde eine hohe Anzahl an Adenin-Resten in den nicht translatierten Bereich eingefügt, was in anderen Untersuchungen die Translationseffizienz positiv beeinflusst hat (Hamilton et al., 1987). Zur Vermeidung von Aminosäureänderungen wurde die originäre Basenabfolge nach dem Startcodon belassen.

Die positiven Ergebnisse einer RT-PCR, bei der ein ca. 500 bp langes Fragment am 3'-Ende der Pgp-Sequenz amplifiziert wurde, bestätigen die Transkription in allen transformierten Hefezelllinien (5.2.1. Nachweis der Transkription der cDNA).

Der Versuch das Gesamtprotein zu isolieren und Pgps mit Hilfe eines Antikörpers in einem Western Blot zu identifizieren, blieb ohne Erfolg. Die Ursachen für diesen mangelnden Expressionsnachweis sind unbekannt. Seit seiner ersten Beschreibung 1985 wurde der verwendete Antikörper C 219 erfolgreich für die Detektion von humanen Pgps sowie Pgps der Nagetiere eingesetzt (Kartner et al., 1985; van den Elsen et al., 1999). Dabei erfolgt die Bindung an ein intrazelluläres, zentrales Epitop der in Säugetieren und auch Nematoden hochkonservierten NBD (van den Elsen et al., 1999). Es ist daher unwahrscheinlich, dass der Antikörper auf Grund mangelnder Bindungsaffinität nicht zum Nachweis von Nematoden-Pgps geeignet ist. Darüber hinaus konnte die Expression des Kontrollplasmids in JRY8012-Hefestamm mit Hilfe eines anti-V5 Antikörpers (anti-mouse V5 monoclonal antibody, Invitrogen) im Western Blot festgestellt werden, was gegen einen Fehler im methodischen Ablauf des Versuches spricht. Der gleiche Antikörper wurde auch zur Detektion des Pgps verwendet, das mit einem V5/6×Tag markiert worden ist. Auch hierfür konnte kein Signal im Western Blot nachgewiesen werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass der Anteil an Pgp am Gesamtprotein zu gering war und unterhalb der Nachweisgrenze lag. Eine Ursache der geringen Proteinmenge könnte die Expressionslokalisation sein. Verschiedene Studien fanden bei der heterologen Integration eines Pgps in S. cerevisiae einen hohen Anteil an funktionalem Protein in der Zellmembran (Kuchler und Thorner, 1992; Mao und Scarborough, 1997). Daher könnten spezielle Verfahren zur Anreicherung von Zellmembranen (Ort der höchsten Pgp-Expression) in der Proteinfraktion den Anteil an Pgp am Gesamtprotein erhöhen und den Nachweis im Western Blot ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde auf Grund der Untersuchung durch FACS die Proteinisolation und das Western Blot-Verfahren nicht weiter modifiziert. Die Analyse der transformierten Hefen in diesem bereits etablierten FACS-System (Kerboeuf et al., 1999) bestätigte die Expression in einem variierenden Populationsanteil für alle Hefezelllinien mit Ausnahme von JRY8012 mit *Ceg*Pgp-3. Die Analyse von JRY8012 transformiert mit *Ceg*Pgp-3 ergab keine spezifische Bindung des Pgp-Antikörpers (UIC-2). Stattdessen konnte für AD1-7, transformiert mit *Ceg*Pgp-3, eine geringe Expression in max. 3 % der Zellen nachgewiesen werden. Die Expressionsraten variierten sowohl zwischen den Pgp-Isotypen, als auch den Hefestämmen. Sie war mit annähernd 20 % am höchsten für *Ceg*Pgp-9 in AD1-7. Damit wurden erstmals erfolgreich Pgps aus Nematoden in *S. cerevisiae* exprimiert.

Hefen wie *S. cerevisiae* und *P. pastoris* werden unter anderem auch für die "Pgp-Produktion" verwendet. Dabei können hohe Menge an heterologem Protein durch die Zellen synthetisiert und anschließend aufgereinigt werden (Cai und Gros, 2003; Figler et al., 2000). Die insgesamt niedrigen Expressionsraten in den verwendeten Stämmen dieser Arbeit können verschiedene Ursachen haben:

1. Bestimmte Pgp-Substrate besitzen die Fähigkeit die Bindung des Antikörpers UIC-2 an einen extrazellulären Teil des Proteins zu steigern, bedingt durch die Aktivierung der Transportaktivität (Mechetner et al., 1997). Die FACS-Analyse der Hefezellen wurde ohne die Zugabe von Substraten durchgeführt, demnach wurde eventuell das tatsächliche Vorkommen von zum Teil nicht aktiven Pgps innerhalb der Population auf Grund der gemessenen Expressionsraten unterschätzt. Die nachgewiesenen Expressionraten zeigen also den Anteil an Pgps, die durch den Transport endogener Substrate aktiv waren. Eine Wiederholung der Untersuchung mit bekannten Pgp-Substraten wäre sinnvoll. Chemiluminescence-basierte Versuche zeigten bereits eine gesteigerte Bindung des UIC-2-Antikörpers in Gegenwart von unterschiedlichen, potentiellen Pgp-Substraten wie Daunorubicin, MOX, IVM, KCON (Kaschny et al., 2015). Diese Ergebnisse unterstützen damit die Annahme, dass der Anteil an aktivem Pgp in den Hefezellen durch die Zugabe von Substraten deutlich gesteigert werden kann. Für diese Arbeit wurden die Analysen auf Grund zeitlicher Limitierung und eindeutiger funktioneller Ergebnisse nicht wiederholt. Hinzu kam, dass die Arbeitsgruppe in Tour, bei der diese Arbeiten durchgeführt worden waren, inzwischen aufgelöst wurde.

2. Beim Vergleich von über 100 hefeeigenen Genen fanden Sharp et al. (1986), dass bestimmte Codons bevorzugt in hoch-exprimierten Genen verwendet wurden. Da jeweils zwischen ein und sechs Codons für die gleiche Aminosäure kodieren können, kann eine Anpassung der Sequenz an eben jene bevorzugten Basentriplets zur Expressionssteigerung des Gens führen. Diese Codon-Optimierung wird bereits von einigen biotechnologischen Firmen angeboten, aber für große cDNAs wie bei Pgps ist sie noch mit hohen Kosten verbunden, so dass in dieser Studie auf die Codonoptimierung verzichtet wurde. Sie wurde jedoch erfolgreich in der Hefe *P. pastoris* angewendet und stellt eine Möglichkeit für die zukünftige Optimierung des Untersuchungssystems dar (Cai und Gros, 2003).

3. Die Verwendung von Glycerin als chemisches Chaperon kann die korrekte Faltung der komplexen Pgps positiv beeinflussen und dadurch zu einer erhöhten Expression von funktionalem Protein führen (Figler et al., 2000; Lee und Altenberg, 2003). Der Nachweis von exprimiertem Pgp erfolgte in dieser Arbeit durch eine FACS-Analyse, doch könnte eine Kombination aus geeignetem chemischen Chaperon mit einer Anreicherung der Zellmembranbestandteile eine Detektion im Western Blot für weitere Studien ermöglichen.

Eine weitere Auffälligkeit des FACS war die Identifizierung von zwei Zellpopulationen unterschiedlicher Größe und Pgp-Expression innerhalb einer Zellsuspension. In allen Fällen wurde für die "größeren" Zellen eine im Vergleich höhere Expressionsrate festgestellt. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Zellgröße und der Expression von Transmembrantransportern. Eine genauere Untersuchung der Ursache sollte im Rahmen weiterer Arbeiten erfolgen.

6.3. Etablierung des S. cerevisiae-Wachstumsassays

Nach der Expression von *Ceg*Pgp-3 und Pgp-9 war das Ziel dieser Arbeit die Etablierung eines Testverfahrens, um die Interaktion von Anthelminthika, aber auch von fungiziden Wirkstoffen mit den heterolog-exprimierten Transportproteinen zu untersuchen. Dafür sollte ein Screening entwickelt werden, das zeit- und kostengünstig den Nachweis Pgp-induzierter Änderungen der Empfindlichkeit gegenüber Wirkstoffen wie z.B. KCON und TBZ ermöglicht. In der Literatur finden sich verschiedene Assaymethoden, deren Unterschiede besonders in der Art der Kultivierung, der Inkubationszeit und der Auswertung liegen. Das angestrebte Testverfahren für die funktionelle Charakterisierung von Pgps sollte folgende Eigenschaften besitzen:

- 1. Ein hoher Probendurchsatz durch die Kultivierung in einer 96-Well-Platte
- 2. Quantifizierung des Hefewachstums durch die Messung der optischen Dichte (OD), um ein automatisiertes Verfahren in einem optischen Lesegerät zu ermöglichen
- 3. Variabel einsetzbar für die Testung unterschiedlicher Substanzen
- 4. Eine gute Reproduzierbarkeit

Im Vergleich zur Untersuchung von Wachstumsänderungen bestimmter Hefezellen in Festkultur (Agarplatten) ist nach Toussaint et al. (2006) die Kultivierung in Flüssigmedium

grundsätzlich besser geeignet. Die Ursache dafür liegt nach Ansicht der Autoren in der längeren Zeit (mehrere Stunden), die Hefezellen benötigen, um eine Kolonie auf Festagar zu formen. Währenddessen Reparaturkönnen zelleigene und Adaptationsprozesse Wachstumsunterschiede ausgleichen. Über kinetische Messungen in Flüssigkulturen erfolgt hingegen ein direkter Nachweis wachstumsmindernder Effekte. Zusätzlich kann nur für Verfahren, die auf der wiederholten Messung der OD als Wachstumsparameter basieren, ein automatisiertes Protokoll in optischen Lesegeräten entwickelt werden. Mehrere Untersuchungen zeigen, dass eine Kultivierung in kleinen Probenvolumina vergleichbare Ergebnisse wie eine sog. Makrokultivierung (Probenvolumen 10 ml) erbringt und aus diesem Grund auch für Empfindlichkeitstests gegenüber Antimykotika und anderen potentiell toxischen Substanzen empfohlen werden kann (Espinel-Ingroff et al., 1992; Papaefthimiou et al., 2004; Warringer und Blomberg, 2003). Warringer und Blomberg (2003) fanden bei der Anzüchtung von Hefen in 350 µl Medium einen Einfluss auf die Expression von Proteinen, die im Zusammenhang mit einer generellen Stressantwort der Zelle stehen. Genauso wie die allgemein niedrigeren max. OD-Werte erklärten sie diese Effekte mit einer moderaten Limitierung des Sauerstoffes bedingt durch die Art der Kultivierung. Ein Einfluss auf weitere Wachstumsparameter blieb jedoch aus. Die Anwendbarkeit war demnach gegenüber der Makrokultivierung nicht eingeschränkt. Von entscheidender Bedeutung bei dieser Form der Anzüchtung ist neben dem Probenvolumen auch die Anzahl der inokulierten Zellen. Teilweise wird dafür die Zelldichte durch die Messung der OD bestimmt und entsprechende Werte als geeignet angegeben (meist OD₆₀₀ oder OD₆₆₀: 0,05-0,1) (Papaefthimiou et al., 2004; Toussaint und Conconi, 2006; Warringer und Blomberg, 2003). Es ist allerdings bekannt, dass unterschiedliche Hefestämme veränderte Wachstumseigenschaften besitzen und sich in der Größe und Teilungsrate voneinander unterscheiden können (Toussaint und Conconi, 2006). Aus diesem Grund empfehlen Toussaint und Conconi (2006) Vorversuche zur Ermittlung der Korrelation zwischen Verdopplungszeit und optischer Dichte für alle verwendeten Hefestämme. Für JRY8012 und AD1-7 konnte in der vorliegenden Arbeit keine einheitliche Übereinstimmung zwischen Verdopplungszeit und OD₆₀₀ festgestellt werden, wobei nur ein Vorversuch durchgeführt worden ist. Da die Möglichkeit bestand, dass durch die induzierte Expression der ca. 140 kDa-großen Pgps veränderte Wachstumsraten ausgelöst werden, wurde die Zellzahl der Hefekultur für jeden Versuch durch eine Zellzählung (Neubauer Zählkammer) bestimmt. Für die kinetische Analyse der Hefen wurde in der vorliegenden Studie das Protokoll des Hefewachstumsassays von Toussaint und Conconi (2006) angewendet und dem eigenen Untersuchungsziel angepasst. Statt den Einfluss DNA-schädigender Toxine und radioaktiver Strahlung zu quantifizieren, sollte in der vorliegenden Studie die Empfindlichkeit der Hefezellen gegenüber TBZ und KCON festgestellt werden. Insbesondere ging es dabei um den Vergleich zwischen Pgp-exprimierenden und Kontrollstämmen. Die Kultivierung der Zellen, sowie die Vorbereitung der Platte erfolgten in Anlehnung an das oben genannte Protokoll. Bei der Analyse der Wachstumsdaten sind auf Grund der vorhandenen Software-Programme unterschiedliche, statistische Berechnungen durchgeführt worden.

Beide Stämme eigneten sich grundsätzlich für die Anzüchtung im 96-Well-Format und zeigten ein stabiles Wachstum. Dabei erreichten alle JRY8012 Hefen (Kontrolle und Transformanten) höhere OD₆₀₀-Werte als AD1-7 Hefezellen. Ein Zusammenhang mit der geringeren Anzahl an knock-outs von ABC-Transportern in diesem Stamm ist möglich und wahrscheinlich. Besonders die Doppeldeletion von zwei spezifischen ABC-Transporter (pdr5 und sng2), die eine wichtige Bedeutung im Export toxischer Metabolite während der Wachstumsphase haben, ist sehr wahrscheinlich ein Grund für das schwächere Wachstum mit einer längeren Verdopplungszeit von AD1-7 (Prasad und Goffeau, 2012). Allerdings führte die Untersuchung der wachstumsstabilen JRY8012-Stämme mit und ohne Pgp-Expression nicht zum Nachweis einer veränderten Wirkstoffempfindlichkeit. Im Zusammenhang mit der niedrigen Pgp-Expression, die im FACS festgestellt wurde, ist das Ergebnis nicht überraschend. Dazu besteht die Möglichkeit, dass vorhandene ABC-Transporter im Kontrollstamm die Expressionseffekte des heterologen Pgps ausgleichen und Unterschiede im Resistenzstatus kaschieren. Wie das humane Pgp besitzen auch hefeeigene ABC-Transporter die Fähigkeit eine große Bandbreite von Xenobiotica zu exportieren und tragen dadurch zur Entstehung von Resistenzen bei (Sipos und Kuchler, 2006). Aus diesem Grund wurden weitere Versuche mit AD1-7-Hefezellen durchgeführt, bei denen auf Grund der höheren Anzahl an ABC-Transporter-knock-outs ein geringer background durch vorhandene ABC-Transporter zu erwarten war. Ein sehr ähnlicher Stamm wurde bereits erfolgreich für die heterologe Expression von Pgps aus Pilzen verwendet (Niimi et al., 2005). Das Assay bietet somit erstmals die Möglichkeit zur schnellen und direkten Prüfung von Wirkstoffinteraktionen mit Nematoden-Pgps auf Proteinebene ohne einen hohen finanziellen Aufwand.

6.4. Wachstumsergebnisse

Für TBZ, ein Anthelminthikum, das auch antimykotische Wirksamkeit besitzt, wurde eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Hefen nachgewiesen. Dabei zeigte sich allerdings kein Pgp-abhängiger Unterschied zwischen den transformierten Stämmen, was gegen eine Interaktion des Wirkstoffes mit den heterologen Transmembrantransportern spricht. Ähnliche Beobachtungen machten Kerboeuf und Guegnard (2011) bei der Untersuchung der Efflux-Aktivität von Pgps in *H. contortus*. Sowohl TBZ, als auch andere BZ-Derivate wurden dabei nicht als Pgp-Substrate in Nematoden identifiziert. Jedoch fanden AlGusbi et al. (2014) einen deutlichen Einfluss des Pgp-Inhibitors Verapamil auf die entwicklungshemmenden Wirkung von TBZ in *C. oncophora* und *O. ostertagi*-Larven. Im Versuch führte die Kombination aus dem Pgp-Inhibitor und TBZ in den niedrigsten verwendeten Konzentrationen bereits zum vollständigen Sistieren der Larvenentwicklung im Rahmen eines EHA. Auch für hefeeigene ABC-Transporter konnten erhöhte TBZ-Resistenzen bei Stämmen mit einer Überexpression diverser Transporter festgestellt werden (Prasad und Goffeau, 2012).

KCON ist ein Imidazolderivat, dessen fungistatische Wirkung auf der Inhibition der Lanosterin-Demethylase (CyP51A1) und damit der Ergosterolsynthese beruht (Borgers et al., 1983). In der humanpathogenen Hefe Candida albicans führte ein vermehrter Pgp-vermittelter Efflux von Fluconazol zur Azolresistenz (Ghannoum und Rice, 1999; Lupetti et al., 2002). Ein knock-out verschiedener ABC-Transporter erhöhte wiederum die Azol-Empfindlichkeit in S. cerevisiae (Kolaczkowska et al., 2008). In den vorliegenden Untersuchungen wurde für den Hefestamm AD1-7 mit Expression von CegPgp-9 eine deutlich höhere Toleranz gegenüber KCON im Vergleich zum Kontrollstamm festgestellt. Während AD1-7 mit LacZ-Expression nur bis zu einer Konzentration von $0,18 \,\mu\text{M}$ ein uneingeschränktes Wachstum zeigte, tolerierte derselbe Stamm mit CegPgp-9-Expression max. 0,73 µM. In humanen Zellen wird KCON häufig als Pgp-Inhibitor klassifiziert und wurde daher als Kombinationstherapie zur Überwindung Pgp-vermittelter Resistenz in Tumorzellen vorgeschlagen (Floren et al., 1997; Takano et al., 1998). Auch in Ratten beobachteten Salphati und Benet (1998) einen schnelleren Anstieg der Plasmakonzentration von Digoxin in Anwesenheit von KCON, was sie mit einer Hemmung der Effluxtransporter in intestinalen Zellen erklärten. Die Änderung der Wirkstoffkonzentration im Plasma, die in diesen Studien gemessen worden ist, muss jedoch nicht durch eine tatsächliche Inhibition der Transportaktivität bedingt sein. Möglicherweise stellt KCON ebenso ein Substrat dieser Pgps dar und führt durch eine höhere, konzentrationsabhängige Affinität zur Blockierung der Substratbindungsstelle des Transporters. Dafür sprechen die Ergebnisse einer Untersuchung zur Distribution von KCON und Triazolam an der Blut-Hirn-Schranke in Mäusen. MDR1-defiziente Mäuse zeigten eine höhere KCON-Akkumulation im Gehirn als ihre Kontrolltiere, was sehr wahrscheinlich mit einem Pgp-vermittelten Export des Wirkstoffes in gesundes Tieren zusammenhängt (von Moltke et al., 2004). Die Untersuchung in einem hefebasierten Assay hat den Vorteil, dass der wachstumsmindernde Effekt von KCON direkt und nicht über Effluxhemmung diverser Pgp-Substrate beobachtet werden kann. Die Ergebnisse im Hefewachstumassay deuten erstmals auf einen Export von KCON durch ein Pgp der kleinen Strongyliden. Der Mechanismus vermittelt dabei effektiv eine deutlich erhöhte Toleranz gegenüber dem Fungizid.

ML stellen die wichtigsten Anthelminthika zur Behandlung der kleinen Strongyliden dar. Der Nachweis eines Pgp-vermittelten Transports von ML ist daher von besonderer Bedeutung. Die Untersuchung einer Interaktion auf Proteinebene mit Nematoden-Pgps war ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit. Im Gegensatz zu TBZ ist für diese Wirkstoffklasse kein wachstumsmindernder Effekt in S. cerevisiae bekannt. Daher ist nur ein indirekter Nachweis des potentiellen ML-Transportes möglich. Die Idee der kompetitiven Hemmung des KCON-Exports durch gleichzeitige Zugabe von ML entspricht im Prinzip den üblichen Transport-Assays mit Verwendung von z.B. fluoreszierenden Pgp-Substraten (Rhodamin 3G, Rhodamin 123). Während eine kompetitive Hemmung des Verapamil-Transportes für KCON nachgewiesen werden konnte, existieren bisher keine Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen KCON und ML (Döppenschmitt et al., 1998). Gemäß der Annahme eines kompetitiven Zusammenhangs zwischen diesen Wirkstoffen müsste bei steigender Konzentration der ML die KCON-Wirkung verstärkt werden. Im Versuchsaufbau wurde daher die Wirkung einer konstanten und nicht wachstumsmindernden KCON-Konzentration (0,73 für AD1-7 mit CegPgp-9 und 0,18 µM für AD1-7 mit LacZ) mit steigenden ML-Konzentrationen verglichen. Da keine Erfahrung hinsichtlich eines toxischen Einflusses von IVM, EPM und MOX auf S. cerevisiae bestand, wurden alle Wirkstoffe im gleichen Versuch auch ohne KCON-Zusatz untersucht. Interessanterweise konnte für IVM und besonders für EPM ein negativer Einfluss auf das Hefewachstum beobachtet werden. Im Fall von IVM reduzierte sich das Wachstum um > 20 % bei 2,94 μ M und 4,4 μ M IVM in AD1-7 CegPgp-9. Bei 5,87 μ M IVM war es sogar um fast 50 % verringert im Vergleich zur Kontrolle. EPM führte ab einer Konzentration von 0,73 µM zu Einschränkung des Wachstums, wobei dieser Effekt für 2,94 µM nicht statistisch signifikant war. MOX führte als einziges der getesteten ML nicht zu einer Wachstumsreduktion. Auch im Kontrollstamm (AD1-7 LacZ) war keine Beeinflussung der OD-Zunahmen festzustellen, was neben der unterschiedlichen Suszeptibilität der Stämme auch für die Konzentrationsabhängigkeit der ML-Wirkung spricht, da im Kontrollstamm nur max. 2,94 µM ML eingesetzt wurden. Verglichen mit der anthelminthischen Wirksamkeit, die bereits bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich eintritt, waren sehr hohe Konzentrationen nötig, um das Hefewachstum zu reduzieren. In der kurativen Praxis werden ML seit ihrer Einführung zur effektiven Behandlung einer Vielzahl unterschiedlicher parasitärer Erkrankungen angewendet (2.2.3. Makrozyklische Laktone). Weitere Untersuchungen belegen darüber hinaus eine antibakterielle Wirkung der Avermectin/Milbemycine gegen den Tuberkuloseerreger Mycobacterium tuberculosis und Chlamydia trachomatis (Lim et al., 2013; Pettengill et al., 2012), wobei die Wirkung, insbesondere von IVM, gegen Mycobakterien umstritten ist (Muhammed Ameen und Drancourt, 2013). Das breite Wirtspektrum der ML birgt aber auch Gefahren durch ökotoxikologische Einflüsse auf Nicht-Zielorganismen (Lumaret et al., 2012). Innerhalb der vorliegenden Untersuchung zeigte sich erstmals eine ML-induzierte Fungistase in S. cerevisiae. Eine ähnliche wachstumshemmende Wirkung zusammen mit additiven und synergistischen Interaktionen zwischen einem Milbemycin-Derivat und Fluconazol beobachteten Silva et al. (2013) in pathogenen C. albicans. In hohen Konzentrationen (3,2 μ g/ml \approx 32 mM) zeigten die verwendeten Milbemycin-Derviate eine wachstumshemmende Wirkung, die unabhängig von der Expression von ABC-Transportern war. Niedrige Wirkstoffkonzentrationen (0,1 μ g/ml \approx 1 mM) genügten zur Verstärkung der Fluconazol-Wirkung. Dabei bestätigten sich die Ergebnisse zusätzlich in in vivo Versuchen und begründen damit eine potentiell therapeutische Relevanz (Silva et al., 2013). Möglicherweise ist der beobachtete Einfluss auf das Hefewachstum aber auch methodenimmanent und bedingt durch die Mikrokultivierung mit Veränderungen im Stoffwechsel der Zellen (Warringer und Blomberg, 2003). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Wirkung von ML auf S. cerevisiae genauer zu analysieren.

Neben den direkten Effekten auf das Wachstum, zeigten die Untersuchungsergebnisse eine Interaktion der Wirkstoffe am Pgp. In allen Versuchen mit *Ceg*Pgp-9 reduzierte sich das rel. Wachstum bereits signifikant, wenn KCON und ML in einem molaren Verhältnis von 1:1 angewendet wurden. Es traten Wachstumsreduktionen von 54 % (IVM), 79 % (EPM) und 31 % (MOX) auf. Konzentrationsabhängig verursachte diese Kombination im Fall von EPM und IVM sogar einen völligen Wachstumsstillstand. Obwohl die Ausprägung der Effekte zwischen den ML variierte, führten alle zu einer signifikanten Potenzierung der KCON-Wirkung. Die Interaktion war für EPM am stärksten, gefolgt von IVM. Den geringsten Einfluss zeigte MOX. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit entsprechenden Angaben in der Literatur. Lespine et al. (2007) wiesen unter anderem für MOX und Selamectin nur eine geringe Interaktion mit humanem Pgp nach. Das führte zu der Annahme, dass die Integrität eines strukturverändernden Zuckerrestes am ML-Molekül, wie es bei IVM und EPM vorhandenen ist, für eine optimale Interaktion entscheidend ist (Lespine et al., 2007). Alle anderen untersuchten ML (EPM, IVM, Abamectin und Doramectin) korrelierten negativ mit dem Pgpvermittelten Rhodamin-Export (Lespine et al., 2007). Eine Arbeit von Wloch et al. (2009) zeigt einen ähnlichen, negativen Effekt von ML auf die Transportaktivität von Rhodamin und Calcein durch heterolog exprimiertes *H. contortus*-PGP-2. Dabei wurde im Vergleich der ML (IVM, Abamectin und MOX) für MOX eine deutlich geringere Ausprägung der Inhibition festgestellt. In Verbindung mit dem Expressionsmuster von PGP-2 in H. contortus (Pharynx, Intestinum und Nervensystem) ergibt sich gemäß dieser Studie ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen Pgp-Expression und Schutz vor der Aufnahme von ML (Kerr et al., 2010). Es ist jedoch anzunehmen, dass die Resistenz gegenüber den ML genauso wie ihre Wirkung über mehrere Rezeptoren und sich anschließende Wirkmechanismen vermittelt wird und dabei auch eine ausgeprägte Varianz in den Effekten zwischen den einzelnen ML besteht. Das bedeutet, dass nicht ausschließlich die Expression von Pgps für eine Resistenz in Nematoden verantwortlich wäre. Untersuchungen am Modelnematoden C. elegans bestätigen diese Hypothese und machen den unterschiedlichen Einfluss insbesondere von IVM und MOX auf die Pgp-Expression deutlich (Bygarski et al., 2014). Pgp-unabhängige Mechanismen, wie z.B. Metabolisierung über Zytochrom P450-Proteine (CyP450), können zusätzlich von Bedeutung sein. Bei in vivo Versuchen in Säugetieren zeigten sich ebenfalls ausgeprägte Unterschiede in der Pgp-Interaktion für ML (IVM, EPM und MOX) (Kiki-Mvouaka et al., 2010). Dabei wurden alle drei ML oral, subkutan und intravenös an Pgp-defiziente und nicht defiziente Mäuse verabreicht und anschließend die Konzentration im Plasma und im Gehirn sowie der Umfang der intestinalen Exkretion gemessen. Den Ergebnissen zufolge zeigte EPM die höchste Pgp-Affinität und gleichzeitig die niedrigste Lipophilizität. Absorption und Elimination sind daher in hohem Maße abhängig von der Pgp-Expression. MOX hingegen zeichnet sich durch eine hohe Lipophilizität aus zusammen mit einer geringeren Pgp-Affinität, die gewebespezifisch ausgeprägt ist (z.B. höher an der Blut-Hirn-Schranke). Absorption und Elimination sind weniger beeinflusst durch das Vorhandensein von Pgp-Transportern. Die Eigenschaften von IVM liegen intermediär zwischen EPM und MOX. Die Struktur der ML-Moleküle steht demnach im Zusammenhang mit einer spezifischen Pgp-Affinität und kann somit auch ihre Pharmakokinetik beeinflussen (Kiki-Mvouaka et al., 2010).

Als Kontrolle der Spezifität der Untersuchungsergebnisse wurde der gleiche Versuchsaufbau auch mit dem Hefestamm AD1-7 LacZ durchgeführt. In der Annahme eines ML-Exports durch das heterolog-exprimierte Pgp-9 dürfte keine Beeinflussung der KCON-Wirkung in diesem Stamm auftreten. Bedingt durch die höhere Suszeptibilität der verwendeten Zellen wurden 0,18 μ M KCON als konstante Konzentration eingesetzt. Wie bereits erwähnt konnte in den verwendeten ML-Konzentrationen kein signifikanter Einfluss auf die OD-Zunahmen beobachtet werden. Das mag zum einen konzentrationsbedingt sein, zum anderen

ebenfalls im Zusammenhang mit der fehlenden Expression von CegPgp-9 stehen. In der Kombination aus 0,18 µM mit steigenden Molaritäten von IVM, EPM und MOX blieb das Hefewachstum im Kontrollstamm nicht völlig unbeeinflusst. Die Effekte traten jedoch erst bei einem deutlichen ML-Überschuss auf und waren wesentlich schwächer ausgeprägt. Für IVM fand bei einem Verhältnis von 1:8 von KCON zu ML eine signifikante Wachstumsreduktion statt. Im Fall von EPM war ein leichter Einfluss ab einem Verhältnis von 1:2 zu erkennen. In Fall von MOX war ein signifikanter Unterschied bei einem Verhältnis von 1:2 und 1:8 bzw. 1:16 nachweisbar. Die Ausprägung war für alle ML in quantitativer Hinsicht deutlich schwächer als im CegPgp-9-exprimierenden Stamm. Dennoch fand eine Interaktion auch im Kontrollstamm statt. Ursächlich kommt ein ML-Efflux in Frage, der nicht durch das heterologexprimierte Pgp realisiert wird. Der knock-out im AD1-7 Stamm umfasst sieben wichtige ABC-Transporter im Hefegenom. Von insgesamt 31 ABC Proteinen in S. cerevisiae gehören neun zur Unterfamilie der Pleitropic drug resistance (PDR)-Proteine. PDR-Proteine besitzen wie MDR (Pgp) und *multidrug resistance proteins* (MRP) neben ihrer Rolle in der physiologischen Entgiftung die Fähigkeit durch den Export verschiedener Substrate Resistenzen oder Wirkstofftoleranzen zu vermitteln (Prasad und Goffeau, 2012). Dabei konnte auch eine Interaktion von ML mit PDR-Proteinen festgestellt werden (Cannon et al., 2009). Ein Export von ML durch endogene Transporterproteine im Kontrollstamm, ebenso wie im Pgp-9exprimierenden Stamm erscheint daher wahrscheinlich. Neben den Pgps gehören auch Zytochrom P450-Proteine zu den sog. xenobiotic-metabolising enzymes (XME). Allein in C. elegans wurden bisher 86 cyP450-codiernde Gene (teilweise putativ) nachgewiesen. Als Monooxygenasen, bzw. im geringeren Umfang Peroxidasen und Reduktasen, sind sie von entscheidender Bedeutung für zelluläre Entgiftungsprozesse (Matouskova et al., 2016). Ein Zusammenhang mit einer verstärkten Zytochrom-Expression und verringerter Wirkstoffsuszeptibilität ist bisher besonders in Insekten untersucht worden. Doch auch eine Beteiligung an anthelminthischer Resistenz wurde in den letzten Jahren verstärkt erforscht. KCON gilt dabei als potenter Inhibitor der CyP450-Proteine, was zentraler Bestandteil seiner fungistatischen Wirkung ist (Maurice et al., 1992). Ein Einfluss von KCON auf hefeeigene Zytochrome ist daher anzunehmen. Auch die Interaktion der ML im Kontrollstamm kann mit der enzymatischen Aktivität der CyP450-Proteine im Zusammenhang stehen. In diesem Fall würde es sich dann nicht um einen Export der ML, sondern um einen Metabolisierung handeln. Der Einfluss von Zytochrom-vermittelten Interaktionen wurde in dieser Studie nicht untersucht.

Eine weitere Frage stellt sich hinsichtlich des Charakters der Interaktion. Die Ergebnisse deuten auf einen kompetitive Verdrängung von KCON am Pgp durch steigende Konzentrationen von ML (Silva et al., 2013). Obwohl die Anzahl und Art der Bindungsstellen am Pgp bis heute diskutiert werden, konnten durch Substratinteraktionen zwei Bindungsstellen im humanen Pgp identifiziert werden (Sharom, 2011). Der Ligand Rhodamin 123 mit Bindung an der sog. R-Bindungsstelle und Hoechst 33342, das sich an der sog. H-Bindungsstelle anlagert, führen zu einer Transportaktivierung des jeweils anderen Substrats. Sie korrelieren positiv miteinander (Shapiro et al., 1999). Daraus ergeben sich drei Ligandenkategorien: Solche, die sich entweder an der R- oder der H-Bindungsstelle anlagern und Substrate, die sich an beiden Bindungsstellen anlagern können. Konkurrenz um dieselben Bindungsstelle am Pgp führt somit zur Inhibition (Sharom, 2011). Lugo und Sharom (2005) zeigen für ML einen negativen Einfluss auf den Rhodamin-Export. Daher wäre eine kompetitive Interaktion an der R-Bindungsstelle denkbar. Es könnte sich aber ebenso um eine nicht-kompetitive Interaktion durch z.B. Änderung der Bindungsaffinität auf Grund von Komplexbildung handeln, wie sie für Rhodamin 123 und LDS-751 angenommen wird. Im Gegensatz dazu finden Kerboeuf und Guegnard (2011) in Nematoden-Pgps einen stimulierenden Effekt von ML auf den Rhodamin-Export. Ursachen dafür können in der geringen Übereinstimmung von Pgp-Sequenzen zwischen Säugetier- und Nematoden-Pgps liegen. Auch Affinitätsunterschiede und andere Konzentrationen von ML im Mikroenvironment der Nematoden-Pgps werden als Faktoren für die unterschiedlichen Effekte der ML-Bindung an Säugetier- und Nematoden-Pgps diskutiert (Kerboeuf und Guegnard, 2011). Auf Grund seiner doppelt-inhibierenden Wirkung sowohl für den über H-, als auch über die R-Bindungsstelle vermittelten Substratexport wird für KCON zusätzlich eine zentrale Bindungsstelle (Bindungsstelle M) am Pgp vermutet (Rautio et al., 2006). Es ist nicht bekannt, ob KCON über diese Bindungsstelle exportiert werden kann oder an dieser Stelle mit weiteren Stoffen interagiert. Auch additive oder/und synergistische Interaktionen könnten die Ursache für die verstärkte Wachstumshemmung sein, die in der Kombination von ML und KCON festgestellt wurde. Wie bei Silva et al. (2013) beschrieben, kann der direkte Effekt, den ML auf die Hefezellen ausüben, in Verbindung mit KCON gesteigert sein. Der vorliegende Versuchsaufbau erlaubt darüber keine genaue Aussage.

7. Ausblick

Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen erstmals eine direkte Interaktion von unterschiedlichen ML mit einem Nematoden-Pgp auf Proteinebene. Funktionell konnte eine potentiell resistenz-assoziierte Aktivität des identifizierten CegPgp-9 nachgewiesen werden. Das etablierte Hefewachstumsassay stellt darüber hinaus für die Untersuchung weiterer Isotypen eine einfache und zuverlässige Methode dar, Transportaktivitäten zu analysieren. Dabei ist die Generierung funktioneller Daten nicht nur für Pgps kleiner Strongyliden von Interesse, sondern kann für eine große Bandbreite an (parasitischen) Helminthen angewendet werden. Der Nachweis einer Pgp-vermittelten Resistenz kann für die Entwicklung neuer pharmakologisch-wirksamer Substanzen oder modifizierter Therapieansätze bedeutsam sein. Ein weiterer wichtiger Punkt für die funktionelle Charaktersierung von Pgps sind zukünftige Untersuchungen zum Vorkommen von putativ mit ML-Resistenz assoziierten SNPs und ihrer Bedeutung für die Transportaktivität und Substratspezifität der Pgps. Ein derartiger Einfluss bestimmter Punktmutationen auf spezifische Pgps wurde in bereits veröffentlichten Studien gezeigt. Mit Hilfe des hier vorgestellten Assaysystems können verschiedene Genotypen von Pgps vergleichend analysiert werden. Neben einem Beitrag zum genaueren Verständnis von Pgp-vermittelten Resistenzen, können SNPs auch als Marker von Anthelminthikaresistenz in Parasitenpopulationen dienen. Dazu wäre aber der vorherige Nachweis, dass diese SNPs tatsächlich die Transporteigenschaften für Anthelminthika verändern, sehr wertvoll. Dazu ist der hier beschriebene Assay grundsätzlich geeignet. Ähnlich wie bereits für BZ könnten dann Nachweis von resistenzvermittelnden SNPs z.B. durch den mit Hilfe eines Pyrosequenzierungsverfahrens resistenz-assoziierte Pgp-Genotypen in Parasitenpopulationen bereits im Frühstadium der Resistenzentstehung festgestellt werden. Die frühzeitige Diagnose ist eine wichtige Voraussetzung für die nachhaltige Anwendung von Anthelminthika und die Entwicklung von Maßnahmen zu Verlangsamung der Entwicklung bzw. der Umkehr von Anthelminthischer Resistenz.

8. Anhang

8.1. Bekannte Pgp-Sequenzen von Cylicocyclus elongatus

8.1.1. CegPgp-3

>Cylicocyclus elongatus partial mRNA for p-glycoprotein 3 A NBD1.1 407 bp 5'AGCGGGTGTGGTAAGTCAACGATGATTGGGCTGCTGCTGCGGATTTTATGAAC AGGCTGGTGAAAGCTCTGGAGTAGTGGCTCTTGACGGTGTTCCACTTCGCGAATA TAACATCAGATGGCTGAGAAACGCTATTGGCGTCGTACAACAAGAACCTGTCATA TTCTCGGCTACTGTAGCGGAGAAACGCTATGGCGCGATGATACCTTGACAGACG AAGAGGTGGAAGGAAGCCTGTCGAATGTCCAATGCATTGGAGGTTTATCAAAAAGC TTGGCGACGGCTTCGACACTGTCATTGGTGAAGGTGCTGTGCAACTATCTGGTGG TGAAAAGCAACGCATTGCTCTTGCCCGAGCTCTGGTTCGCAAACCACAGATTCTC ATTCTGGACGAAGCTACCTCCGCCCT3'

>*Cylicocyclus elongatus* partial mRNA for p-glycoprotein 3 A NBD1.2 406 bp 5'CGGGGTGTGGGAAGTCGACGATGATCGGGGCTGCTGCCGCGATTTTATGAACA AGCTGGTGAAAAGCTCTGGAGTAGTGGCTCTTGACGGTGTTCCACTTCGCGAATAT AACATCAGATGGCTGAGAAACGCTATTGGCGTCGTACAACAAGAACCTGTCATAT TCTCGGCTACTGTAGCGGAGAAACGCTATTGGGCGATGATACCTTGACAGACGA AGAGGTGGAAGGAAGCCTGTCGAATGGCCAATGCATTGGAGTTTATCAAAAAGCT TGGCGACGGCTTCGACACTGTCATTGGTGAAGGTGCTGTGCAACTATCTGGTGGT GAAAAGCAACGCATTGCTCTTGCCCGAGCTCTGGTTCGCAAACCACAGATTCTCA TTCTGGACGAAGCCACCTCCGCCCT3'

>Cylicocyclus elongatus partial mRNA for p-glycoprotein 3 A NBD1.3 404 bp 5'GGGTGCGGGAAGTCCACGATGATTGGGCTGCTGCTGCGATTTTATGAACAGG CTGGTGAAAGCTCTGGAGTAGTGGCTCTTGACGGTGTTCCACTTCGCGAATATAA CATCAGATGGCTGAGAAACGCTATTGGCGTCGTACAACAAGAACCTGTCATATTC TCGGCTACTGTAGCGGAGAAACGCTGTCCGTATGGGCGATGATACCTTGACAGACGAA GAGGTGGAGGAAGCCTGTCGAATGTCCAATGCATTGGAGTTTATCAAAAAAGCTTG GCGACGGCTTCGACACTGTCATTGGTGAAGGTGCTGTGCAACTATCTGGTGGTGA

AAAGCAACGCATTGCTCTTGCCCGAGCTCTGGTTCGCAAACCACAGATTCTCATT CTGGACGAGGCCACCAGCGCCCT3'

>Cylicocyclus elongatus partial mRNA for p-glycoprotein 3 NBD1.1 398 bp 5'AGCGGGTGTGGCAAATCGACAATGGTCGGGGTTGCTGCTAAGATTTTATGAAC AAAGCGCCGGTGTTGTAGCCCTTGATGGTATACCACTTCGGGATTACAACATCAA ATGGCTGAGGAGCATCATAGGGGGTTGTCCAACAGGAACCAATCATTTTTTCTGCA ACGGTTGCGGAAAATGTCAGAATGGGAGACGACACGTTTTCAGAACGGAGACGTT GAGGAAGCCTGCCGAATGGCTAATGCTTTAGAGTTTATCAAAAAAGCTTAGCGAG GGTTTTGACACAGTCATAGGTGAAGGAGCTGTTCAACTTTCCGGTGGTCAAAAAC AACGCATCGCCATCGCTCGAGCGCTCATTCGACAGCCACAGATTCTACTATTAGA CGAGGCCACTTCCGCCTT3'

>Cylicocyclus elongatus partial mRNA for p-glycoprotein 3 NBD1.2 398 bp 5'AGCGGGTGTGGCAAGTCGACAATGGTGGGGGTTGCTGCTAAGATTTTATGAAC AAAGCGCCGGTATTGTAGCCCTTGATGGTATACCACTTCGGGATTACAACATCAA ATGGCTGAGGAGCATCATAGGGGGTTGTCCAACAGGAACCAATCATTTTTTCTGCA ACGGTTGCGGAAAATGTCAGAATGGGAGAGCGACACGTTTTCAGACGGAGACGTT GAGGAAGCCTGCCGAATGGCTAATGCTTTAGAGTTTATCAAAAAGCTTAGCGAG GGTTTTGACACAGTCATAGGTGAAGGAGCTGTTCAACTTTCCGGTGGTCAAAAAC AACGCATCGCCATCGCTCGAGCGCTCATTCGACAGCCACAGATTCTACTATTAGA CGAGGCCACAAGCGCCTT3'

>Cylicocyclus elongatus partial mRNA for p-glycoprotein 3 NBD2.1 268 bp BP: AJ577792.1

>*Cylicocyclus elongatus* partial mRNA for p-glycoprotein 3 NBD2.2 268 bp GB:AJ577792.1/AJ577791.1

122

8.1.2. CegPgp-9

>Cylicocyclus elongatus partial mRNA for p-glycoprotein 9 NBD2.2 404 bp 5'AGCGGGTGTGGGAAGTCGACGGTTGTATCCCTGTTGGAACGGCTATATGATC CATTAGATGGAGTTGTGGCTGTGGACGGTAACGACCTTCGTGAAATGAACCCGGT TCATCTGCGTTCTCACATCGCGCTGGTATCGCAAGAGCCAATCTTGTTTGATACTT CTATCAGGGACAATATCGTGTACGGGCTTCCAGCTGGTTCAGTGACGGAGTCTAT GATAATGGAAGTGGCCCAAAGAGCTAACATTCACAAGTTTATCAGCGAGCTGCC AGATGGTTACAACACAAGGGTCGGTGAGAAGGGGACTCAGCTTTCGGGAGGTCA AAAGCAACGAATTGCTATTGCTCGTGCACTCATTAGAAACCCTGAAATTCTTCTG CTTGATGAAGCCACGAGCGCCCT3'

8.2. Identifizierte Pgp-Sequenzen von Cylicocyclus elongatus

8.2.1. CegPgp-3

> Produkt 5'-RACE Cylicocyclus elongatus partial mRNA p-glycoprotein 3 647 bp 5'GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTGGAGGGGCAAAGGGAG AAATAGCCTTACTCTCCGTTGCTGTTTATTCTGTCACATATATACCAATTGCACTA ATCTACTGACAAGGATGAAGGCCGCACCTCTGGATAAAGTCAAATTCTCTAGACG TAAAAGAGCAATACCAACCGCTGGACTACTAGATGTGATGCGGAATGCCGATTG GAAGGATTATATGTTGCTATTTGGCGGAATTCAGCTCAGCATTCTCAACGGGGCC TTAGTGCCCTGCCAGTGCTATATTTTCCAAGGGATGTGCGATACCCTGATTAATGC GGAGCGTAACCAAACTTACGGTGAACTGGATATGGAGGACTTCTCTTCGAACGTT CTATATTACTGTAGTCTATATATTTACCTAGCTATCTTGCTTTTGTTGACTGGATAT CTCTCGAATGCTTGTATGTTCACAGTATGTGAGCGACGGATTCACTGCATTCGCA AGAAATTTCTGAAATCGGTTATGCGGCAAGATATGGCAGGGATTCACTGCATCACA AATAGGAGCTCTCACAGATAAAATGAGCAGTGAAGTAGAGCGGATAAAGGATGG AATTGGCGATAAGTTGGGAGTACTGTTTTCAGCACAAGGAAGTTTCATTGCTGGC ATAGCGATAAGTTGGGAGTACTGGTG3'

GCCACAGTTGTTTCGACGAAGATCATCTCAAGAGCTGCCAAATCCAAATCTTATG CCCAATCAACAGCTGGTGGTATCGCCAACGAAGTAATCGCCGGAATACGGAC3'

>*Cylicocyclus elongatus* partial mRNA p-glycoprotein 3 F1 288 bp 5'AAAATGAGCAGTGGAATTGAGAGAGAATTAAGGATGGTATCGGAGAGAAAGCTG GGAGTACTGTTTTCAGCACAAGGAAGTTTCATTGCTGGCATAGCGATAGGTTTCT ACCTGAGTGCGAAGAATACGATGCTGATGATATTTGCGGTACCAGCACTTCTCGG GGCCACAATTGTTTCGACGAAGATCATCTCAAGAGCTGCCAAATCCAAATCTTAT GCCCAATCAACAGCTGGTGGTATCGCCAACGAAGTAATCGCCGGAATCAGAACA GTTATGGCATTTAATGCAC3'

>Cylicocyclus elongatus mRNA p-glycoprotein 3 3924 bp

5'AGCCTTACTCCGTTGCTGTTTATTCTGTCACATATATACCAATTGCACTAAT CTACTGACAAGGATGAAGGCCGCACCTCTGGATAAAGTCAAATTCTCTAAACGTA AAAGAGCAATACCAACCGCTGGACTACTAGATGTGATGCGGAATGCCGATTGGA AGGATTATATGTTGCTATTTGGCGGAATTCAGCTCAGCATTCTCAACGGGGCCTT AGTGCCCTGCCAGTGCTATATTTTCCAAGGGATGTGCGATACCCTGATTAATGCG GAGCGTAACCAAACTTACGGTGAATTGGATATGGAGGACTTCTCTTCGAACGTTC TATATTACTGTAGTCTATATATTTACCTAGCTATCTTGCTTTTGTTGACTGGATATC TCTCGAATGCTTGTATGTTCACAGTATGTGAGCGACGGATTCACTGCATTCGCAA GAAATTTCTAAAATCGGTTATGCGGCAAGATATGGCATGGTTTGACACTCAACAA ATAGGAGCTCTCACAGATAAAATGAGCAGTGGAGTAGAGCGGATAAAGGATGGA ATTGGCGATAAGTTGGGAGTACTGTTTTCAGCACAAGGAAGTTTCATTGCTGGCA TAGCGATAGGTTTCTACCTGAGTGCGAAGAATACGATGCTGATGATATTTGCGGT ACCAGCACTTCTCGGGGGCCACAATTGTTTCGACGAAGATCATCTCAAGAGCTGCC AAATCCAAATCTTATGCCCAATCAACAGCTGGTGGTATCGCCAACGAAGTCATTT CTGGAATTCGTACTGTCATGGCATTCAATGCACAGCCGTCAGAAATTCATCGATA CGAAAAAGAGTTGAGATTAGCGAGAAATCTCGGCATACACGAAGGTCTGGTTTT GAGCGGCTTTGCAGGATTGAACGCTTTTCTAACTTTTGCTGTTATGGCGATTTCCT TCTGGTATGGAACATCTCTTGTTGTGGACGAAGAAATCACCCCAGGAACGGTCGT GGCTGTTTTCTGGGCAGTGCTGATCGGTACTCGACGTTTGGGAGATGCTATTCCA CAAATGGGAGCGATTATCGGCGCGCAACTTGCGGCTGCTGATATATTTGCTGTCA TTAATAGAGTGCCAGACATTGACAGCACAAAGACGGAAGGCTTTACTCCAGAGA AAATCACGGGAAAGCTGAGCTTCACCAATGTTAATTTTTCATATCCATCGCGCCC

AGATGTGAAAGTTCTCAAGGATGTTAGCTACGAGGTGAATCCGGGTGAAACAGT AGCGTTGGTAGGACATTCTGGATGCGGTAAATCGACGATGATCGGGCTGCTGCTG CGATTTTATGAACAGGCTGGTGAAAGCTCTGGAGTAGTGGCTCTTGACGGTGTTC CACTTCGCGAATACAACATCAGATGGCTGAGAAACGCTATTGGCGTCGTACAACA AGAACCTGTCATATTCTCGGCTACTGTAGCGGAGAATGTCCGTATGGGCGATGAT ACCTTGACAGACGAAGAGGTGGAGGAAGCCTGTCGAATAGCCAATGCATTGGAG TTTATCAAAAAGCTTGGCGACGGCTTCGACACTGTCATTGGTGAAGGTGCTGTGC AACTGTCTGGTGGTGAAAAGCAACGCATTGCTCTTGCCCGAGCTCTGGTTCGCAA ACCACAGATTCTCATTCTGGACGAGGCTACCAGCGCGTTGGACACGGAGAGCGA ACGAGCAGTGCAAGAAGCGTTGAGCGTAGCCAAGAAAAATCGAACTACGATCTG CATCGCTCATAGACTGTCTACTATCAAGGAAGCAGACAAAATTATAGTATTCGAG GACGGTCGTATCGTCGAACAAGGAACTGATGATGAACTTATGGCAAAAGAAGAG GGAATCTACAAAGGGATGGTAAAGGCTCAAGAGATCGCTAAGGGCCAAGAAGAT ACTACCTTAGATGATGTTGAGCCAGTAGATATGCACAGAAGTGGATTCGCGGAA AAGTCACCTAATGCGGAAGAGGAAGCAAAATTACGAGCCAGAGATTCTGCGCGT CTTCGTCAAAGTATGCTGAGTGCATCGACGCAAGAGCCAGAATGGGAGGTTGAA AGCGCTCGTGAAGATATGACTGAGGAAGGCGCAGTGGAAGCCTCGTTGTTTGAC ATTTTTGAATATGCAAAGCCGGAACTTCCAATGGCTACATTAGCATTGGCAAATA CCGTAATCCGAGGACTAATCTGGCCTATTTTTGCAATCATTTACGGAAAACTGTTT CTACTGTTCTCCAGTCCAGATCTGGATACTGTAGCTGACGGAAGCACGACTAATT CGGCTTATTTCTTCGTGCTAGCCGTCGTAGCAGGTGCAGCCACATTTGTCTCTGGT TTCAAGAATCTTATGCGCCAAGACGCCTCCTATTTTGACAACCCAAAACACAATA CAGGAGCACTGACAGCCCGTTTGGCATCAGATGCACCCAACGTCCAAGCGGCTCT TGATCAACGATTTGCTGAGGTGATGCAAGGAGTCAGTGCACTCATTGCTGGTGTC ACTGTTGCTTTCTACTACGGATGGAATGTTGCGCCTATTGGACTAGCTTCGGCTAT AATGCTGGTTACTGCACAAATCACTGTCACACAATATTTGAAAGTTCGTGGACAA GAAGATATGGAAACAGCAGTGGAAGCAAGCAAGATAGTCACCGAGTCGATTGCA AACACCAAAACCATCCAAGCGCTGGGAAAAGAATGCTACATGTATCAGGCCTAC AAAGCTGCAGCACGAGAACCTCACAGGAGAGCAATAGTTAGAGGCTTGTGGCAA TCGCTGTCGTATGCATTGGCAAACTGCTTTGTTATGACAAATTTCGCTATCGTCTA TGCTTTCGGATTGTGGTTGGTCAGAAATGGTTGGAGCACTCCATTTACCGTTTTCC AGGTCATCGAAGCGCTGAACTTGTCGTCGTACAGTATGATGACTGCCGCATCCTA TCTTCCAGAATATATTCGTGCTAGAATCTCGGCCGGTGTGATGTTCACAATGATG
CGGGAACGACCAAAAATTGACAACATGGGACACCAGGGCGAGAAACCGGAAAT TAAAGGTGATATAGTTCTGAGAAATGTCTACTTCTCTTATCCAGCGCGAAGACGA GCGCTCATTTTGCAAGGTGTGGATATTGCTGCTAAGCATGGTCAGACTGTGGCTC TTGTCGGACCGAGTGGATGCGGAAAGAGTACTATAATTCAGCTGGTTGAACGATA CTATGACGCTCTATGCGGTTCTGTGACCATTGATAAATACGATGTCCGCGATCTA GCTATCCGTCATATGCGCGATAGCATGGCACTTGTGGGGGCAGGAACCAACTCTCT TCAACATGACCATTAGTGAAAAATATAATGTATGGAATGGAGCGGTGCACACAAG AGGAAGTTGAGCGCGCAGCCCGTTTTGCCAACATTCACGAGTTCATTATGTCATT ACCAGATGCCTATGACACGGTGGTTGGCACAAAAGGTGGACTGCTGTCAGGTGG TCAGAAGCAACGTATTGCGATCGCTCGGGGCTATTATCAGGGATCCAAAAATTCTA CTGCTAGATGAGGCAACAAGTGCGTTGGACTCTGGAAACGAAAAGGTTGTGCAA GAAGCTCTCGACAAAGCACGACAGGGTAGAACTTGTCTAGTGATTGCGCATCGTT TGTCAACAATACAGAATTCCGATGAGATAGTCGTCTGTCGGGACGGTCGCGTGAT TGAGAAAGGAACTCATCAAACACTGCTAGCTAGGAAGGGAATGTACTATAAGCT TGTAGAACGTCAGAATCATTAAGGAAGTCTCTACCACAGGGAGACACTTCGTAGC GAGTATATCAATACTCAGGGTACAGGATATGCACGG3'

>Cylicocyclus elongatus P-Glykoprotein 3 1262 As

MKAAPLDKVKFSKRKRAIPTAGLLDVMRNADWKDYMLLFGGIQLSILNGALVPC QCYIFQGMCDTLINAERNQTYGELDMEDFSSNVLYYCSLYIYLAILLLLTGYLSNAC MFTVCERRIHCIRKKFLKSVMRQDMAWFDTQQIGALTDKMSSGVERIKDGIGDKLG VLFSAQGSFIAGIAIGFYLSAKNTMLMIFAVPALLGATIVSTKIISRAAKSKSYAQSTAG GIANEVISGIRTVMAFNAOPSEIHRYEKELRLARNLGIHEGLVLSGFAGLNAFLTFAV MAISFWYGTSLVVDEEITPGTVVAVFWAVLIGTRRLGDAIPQMGAIIGAQLAAADIFA VINRVPDIDSTKTEGFTPEKITGKLSFTNVNFSYPSRPDVKVLKDVSYEVNPGETVALV GHSGCGKSTMIGLLLRFYEQAGESSGVVALDGVPLREYNIRWLRNAIGVVQQEPVIFS ATVAENVRMGDDTLTDEEVEEACRIANALEFIKKLGDGFDTVIGEGAVQLSGGEKQR IALARALVRKPQILILDEATSALDTESERAVQEALSVAKKNRTTICIAHRLSTIKEADKI IVFEDGRIVEQGTDDELMAKEEGIYKGMVKAQEIAKGQEDTTLDDVEPVDMHRSGF AEKSPNAEEEAKLRARDSARLRQSMLSASTQEPEWEVESAREDMTEEGAVEASLFDI FEYAKPELPMATLALANTVIRGLIWPIFAIIYGKLFLLFSSPDLDTVADGSTTNSAYFFV LAVVAGAATFVSGALYGITGEKMAMRLRMDVFKNLMRQDASYFDNPKHNTGALTA RLASDAPNVQAALDQRFAEVMQGVSALIAGVTVAFYYGWNVAPIGLASAIMLVTAQ ITVTQYLKVRGQEDMETAVEASKIVTESIANTKTIQALGKECYMYQAYKAAAREPHR

RAIVRGLWQSLSYALANCFVMTNFAIVYAFGLWLVRNGWSTPFTVFQVIEALNLSSY SMMTAASYLPEYIRARISAGVMFTMMRERPKIDNMGHQGEKPEIKGDIVLRNVYFSY PARRRALILQGVDIAAKHGQTVALVGPSGCGKSTIIQLVERYYDALCGSVTIDKYDVR DLAIRHMRDSMALVGQEPTLFNMTISENIMYGMERCTQEEVERAARFANIHEFIMSLP DAYDTVVGTKGGLLSGGQKQRIAIARAIIRDPKILLLDEATSALDSGNEKVVQEALDK ARQGRTCLVIAHRLSTIQNSDEIVVCRDGRVIEKGTHQTLLARKGMYYKLVERQNH

8.2.2. CegPgp-9

>Cylicocyclus elongatus partial mRNA p-glycoprotein 9 1045 bp F2

5'CTCACGCTGATCATGATGTCGCTTTCCCCATTCATGATCATTTGTGGAGCTTT CATCGCTAAGTTGATGGCATCGGCTGCCACAGAAGAGGGCGAAAAAATATGCTGT AGCTGGTGGAATTGCAGAAGAGGTGCTCACCTCAATGAGGACAGTCATTGCCTTC AATGGCCAACCGTACGAGTGCAAAAGATACGACGTTGCTTTGGCGGCTGGCAGA TCAACCGGCATAAAGAAGTCCTTGTACATTGGGCTTGGTCTTGCTCTAACCTTCAC CATAATGTTCTCATCATACTGTCTGGCTTTCTGGGTTGGAACGGATTTTGTCTACA AGGGCACGATGAAAGGAGGAACGGTCATGACGGTGTTCTTCCGGTATGATGG GTTCCATGGCACTCGGCCAAGCTGGACCACAGTTCGCTGTTCTCGGTACTGCTAT GGGAGCCGCCGGGATCCCTATACCAGATTATTGACAGGGAACCAGAGATTGACGC TTATTCAAAGGCTGGCATGAAGCCATCAAATCTCAAAGGAAGAATTTCCGTTTCG AGTGTGAAGTTCAGTTACCGGGCGAAACAATTGCTCTAGTCGGCTCCAGTGGTGCAG TAAAAGTACAATACAGTTACTGCTCCGATACTACGATCCAGCTGGTGGAAAG ATTTCTATAGATGGCATTGAGATCGATAAAATCAATATCGAGTATCTTAGAAATT ACATAGCTGTAGTGTCGCAAGAGCCTGTGCTTTTCAACACAACTATCGAGCAGAA TATTCGCTATGGACGTGAGGACATCACAGAAGCTGAAATTATAGCGGCTCTTCGC AAAGCAAACGCTTACAATTTCGTGCAGAGCTTCCCCGAAGGAATCAAGACCAAT GTTGGAGATCGCGGTACACAGATGTCTGGCGGACAAAAACAACGTATTGCTATA GCTCGTGCGCTTGTTCGAGATCCAAAAATTCTACTTCTTGATGAGGCCACCAGCG CTTTGG3'

>Produkt 5'-RACE Cylicocyclus elongatus partial mRNA p-glycoprotein 9 803 bp 5'GGTTTAATTACCCAAGTTGAGGTAGTCGCATAAATGGGACTGTTCAAAAAGA AAGAAGAAAAGGAGAAAACCAACAATTTCGACAGAAGGCAGCAAAGGACCAGAA GAGGAGGAGGAGGCACCGAAGGCGTCGATAGTTCAATTGTTTCGTTATGCATCG GGTTTCGACAAACTACTTCTGCTTCTCGGGTGCCTTGTTAGCATTGCAACGGGTGT TGGCATGCCCTTGATGTCAATTATTATGGGTAATGTGTCGCAAAACTTTATGGAC GTTACTGGTAACTACACTGATCCTAATCTAATCCACCAGTTTGAGCACGATGTCA TCCAAAATTGTTTGAAATATGTCTATTTGGGATGCGGTATATTCGCAGCGGCAAC GATACAGGCGATGTGTTTCCTGACTGTATGCGAAAATCTAGTGAATCAGCTGCGA AGAGAATTTTTCAAAGCTATTCTCCGGCAAGATATCACTTGGTATGATAAAAATA ACTCCGGAACTCTGGCACCGAAACTCTTCGATAACCTCGAGAGGGTAAAAGAAG GAACAGGAGACAAACTCGGATTGATGATACAGTTCGTTGCACAATTCTTTGGTGG ATTTATCGTTGCGTTCACGTACGATTGGAAGTTGACACTTATCATGATGTCACTTT CGCCATTTATGATCATTTGTGGAGCTTTCATCGCTAAGTTGATGGCCTCAGCTGCC ACAGAAGAAGCGAAAAAATATGCTGTAGCTGGTGGAATTGCAGAAGAAGTGCTC ACCTCAATGAGGACAGTCATTGCCTTCAATGGCCAACC3'

>Cylicocyclus elongatus mRNA p-glycoprotein 9 3939 bp

TTCTCCGGCAAGATATCACATGGTATGACAAAAATAACTCCGGAACTCTGGCACC GAAACTCTTCGATAACCTCGAGAGGGGTAAAAGAAGGGACAGGAGACAAACTCGG ATTGATGATACAGTTCGTTGCACAATTCTTTGGTGGATTTATCGTTGCGTTCACGT ACGATTGGAAGTTGACACTTATCATGATGTCGCTTTCCCCATTCATGATCATTTGT GGAGCTTTCATCGCTAAGTTGATGGCCTCAGCTGCAACAGAAGAAGCGAAAAAA TATGCTGTAGCTGGTGGAATTGCAGAAGAAGTGCTCACCTCAATGAGGACGGTCA TTGCCTTCAATGGCCAACCCTACGAGTGCGAAAGATACGACGTTGCTTTGGCGGC TGGCAGATCAACTGGCATAAAGAAGTCCTTGTACATTGGACTCGGTCTTGCTCTA ACCTTTACTATAATGTTCTCATCATACTGTTTGGCTTTCTGGGTTGGAACAGATTT TGTCTACAAGGGCACGATGAAAGGAGGAACGGTCATGACGGTGTTCTTCTCCGTC ATGATGGGTTCCATGGCACTCGGCCAAGCTGGGCCACAGTTCGCTGTTCTCGGTA CTGCTATGGGAGCCGCCGGATCTCTATACCAGATTATTGACCGGGAGCCAGAGAT TGACGCCTATTTAAAGGCTGGCATGAAGCCATCAAATCTCAAAGGAAGAATCTCC GTTTCTAGTGTAAAGTTCAGTTACCCAACTAGGCCTGACATACCAATCCTCAAGG GCATTTCGTTCGAAGCAAATCCGGGCGAAACGATTGCTCTAGTCGGCTCCAGTGG TTGTGGCAAAAGTACAATTATACAGTTACTGCTCCGATACTACGATCCAGCTGGT GGAAAGATTTCTATAGATGGCATTGAGATCGATAAAATCAATATCGAGTATCTTC GAAATTACATAGCTGTAGTGTCACAAGAACCTGTGCTTTTCAACACAACTATCGA GCAGAATATTCGCTACGGACGTGAGGACATCACAGAAGCTGAAATTATAGCGGC TCTTCGCAAAGCAAACGCTTACAATTTTGTGCAGAGCTTCCCCGAAGGAATCAAG ACCAATGTTGGAGATCGCGGTACACAGATGTCTGGCGGACAAAAACAACGTATT GCTATAGCTCGTGCGCTTGTTCGAGATCCAAAAATTCTACTTCTTGATGAGGCCA CCTCGCAAGGTCGCACCACCATCGTGATTGCTCATCGACTTTCCACCATCCGTAAT GCTGATAGGATTATCGCTATGAAGGATGGAGAAGTTATGGAAGTTGGTACTCATG ACGAGCTCATCGCTCGAAAAGGACTCTATCATGAACTAGTGAATGCTCAAGTCTT TGCTGATGTAGATGATGATATGGCAAAAGGAGCAGGAAAGAGAAAATCTGTTTC TTCACGACGATCGAGCACATCATCTATCGGTCATCCTGAATTGAGGCGCCTGAAG TCACAGCTATCCCAGGAAGTTGATAAAATTGAGCAAAGCGATCCCAAGAAAGCA AGCTAATCTCTTCAAAATTCTTCACTATGCTCGTCCCGAATGGGCTTTTATCTTTA TTGCCGTGCTTTCTGCGATAGTTCAAGGCTGCGTTTTTCCAGCATTTTCACTCTTCT TTACAGAAATTATCGAGGTTTTCGCCAGACCACCTGGTGATCCAAATCTTCAGTC GAGAGGTCATTTCTGGGCATTGATGTTCCTTCTCTTGGGCGGAGTGGAAGCAGTC

TGTATGATTACTCAGTGTTTCTTCTTTGGATTGTCAGCTGAGAGACTGACAATGCG ATGCCCGCCATTCGCCAGGAAAAATTACCACCCGTCTTGCTACTGATGCTCCAA ATGTAAAATCTGCAATCGACTATCGTTTCGGATCTGTTTTCAACTCATTCGTGTCC GTATGTTGTGGTATTGGTATCGCGTTCTACTTTGGATGGCAGATGGCGCTTTTGAC TATTGCAATATTCCCACTCGCTGGTGTTGCGCACGGTTTTCAAATGAGATTTATGT CTGGACGAGCTGGAGGTGATGCGAAAGAAATGGAGAATAGTGGAAAAGATTGCAA TGGAAGCCATCGAAAATATCAGAACTGTACAAGCTCTCACGTTAGAACATCGCCT TGCGGCTTCTTTCCGTTTTGGTCTATGGCTTATTCTCAATGGAGATATGATGCCAA TGAATGTTCTAAGGGTGCTCTTCGCCATCTCGTTCACCGCTGGAAGCCTGGGATTT GCCAGTGCCTACTTCCCCGAATACGTTAAAGCAACATTTGCAGCTGGTCTAATCT TTAACATGCTGAAAGATGAGCCGCGAATTGATGGAATGACTGATAAGGGCAAGA AACCGAAACTCACTGGATCTATCTCGCTCAAGAATGTCTTCTTCAATTACCCAGA AAGACCAAATGTACCCATTCTTCAAGGACTTGACGTTTCTGTACAACCGGGAGAA ACACTCGCTTTGGTTGGTCCCAGTGGATGCGGAAAGTCAACGGTTGTATCCCTCT TGGAACGGCTATATGATCCATTAGATGGAGTTGTGGCTGTGGACGGCAACGACCT TCGTGAAATGAACCCGACCCATCTACGCTCCCACATTGCGCTGGTGTCGCAAGAA CCAATCTTGTTTGATACTTCCATCAGGGACAACATCGTGTACGGCCTTCCAGCTG GTTCAGTGACAGAAGCTATGATTATGGAAGTGGCTCAGAGAGCTAACATTCACA AATTCATCAGCGAGCTGCCAGATGGTTTCAACACAAGGGTCGGGGGAAAAGGGAA CGCAACTTTCGGGAGGCCAAAAACAACGAATTGCCATTGCTCGTGCGCTCATCAG GAATCCTAAAATTCTTCTGCTTGATGAAGCCACAAGCGCTTTGGATACGGAAAGT GAAAAACTCGTCCAAGAAGCCCTGGACAAGGCTTCTAAGGGAAGGACCTGCATT GTTGTGGCACATCGATTATCTACGGTGGTCAATTGTAATTGTATAATGGTCGTGA AGTCCGGAAAGATTGTCGAGAAAGGTACCCACAATGAACTAATGCAAGCTAAAG GAGCATACTGGGCTCTCACGCAGAAACAGAATATTCACACCAACTGACTTTAGAT TAGTTTAGGCACTATGATCTCGATACGTGTAAGCAA3'

>Cylicocyclus elongatus P-Glykoprotein 9 1273 As

MGLFKKKEEKEKPTISTEGSKGSEEEEEAPKASIVQLFRYASGFDKLLLLLGCLVSI ATGVGMPLMSIIMGNVSQNFMDVTGNYTDPNLIHQFEHDVIQNCLKYVYLGCGIFAA ATIQAMCFLTVCENLVNQLRREFFKAILRQDITWYDKNNSGTLAPKLFDNLERVKEG TGDKLGLMIQFVAQFFGGFIVAFTYDWKLTLIMMSLSPFMIICGAFIAKLMASAATEE AKKYAVAGGIAEEVLTSMRTVIAFNGQPYECERYDVALAAGRSTGIKKSLYIGLGLA LTFTIMFSSYCLAFWVGTDFVYKGTMKGGTVMTVFFSVMMGSMALGQAGPQFAVL GTAMGAAGSLYQIIDREPEIDAYLKAGMKPSNLKGRISVSSVKFSYPTRPDIPILKGISF EANPGETIALVGSSGCGKSTIIQLLLRYYDPAGGKISIDGIEIDKINIEYLRNYIAVVSQE PVLFNTTIEQNIRYGREDITEAEIIAALRKANAYNFVQSFPEGIKTNVGDRGTQMSGGQ KQRIAIARALVRDPKILLLDEATSALDAESEHVVQQALENASQGRTTIVIAHRLSTIRN ADRIIAMKDGEVMEVGTHDELIARKGLYHELVNAQVFADVDDDMAKGAGKRKSVS SRRSSTSSIGHPELRRLKSQLSQEVDKIEQSDPKKAEKDLERLKKELEEEGAVKANLF KILHYARPEWAFIFIAVLSAIVQGCVFPAFSLFFTEIIEVFARPPGDPNLQSRGHFWALM FLLLGGVEAVCMITQCFFFGLSAERLTMRLRSKVFHNVMRMDAAYFDMPRHSPGKI TTRLATDAPNVKSAIDYRFGSVFNSFVSVCCGIGIAFYFGWQMALLTIAIFPLAGVAH GFQMRFMSGRAGGDAKEMENSGKIAMEAIENIRTVQALTLEHRLHHLFCQHLDGPH KTNKRRAIMQGGAYGFSSSIFFFLYAASFRFGLWLILNGDMMPMNVLRVLFAISFTA GSLGFASAYFPEYVKATFAAGLIFNMLKDEPRIDGMTDKGKKPKLTGSISLKNVFFNY PERPNVPILQGLDVSVQPGETLALVGPSGCGKSTVVSLLERLYDPLDGVVAVDGNDL REMNPTHLRSHIALVSQEPILFDTSIRDNIVYGLPAGSVTEAMIMEVAQRANIHKFISE LPDGFNTRVGEKGTQLSGGQKQRIAIARALIRNPKILLLDEATSALDTESEKLVQEAL DKASKGRTCIVVAHRLSTVVNCNCIMVVKSGKIVEKGTHNELMQAKGAYWALTQK **QNIHTN**

8.2.3. CinPgp-3

>Cylicocyclus insigne mRNA p-glycoprotein 3 3927 bp

5'AGCCTTACTCTCCGTTGCTGTTTATTCTGTCACATTTATACCATTCTGCACTAA TTTATCGGAAAAGATGAAGGCCGCACCTTTGGATAAAGTCCAATTTACCAAACGT AAGAGAACGATACCAACCGCTGGACTATTGGATGTGATGAGAAATGCTGATTGG AAGGATTATATGTTGCTCTTTGGCGGAATTCAACTCAGCATCCTCAACGGGGGCCC TAGTGCCCTGCCAGTGCTATATTTTCAAGGGATGTGCGATACTCTGATCAATGC GGAGCGTAATCAAACCTACAGTGAATTGGATATGGAGGACTTTTCTTCAAACGTT CTATATTACTGTAGTCTATACATCTACCTAGCTATCACACTTTGTTGACTGGATA TCTCTCGAATGCTTGTATGTTCACACTATGTGAGCGGCGCATTCACTGTATTCGCA AGAAGTTCCTGAAATCAGTCATGCGGCAAGATATGGCATGGTTTGACACTCAACA AATAGGAGCGCTCACAGATAAAATGAGCAGTGGAGTAGAGCGGTTGAAGGATGG ATAGCATTAGGTTTTTACCTGAGTGCAAAAAATACAATGCTGATGATATTTGCGG TACCAGCGCTTCTCGGAGCCACAATTGTTTCAACAAGATTATCTCAAGAGTTGC CAAATCTAAATCTTATGCCCAGTCAACAGCAGGAGGTATCGCCAACGAAGTAATT TCTGGAATTCGCACTGTCATGGCGTTTAATGCACAGCCGGCAGAAATTCATCGAT ATGAAAAAGAATTGAGATTGGCACGAAATCTTGGCATACATGAAGGTGTGGTTTT GAGCGGCTTTGCAGCATTGAACGCTTTTCTAACTTTCGCTGTCATGGCTATTTCAT TCTGGTATGGAACGTCTCTTGTTGTGGACGAAGAAATCACCCCAGGAACAGTTGT CGCTGTTTTCTGGGCAGTGCTGATCGGTACTCGACGTTTGGGAGATGCCATCCCA CAAATGGGAGCGATTATCAGTGCGCAACTTGCGGCTGCTGATATATTCACCATTA TCAATAGAGTGCCGGACATTGATAGCACGAGAACAGAAGGCTTTACTCCAGAAA AAATCACTGGAAAGCTTAGCTTCTCCAATGTTAATTTTTCCTATCCATCGCGACCT GATGTGAAAGTTCTGAAGGACGTCAGCTACGAGGTGAATCCGGGTGAAACTGTG GCTTTAGTAGGACATTCTGGATGCGGTAAATCCACGATGATTGGGCTGCTGCTGA GATTTTACGAGCAAACTTCCGAAAATTCTGGAGTAGTAGCTCTCGATGGTGTTCC ACTTCGCGAATATAACATCAAATGGCTGAGAAACGCCATTGGCGTAGTACAGCA AGAACCTGTTATATTCTCTGCTACGGTAGCGGAGAATGTACGAATGGGCGATGAT ACCATAACGGACGAAGAGGTGGAGGAAGCTTGTCGAATGGCTAATGCGTTGGAT TTCATCAAAAAGCTTGGCGATGGCTTCGATACTGTCATCGGTGAAGGCGCTGTGC AACTGTCTGGTGGCGAAAAACAACGCATTGCTCTTGCTCGAACTCTAGTCCGCAA GCCACAGATTCTCATTTTGGATGAGGCTACTAGCGCTCTGGATACAGAAAGTGAA AGAGCCGTACAAGAAGCGTTGAATGTGGGCAAGAAAATCGAACTACAATCTGC ATAGCCCATAGGCTTTCGACGGTCAAGGATGCAGACAAAATCATAGTTTTTGAGG ACGGTCGCATTGTTGAAAAAGGCACTAATGATGAACTAATGGCAAAAGAAGAAG GAATTTACAAAGGAATGGTTAAGGCTCAAGAGATCGCTCAGGGACAAGAAGATA CTACCCTAGATGATGTTGAGCCACTGGATATGCACAGAAGTGGATTCACGGAAA AATCACCAAACGGAGAAGAGGAAGCAAAGATGAGAGCAAGAGATTCTGCGCGT CTTCGTCAAAGTATGCTAAGTACATCAACAAGAGCCCGAATGGGAGATTGAG AGCGCTCGTGAAGATATGGCCGAAGAAGGCGCAGTGGAAGCCTCATTGTTTGAT ATTTTTGAATATGCGAAGCCGGAATGTCCAATGGCTACATTAGCTTTGGCGAATA CAGTAATCCGAGGACTAACCTGGCCACTTTTCGCGATCATCTACGGAAAACTGTT TTTGCTGTTCGCCAGTGAAGATTTGGATACCGTAGCTGCCGGAAGTACGACGAAT

TCGACACTTTTCTTCGTACTAGCCGTCGTATCAGGTGCAGCCACATTCGTCTCTGG TGCACTTTATGGTATAACGGGAGAAAAAATGGCAATGCGTTTAAGAATGGATGTT TTTAAGAATCTCATGCGTCAAGATGCCTCCTATTTTGACAATCCAAAAACACAACA CAGGAGCTCTGACAGCTCGTTTGGCATTAGATGCACCCAACGTCCAAGCGGCCCT TGATCAACGATTTGCTGAGGTGATGCAAGGAGTCAGCGCACTCATTGCTGGTGTC ACAGTTGCTTTTTACTACGGATGGAATGTCGCTGTTATTGGACTGGCTACGGCTAT GGCGTTGGTGATTGCACAAATTACTGTCACGCAATATTTGAAAGTCCGCGGACAA GAAGATATGGAAACAGCAGTGGAAGCGAGCAAGATAGTCACCGAGTCGATTGCA AACACCAAAACCATCCAAGCGCTGGGAAAAGAATGCTACATGTATCAAGCCTAC AAAGCTGCTGCACGCGAACCTCACAGGAGAGCAATAATTAGAGGCCTTTGGCAA TCGTTGTCATATGCACTGGCAAACTGCTTTGTTATGACAAATTTTGCTATCGTCTA CGCTTTCGGACTATGGTTGATCAGAAATGGTTGGAGCACTCCGTTTACCGTATTCC AGGTTATCGAAGCACTGAACTTATCGTCGTACAGTATGATGGCCGCCGCATCCTA TCTCCCAGAGTATATTCGTGCCAGAATCTCAGCTGGTGTGATGTTCACAATGATA CGAGAGCGACCAAAGATTGACAATATGGGACATCAGGGCGAAAAACCGGAAATC AAAGGCGATATAGTCCTGAGAAACGTCTACTTCTCTTACCCAGCGCGACGGCGAG CGCTTATTCTACAAGGTGTGGATATTGCTGTAAAGCATGGTCAGACTGTAGCTCT TGTTGGACCGAGTGGATGCGGAAAGAGCACTATAATTCAGCTGATTGAACGATAT TACGATGCTCTATGCGGATCTGTGACCATTGATAAATACGATGTACGCGATCTAT CCATTCGTCATATGCGCGATAGTATGGCACTTGTGGGGGCAAGAACCAACGCTTTT GGAAGTCGAGCGTGCAGCTCGTTTTGCCAACATCCACGAATTCATTATGTCACTA CCAGATGCCTATGACACCGTGGTTGGCACAAAAGGTGGACTGCTGTCAGGTGGTC AGAAGCAACGCATTGCAATCGCTCGGGGCTATCATTAGGGATCTAAAAATTCTACT GCTAGATGAAGCAACAAGTGCTTTGGACACTGGGAACGAAAAGGTTGTGCAAGA AGCTCTCGACAAAGCACGACAGGGCAGGACTTGTCTAGTGATTGCGCATCGTTTG TCAACAATACAGAATTCCGATGAGATCGTCGTCTGTAGGGACGGCCGCGTGATTG TAGAACGTCAGAATCATTAAGAAAGTCTCTACAACAGGGAGACACTTCGTAGCG AGTATATCAATACTCAGGGTACAGGATATGCACGTGG3'

>Cylicocyclus insigne P-Glycoprotein 3 1262 As

MKAAPLDKVQFTKRKRTIPTAGLLDVMRNADWKDYMLLFGGIQLSILNGALVPC QCYIFQGMCDTLINAERNQTYSELDMEDFSSNVLYYCSLYIYLAITLLLTGYLSNACM FTLCERRIHCIRKKFLKSVMRQDMAWFDTQQIGALTDKMSSGVERLKDGIGDKLGVL MSAQGSFLAGIALGFYLSAKNTMLMIFAVPALLGATIVSTKIISRVAKSKSYAQSTAG GIANEVISGIRTVMAFNAQPAEIHRYEKELRLARNLGIHEGVVLSGFAALNAFLTFAV MAISFWYGTSLVVDEEITPGTVVAVFWAVLIGTRRLGDAIPQMGAIISAQLAAADIFTI INRVPDIDSTRTEGFTPEKITGKLSFSNVNFSYPSRPDVKVLKDVSYEVNPGETVALVG HSGCGKSTMIGLLLRFYEQTSENSGVVALDGVPLREYNIKWLRNAIGVVQQEPVIFSA TVAENVRMGDDTITDEEVEEACRMANALDFIKKLGDGFDTVIGEGAVQLSGGEKQRI ALARTLVRKPQILILDEATSALDTESERAVQEALNVGKKNRTTICIAHRLSTVKDADK IIVFEDGRIVEKGTNDELMAKEEGIYKGMVKAQEIAQGQEDTTLDDVEPLDMHRSGF TEKSPNGEEEAKMRARDSARLRQSMLSTSTQEPEWEIESAREDMAEEGAVEASLFDIF EYAKPECPMATLALANTVIRGLTWPLFAIIYGKLFLLFASEDLDTVAAGSTTNSTLFF VLAVVSGAATFVSGALYGITGEKMAMRLRMDVFKNLMRQDASYFDNPKHNTGALT ARLALDAPNVQAALDQRFAEVMQGVSALIAGVTVAFYYGWNVAVIGLATAMALVI AQITVTQYLKVRGQEDMETAVEASKIVTESIANTKTIQALGKECYMYQAYKAAAREP HRRAIIRGLWQSLSYALANCFVMTNFAIVYAFGLWLIRNGWSTPFTVFQVIEALNLSS YSMMAAASYLPEYIRARISAGVMFTMIRERPKIDNMGHQGEKPEIKGDIVLRNVYFS YPARRRALILQGVDIAVKHGQTVALVGPSGCGKSTIIQLIERYYDALCGSVTIDKYDV RDLSIRHMRDSMALVGQEPTLFNMTISENIMYGMERCTQEEVERAARFANIHEFIMSL PDAYDTVVGTKGGLLSGGQKQRIAIARAIIRDLKILLLDEATSALDTGNEKVVQEALD KARQGRTCLVIAHRLSTIQNSDEIVVCRDGRVIERGTHQTLLARKGMYYKLVERQNH

8.2.4. CgoPgp-3

>Cylicostephanus goldi mRNA p-glycoprotein 3 3926 bp

TAGGAGCCCTCATAGATAAAATGAGCCGTGGAGTAGAGCGGCTAAAGGACGGAA AGCAATAGGTTTTTACCTGAATGCGAAAATTACGATGCTGATGATATTTACGGTT CCAGCTCTTCTCGGAGCAACAATTGTTTCAACAAAGATTATTTCAAGAGCTGCCA AATCTAAATCTTATGCTCAATCAACGGCTGGTGGTATCGCCAATGAAGTTATTTCT GGAATTCGCACTGTCATGGCATTCAATGCTCAGCCAGCAGAGATTCATCGTTACG AAAAAGAGCTGAGATTGGCGAAAAATCTTGGTATACATGATGGCGTGGTTTTGA GCGGCTTCGCAGGATTGAACGCTTTTCTCACTTTCGCTGTCATAGCTATTTCATTC TGGTATGGAACATCCCTTGTTGTGGACGAAGAAATAACGCCAGGAACTGTCGTCG CTGTTTTCTGGGCAGTGCTGATAGGTACTCGACGAATGGGAAATGCCATTCCACA AATGGGAGCCATTACCAGTGCGCAACTTGCCGCTGCTGACATATTTGCCATTATT AATAGAGTGCCAGACATTGACAGCACGAGAACGGAAGGCTTCACTCCAGAAAAA ATCACGGGAAAGCTGAGCTTCTCGAACGTTAATTTTTCTTATCCATCGCGACCGG ATGTGAAAGTTCTTAAGGACGTCAGTTATGAGGTGAATCCGGGTGAAACCGTGGC GTTGGTTGGACATTCCGGATGCGGTAAATCCACGATGATTGGGCTGTTGCTGCGA TTTTACGAGCAAACTTCGGAAAGTTCTGGAGCAGTGGCTCTTGACGGTGTTCCAC TTCGCGAATACAATATCAGGTGGCTGAGGAATGCTATTGGAGTCGTACAGCAGG AACCGGTCATATTTTCTGCTACTGTGGCGGAAAATATACGAATGGGCGATGATAC CTTGACAGACGAAGAGGTGGAGGAAGCCTGTCGAATGGCTAATGCACTGGATTT TATCAAAGAGCTTGGCGATGGCTTTGACACAGTCATTGGTGAGGGCGCTCTGCAA CTGTCCGCTGCTGAAAAGCAACGCATTGCTCTTGCTCGAGCTTTGGTTCGCAGGC CGCAGATTCTCGTTCTAGATGAGGCTACGAGCGCACTGGATACAGAAAGCGAAA AAGCCGTACAGGAGGCGTTGAATGTGGGCAAGAAAATCGAACTACAATCTGTA TAGCTCATAGACTTTCGACAGTCAAAGATGCAGACAAAATCATAGTTTTCGAGGA GGGTCGCATTGTCGAAAAAGGCACTAATGATGAGCTAATGGCAAAAGAAGAGGG AATCTACAAAGGGATGGTTAAGGCACAAGAGATGGCTAAGGGACAAGAGGACA CGACCTTAGATGATGTTGAACGAGTGGATATGCACAGAAGCGGACTTGCGGAAA AGTCACCGAACAGCGAAGAAGAAGCAAGATGAGAGCAAGAGATTCCGCGCGT GTTCGTCAAAGTTTGTTAAGTACCTCAACACAAGAGCCTGAATGGGAGATTGAAA GCGCTCGTGAAGATATGGCTGAAGAAGGGGGCAGTGGAGGCCTCGTTGTTCGATA TTTCCGAATATGCAAAGCCGGAACTTCCAATGGCTACATTAGCTTTCACAAATAC AGTAATTCGGGGGACTAATCTGGCCACTTTTCGCGATCATCTACGGAAAACTGTTT TTGCTCTTCTCGAGTGAAGATCTGGATACGGTAGCTGCCGGAAGTACAACAAATT CGGCACTTTTCTTCGTGCTTGCTGTTGTAGCAGGTGCGGCCACATTTGTGTCTGGT

GCACTCTACGGTATAACGGGAGAAAAAATGGCAATGCGTTTGAGAGTGGATGTA TTCAAGAACATTCTGCGCCAAGATGCCTCCTATTTTGACAATCCGAAGCACAACA CAGGAGTTTTGACAGCACGTCTGGCATCAGATGCACCAAACGTCCAAGCGGCCCT TGATCAACGACTTGCTGAGGTGCTGCAAGGAGTTAGTGCACTCATCGCTGGTATC ACTGTTGCTTTTATTATGGATGGAATGTTGCTTTTATTGGACTAGCTTCGGCTAT AGCACTGGTGACTGCACAAATTACTGTCACACAATATCTGAAATCTCGCGGACTA GAGGATATGGAAACAGCGGTAGAAGCAAGCAAGATTGTCACCGAGTCGATTGCA AACACTAGAACCATCCAATCACTGGGAAAAGAATGCTATATGTACCAAGCCTAT AAAGCTGCTGCACGTGAACCTCACAGAAGAGCTATAATTAGGGGCTTGTGGCAA TCCTTGTCGTATGCACTGGCGAACTGCTTTGTTATGACTAATTTTGCTATCGTCTA CGCTTTCGGGCTTTGGTTGATCAGAAATGGGTGGAGCACTCCGTTTACCGTTTTCC AGGTCATCGAAGCGCTGAACTTATCGTCATACAGTATAATGGCTGCCGCATCTTA TCTTCCGGAATATATTCGCGCTAGAATCTCGGCCGGTGTAATTTTCACAATGATGC GAGATCGACCAAAGATTGACAACTTGGGCCATCAGGGAGAAAAACCGGAAAATCA AAGGCGATATAGCGTTGAGAAACGTCTACTTCTCTTATCCAGCGCGACGGCGAGC ACTTATTCTTCAAGGTGTTGATATTGCTGTGAAGCATGGTCAGACTGTAGCACTTG TCGGACCGAGTGGATGCGGAAAGAGCACTATACTACAACTAATTGAACGATATT ACGATGCTCTGTGCGGATCTGTGACCATTGATAAATACGAAGTACGCGATCTATC CATTCGTCATATGCGCGATAGTATGGCACTTATGGAGCAAGAACCAACACTTTTT GAGGTTGAGCGCGCTGCTCGTTTTGCCAACATTCATGAATTCATCATGTCACTACC AGATGCTTATGACACTGTGATTGGCACGAAAGGTGGGCTGCTGTCAATTGGTCAG AAGCAACGTATTGCAATTGCGCGAGCTATTGTTAGGGATCCAAAAATCCTACTGC TAGATGAGGCTACAAGTGCTTTGGACACTGGGAATGAAAAGGTTGTGCAAGAAG CTCTCGACAAAGCACGACAGGGCAGAACTTGTCTAGTAATTGCGCATCGTTTATC AACAATACAGAATTCCGATGAGATCGTCGTCTGTAGGGACGGCCGCGTGATTGA GAGAGGAACTCATCAAACACTGCTAGCTAGGAAAGGAATGTATTATAAACTTGT AGAACGTCAGAATCATTAAGGAAGTCTCTACCACAGGGAGACACTTCGTAGCGA GTATATCAATACTCAGGGTACAGGATATGCACGTGG3'

>Cylicostephanus goldi P-Glykoprotein 3 1262 As

MKAAPLDKVQFSKRKRTIPTAGLLDVMRNADWKDYMLLFGGIQLSILNGALVPCQC YIFQGMCDTLINAERNQTYSELDMEGFSSNVLYYCSLYIYLAVLLLLTGYLSNACLFT LCERRIHCIRKKFLKSVMRQDMAWFDNQQIGALIDKMSRGVERLKDGIGDKLEVLM SAQASFLAGIAIGFYLNAKITMLMIFTVPALLGATIVSTKIISRAAKSKSYAQSTAGGIA NEVISGIRTVMAFNAQPAEIHRYEKELRLAKNLGIHDGVVLSGFAGLNAFLTFAVIAIS FWYGTSLVVDEEITPGTVVAVFWAVLIGTRRMGNAIPQMGAITSAQLAAADIFAIINR VPDIDSTRTEGFTPEKITGKLSFSNVNFSYPSRPDVKVLKDVSYEVNPGETVALVGHS GCGKSTMIGLLLRFYEQTSESSGAVALDGVPLREYNIRWLRNAIGVVQQEPVIFSATV AENIRMGDDTLTDEEVEEACRMANALDFIKELGDGFDTVIGEGALQLSAAEKQRIAL ARALVRRPQILVLDEATSALDTESEKAVQEALNVGKKNRTTICIAHRLSTVKDADKII VFEEGRIVEKGTNDELMAKEEGIYKGMVKAQEMAKGQEDTTLDDVERVDMHRSGL AEKSPNSEEEAKMRARDSARVRQSLLSTSTQEPEWEIESAREDMAEEGAVEASLFDIS EYAKPELPMATLAFTNTVIRGLIWPLFAIIYGKLFLLFSSEDLDTVAAGSTTNSALFFV LAVVAGAATFVSGALYGITGEKMAMRLRVDVFKNILRQDASYFDNPKHNTGVLTAR LASDAPNVQAALDQRLAEVLQGVSALIAGITVAFYYGWNVAFIGLASAIALVTAQIT VTQYLKSRGLEDMETAVEASKIVTESIANTRTIQSLGKECYMYQAYKAAAREPHRRA IIRGLWQSLSYALANCFVMTNFAIVYAFGLWLIRNGWSTPFTVFQVIEALNLSSYSIM AAASYLPEYIRARISAGVIFTMMRDRPKIDNLGHQGEKPEIKGDIALRNVYFSYPARR RALILQGVDIAVKHGQTVALVGPSGCGKSTILQLIERYYDALCGSVTIDKYEVRDLSI RHMRDSMALMEQEPTLFNMTISENIMYGMERCTQEEVERAARFANIHEFIMSLPDAY DTVIGTKGGLLSIGQKQRIAIARAIVRDPKILLLDEATSALDTGNEKVVQEALDKARQ GRTCLVIAHRLSTIQNSDEIVVCRDGRVIERGTHQTLLARKGMYYKLVERQNH

9. Zusammenfassung

Identifizierung und Charakterisierung von P-Glykoproteinen in kleinen Strongyliden

Auf Grund hoher Prävalenz, weit verbreiteter Anthelminthikaresistenz (AR) und ausgeprägter Pathogenität der dritten und vierten Larvenstadien gehören Cyathostomine bzw. kleinen Strongyliden zu den bedeutendsten Infektionserregern des Pferdes. Resistenzen traten als erstes gegenüber den Benzimidazolen (BZ) auf, die bereits seit mehr als 20 Jahren nicht mehr uneingeschränkt für die Therapie empfohlen werden. Makrozyklische Laktone (ML) werden heute am häufigsten für die Behandlung von mit Cyathostominen infizierten Pferden angewendet. Während die Wirksamkeit der ML gegenüber kleinen Strongyliden trotz ihres intensiven Einsatzes in Europa kaum eingeschränkt ist, fanden Untersuchungen erste MLresistente Populationen in Südamerika (Brasilien). Die Expression von P-Glykoproteinen (Pgp) mit ihrer Fähigkeit Xenobiotika aus dem Zellinneren zu exportieren, wurde in Nematoden wie *Haemoncus contortus* und *Teladorsagia circumcincta* mit einer erhöhten Toleranz gegenüber ML in Verbindung gebracht.

Die hier vorgestellte Studie untersuchte das Vorkommen und die funktionelle Bedeutung von Pgps in kleinen Strongyliden. Dabei konnten vollständige cDNA-Sequenzen des Pgp-Isotyps 3 in den Spezies *Cylicocyclus elongatus*, *Cylicocyclus insigne* und *Cylicostephanus goldi* mittels RT-PCR identifiziert werden. Für *C. elongatus* war zusätzlich die vollständige Amplifizierung und Sequenzierung von Pgp-9 möglich. Während die Ähnlichkeit der Pgp-3 cDNAs der Cyathostominen untereinander bei > 90 % lag, stimmten Pgp-3 und Pgp-9 Isotypen auf Nukleotidebene nur zu 39 % überein. Alle deduzierten Proteine zeigten die charakteristischen Merkmale der ABC-Transporterfamilie, wie z.B. je zwei Transmembran-und nukleotidbindenden Domänen. Ihre Molekülmasse lag bei \approx 140 kDa.

Zur funktionellen Charakterisierung und Identifizierung von Pgp-Substraten wurden erstmals die Nematoden-Pgps *Ceg*Pgp-3 und *Ceg*Pgp-9 in zwei *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen (AD1-7 und JRY8012) heterolog exprimiert. Beide Stämme zeichnen sich durch die Deletion von sieben bzw. drei hefeeigenen ABC-Transportern aus. Die Transkription der Transgene wurde für beide Pgps über eine RT-PCR bestätigt. Der Versuch über einen Western Blot mit Verwendung eines spezifischen anti-Pgp- (C219) und eines anti-V5-Antikörpers die Proteinexpression zu überprüfen, blieb erfolglos. Der Translationsnachweis erfolgte daher über ein *fluorescence activated cell scanning (FACS)*. Der Anteil positiver Zellen war bei AD1-7 *Ceg*Pgp-9 mit 20 % am höchsten, wobei hier anzumerken ist, daß der Antikörper nur aktives

Pgp detektiert und die Versuche in Abwesenheit eines exogenen Pgp Substrats durchgeführt wurden. Bei *Ceg*Pgp-3 erreichte er nur Werte von 2,3 bis 2,7 %. JRY8012 zeigte keine Expression von aktivem *Ceg*Pgp-3. Für *Ceg*Pgp-9 lagen die Werte nur bei 0,58 - 1,99 %.

Im 96-Well-Format wurde im Rahmen eines neu etablierten, automatisierten, kompetitiven Wachstumsassays die Suszeptibilität der transformierten Hefen gegenüber dem BZ Thiabendazol und dem Pgp-Inhibitor und –Substrat Ketokonazol (KCON) untersucht. Dabei wurde über 48 h alle 10 min die OD₆₀₀ der Hefekulturen bestimmt und die ermittelten Wachstumskurven statistisch ausgewertet. Über eine logistische Regression mit vier Parametern wurde das relative Wachstums der Hefestämme mit und ohne Pgp-Expression verglichen sowie EC₅₀ Werte berechnet. Für keinen der transformierten JRY8012-Stämme zeigten sich signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm mit LacZ-Expression, was wahrscheinlich mit einer zu geringen Pgp-Expression zusammenhängt. Die EC₅₀ Werte von AD1-7 *Ceg*Pgp-9 und LacZ wichen hingegen signifikant voneinander ab. Hefen, die *Ceg*Pgp-9 exprimierten, tolerierten ohne Wachstumseinbußen eine KCON -Konzentration von 0,73 μ M im Gegensatz zu 0,18 μ M im Kontrollstamm (LacZ).

Des Weiteren wurden im gleichen Wachstumsassay verschiedene ML auf ihre potentielle Interaktion mit KCON am heterolog exprimierten Pgp untersucht. Die Ergebnisse zeigen einen moderaten, konzentrationsabhängigen und wachstumsmindernden Effekt von EPM und IVM auf AD1-7 *Ceg*Pgp-9. Die Zugabe von MOX bewirkte keine Wachstumshemmung. In den verwendeten ML-Konzentrationen, die geringer waren als für die Pgp-exprimierenden Stämme, zeigte sich kein direkter Einfluss auf das Wachstum des Kontrollstammes.

Die Kombination aus KCON (0,18 bzw. 0,73 µM) mit ML führte in allen Fällen zur signifikanten, konzentrationsabhängigen Steigerung der KCON-Wirkung. Die Ursache der potentiellen Synergie zwischen KCON und ML ließ sich mit der angewendeten Methode nicht feststellen. Möglich wären unter anderem eine kompetitive Verdrängung von KCON an einer Substratbindungsstelle am Pgp oder eine ML-induzierte Inhibition der Pgp-Aktivität.

Das etablierte, automatisierte Wachstumsassay ermöglicht die einfache und kostengünstige funktionelle Untersuchung von Pgps auf Proteinebene. Die Identifizierung von Pgp-Substraten und Wirkstoffinteraktionen können von großem Nutzen sein für die nachhaltige Verwendung von Anthelminthika und die Entwicklung neuer Wirkstoffe, welche z.B. unbeeinflusst sind von der Pgp-Expression.

10. Summary

Identification and characterisation of p-glycoproteins in small strongyles

Cyathostomins or small strongyles are considered to belong to the most important infectious agents of horses due to their high prevalence, widely distributed anthelmintic resistance and the pathogenicy of their third and fourth stage larvae. Resistance has been first recorded for benzimidazoles (BZ). Due to widespread resistance BZ are nowadays only used with limitations to treat cyathostomin infections. Currently macrocylic lactones (ML) are used most frequently for the treatment of worm infections in horses. In spite of their intensive use the efficacy of ML is apparently almost unaltered in Europe. However, first cases of resistance have been reported in South America. Expression of p-glycoproteins (Pgps), which are able to export various xenobiotics out of cells, has been shown to be associated with increased tolerance towards anthelmintics in nematodes such as *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*.

The study presented herein describes the identification and functional analysis of Pgps in small strongyles. Using RT-PCR, full-length cDNA sequences of Pgp-3 were identified in *Cylicocyclus elongatus*, *Cylicocyclus insigne* and *Cylicostephanus goldi*. Additionally, amplification and sequencing of a full length cDNA sequence of Pgp-9 has been accomplished for *C. elongatus*. All deduced proteins show the characteristics of the ABC transporter super family with two transmembrane and nucleotide-binding domains. Their molecular mass was aprox. 140 kDa.

For the first time, nematode Pgps, i.e. *Ceg*Pgp-3 and *Ceg*Pgp-9, were expressed in two *Saccaromyces cerevisae* strains (AD1-7, JRY8012) for functional characterization and identification of Pgp substrates. In both strains different numbers of endogenous ABC-transporters are deleted. The transcription of both Pgps was confirmed by RT-PCR. The detection of Pgp expression by Western Blot failed. Alternatively fluorescence activated cell scanning (FACS) was performed to demonstrate Pgp-expression. The percentage of positive cells was highest for AD1-7 *Ceg*Pgp-9 and reached max. 20%. For *Ceg*Pgp-3 only 2.3 - 2.7% positive cells could be detected. JRY8012 showed no expression of *Ceg*Pgp-3. *Ceg*Pgp-9 was only expressed in 0.58 - 1.99% of the analyzed cells.

Using an automated yeast growth inhibition assay in a 96 well plate, susceptibility of transformed yeast cells to the BZ thiabendazole and the Pgp-inhibitor and –substrate ketoconazol (KCON) was investigated. The assay consists of repeated measurements of OD_{600}

of yeast cultures every 10 min over 48 h. All resulting growth curves were statistically analyzed. A four parametric logistic regression was used to compare relative growth of yeast strains with and without Pgp-expression and to calculate EC_{50} values.

No significant differences were detected for any of the JRY8012 transformants compared to the control strain with LacZ-expression, possibly due to low Pgp-expression in this yeast strain.

EC₅₀-values of AD1-7 expressing *Ceg*Pgp-9 or LacZ differed significantly. Yeasts with expression of *Ceg*Pgp-9 tolerated a KCON concentration of 0.72 μ M without any growth reduction in contrast to the control strain, which showed normal growth in presence of max. 0.18 μ M KCON. Furthermore putative interaction of different ML with the heterogously expressed Pgp was analyzed. The results showed a concentration dependent, growth-reducing effect of EPM and IVM on AD1-7 *Ceg*Pgp-9. MOX did not induce any growth change. For the control strain none of the tested ML concentrations was able to affect growth rates.

The combination of KCON (0.18 or 0.73 μ M) and ML resulted in a significantly increased and concentration dependent susceptibility to KCON for all tested strains. Putative synergies between KCON and ML could not be analyzed via the applied method. Among other mechanisms a competitive replacement of KCON at one substrate binding site or a ML-induced inhibition of Pgp-activity were conceivable explications.

The established, automated, competitive growth assay constitutes a simple and cost-efficient method for functional analysis of heterologous Pgps on protein level. Identification of Pgp substrates and drug-interactions could be of advantage to achieve sustained drug efficacies and the development of new drugs, that are e.g. unaffected by Pgp expression.

11. Bibliographie

Abascal, F., Zardoya, R., and Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics 21, 2104-2105.

Adelsberger, H., Lepier, A., and Dudel, J. (2000). Activation of rat recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2S$ GABAA receptor by the insecticide ivermectin. European Journal of Pharmacology *394*, 163-170.

AlGusbi, S., Krücken, J., Ramünke, S., von Samson-Himmelstjerna, G., and Demeler, J. (2014). Analysis of putative inhibitors of anthelmintic resistance mechanisms in cattle gastrointestinal nematodes. International journal for parasitology *44*, 647-658.

Almeida, G.D., Feliz, D.C., Heckler, R.P., Borges, D.G., Onizuka, M.K., Tavares, L.E., Paiva, F., and Borges, F.A. (2013). Ivermectin and moxidectin resistance characterization by larval migration inhibition test in field isolates of Cooperia spp. in beef cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil. Veterinary parasitology *191*, 59-65.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research *25*, 3389-3402.

Anderson, I.G., and Hasslinger, M.A. (1982). Cyathostominae and other strongyles of horses in the Federal Republic of Germany. Journal of the South African Veterinary Association *53*, 195-197.

Anziani, O.S., Suarez, V., Guglielmone, A.A., Warnke, O., Grande, H., and Coles, G.C. (2004). Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. Veterinary parasitology *122*, 303-306.

Anziani, O.S., Zimmermann, G., Guglielmone, A.A., Vazquez, R., and Suarez, V. (2001). Avermectin resistance in Cooperia pectinata in cattle in Argentina. Vet Rec *149*, 58-59.

Ardelli, B.F., Guerriero, S.B., and Prichard, R.K. (2005). Genomic organization and effects of ivermectin selection on Onchocerca volvulus P-glycoprotein. Mol Biochem Parasitol *143*, 58-66.

Ardelli, B.F., Guerriero, S.B., and Prichard, R.K. (2006). Ivermectin imposes selection pressure on P-glycoprotein from Onchocerca volvulus: linkage disequilibrium and genotype diversity. Parasitology *132*, 375-386.

Ardelli, B.F., and Prichard, R.K. (2013). Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of Caenorhabditis elegans to ivermectin. Veterinary parasitology *191*, 264-275.

Ardelli, B.F., Stitt, L.E., and Tompkins, J.B. (2010). Inventory and analysis of ATP-binding cassette (ABC) systems in Brugia malayi. Parasitology *137*, 1195-1212.

Arena, J.P., Liu, K.K., Paress, P.S., and Cully, D.F. (1991). Avermectin-sensitive chloride currents induced by Caenorhabditis elegans RNA in Xenopus oocytes. Molecular pharmacology *40*, 368-374.

Arena, J.P., Liu, K.K., Paress, P.S., Schaeffer, J.M., and Cully, D.F. (1992). Expression of a glutamate-activated chloride current in Xenopus oocytes injected with Caenorhabditis elegans RNA: evidence for modulation by avermectin. Molecular Brain Research *15*, 339-348.

Areskog, M., Engstrom, A., Tallkvist, J., von Samson-Himmelstjerna, G., and Hoglund, J. (2013). PGP expression in Cooperia oncophora before and after ivermectin selection. Parasitol Res *112*, 3005-3012.

Artho, R., Schnyder, M., Kohler, L., Torgerson, P.R., and Hertzberg, H. (2007). Avermectin-resistance in gastrointestinal nematodes of Boer goats and Dorper sheep in Switzerland. Veterinary parasitology *144*, 68-73.

Atchison, W.D., Geary, T.G., Manning, B., VandeWaa, E.A., and Thompson, D.P. (1992). Comparative neuromuscular blocking actions of levamisole and pyrantel-type anthelmintics on rat and gastrointestinal nematode somatic muscle. Toxicology and applied pharmacology *112*, 133-143.

Austin, W.C., Courtney, W., Danilewicz, J.C., Morgan, D.H., Conover, L.H., Howes, H.L., Lynch, J.E., McFarland, J.W., Cornwell, R.L., and Theodorides, V.J. (1966). Pyrantel Tartrate, a New Anthelmintic Effective against Infections of Domestic Animals. Nature *212*, 1273-1274.

Avery, L., and Horvitz, H.R. (1990). Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in Caenorhabditis elegans. Journal of Experimental Zoology *253*, 263-270.

Barger, I.A., and Lisle, K.A. (1979). BENZIMIDAZOLE RESISTANCE IN SMALL STRONGYLES OF HORSES. Australian veterinary journal 55, 594-595.

Bartley, D.J., McAllister, H., Bartley, Y., Dupuy, J., Menez, C., Alvinerie, M., Jackson, F., and Lespine, A. (2009). P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of Teladorsagia circumcincta and Haemonchus contortus. Parasitology *136*, 1081-1088.

Bartley, D.J., McArthur, C.L., Devin, L.M., Sutra, J.F., Morrison, A.A., Lespine, A., and Matthews, J.B. (2012). Characterisation of macrocyclic lactone resistance in two field-derived isolates of Cooperia oncophora. Veterinary parasitology *190*, 454-460.

Bartos, M., Rayes, D., and Bouzat, C. (2006). Molecular determinants of pyrantel selectivity in nicotinic receptors. Molecular pharmacology *70*, 1307-1318.

Bauer, C., Merkt, J.C., Janke-Grimm, G., and Bürger, H.J. (1986). Prevalence and control of benzimidazoleresistant small strongyles on German thoroughbred studs. Veterinary parasitology *21*, 189-203.

Becher, A.M., Mahling, M., Nielsen, M.K., and Pfister, K. (2010). Selective anthelmintic therapy of horses in the Federal states of Bavaria (Germany) and Salzburg (Austria): an investigation into strongyle egg shedding consistency. Veterinary parasitology *171*, 116-122.

Beech, R.N., Wolstenholme, A.J., Neveu, C., and Dent, J.A. (2010). Nematode parasite genes: what's in a name? Trends Parasitol *26*, 334-340.

Bentounsi, B., Attir, B., Meradi, S., and Cabaret, J. (2007). Repeated treatment faecal egg counts to identify gastrointestinal nematode resistance in a context of low-level infection of sheep on farms in eastern Algeria. Veterinary parasitology *144*, 104-110.

Besier, R.B., and Love, S.C.J. (2003). Anthelmintic resistance in sheep nematodes in Australia: the need for new approaches. Australian Journal of Experimental Agriculture *43*, 1383-1391.

Bjørn, H., Hennessy, D.R., and Friis, C. (1996). The kinetic disposition of pyrantel citrate and pamoate and their efficacy against pyrantel-resistant Oesophagostomum dentatum in pigs. International journal for parasitology *26*, 1375-1380.

Bjørn, H., Roepstorff, A., Waller, P.J., and Nansen, P. (1990). Resistance to levamisole and cross-resistance between pyrantel and levamisole in Oesophagostomum quadrispinulatum and Oesophagostomum dentatum of pigs. Veterinary parasitology *37*, 21-30.

Bjørn, H., Sommer, C., Schougård, H., Henriksen, S.A., and Nansen, P. (1991). Resistance to benzimidazole anthelmintics in small strongyles (Cyathostominae) of horses in Denmark. Acta veterinaria Scandinavica *32*, 253-260.

Blackhall, W.J., Drogemüller, M., Schnieder, T., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2006). Expression of recombinant beta-tubulin alleles from Cylicocyclus nassatus (Cyathostominae). Parasitol Res *99*, 687-693.

Blackhall, W.J., Kuzmina, T., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2011). beta-Tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naive Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. Parasitol Res *109*, 1199-1203.

Blackhall, W.J., Liu, H.Y., Xu, M., Prichard, R.K., and Beech, R.N. (1998). Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of Haemonchus contortus. Mol Biochem Parasitol *95*, 193-201.

Blackhall, W.J., Prichard, R.K., and Beech, R.N. (2008). P-glycoprotein selection in strains of Haemonchus contortus resistant to benzimidazoles. Veterinary parasitology *152*, 101-107.

Blackwell, N.J. (1973). Colitis in equines associated with strongyle larvae. Vet Rec 93, 401-402.

Blake, N., and Coles, G. (2007). Flock cull due to anthelmintic-resistant nematodes. Vet Rec 161, 36.

Bodecek, S., Jahn, P., Dobesova, O., and Vavrouchova, E. (2010). Equine cyathostomosis: case reports. Veterinární Medicína 55, 187-193.

Boersema, J.H., Borgsteede, F.H., Eysker, M., Elema, T.E., Gaasenbeek, C.P., and van der Burg, W.P. (1991). The prevalence of anthelmintic resistance of horse strongyles in The Netherlands. The Veterinary quarterly *13*, 209-217.

Boersema, J.H., Eysker, M., and Nas, J.W. (2002). Apparent resistance of Parascaris equorum to macrocylic lactones. Vet Rec 150, 279-281.

Borgers, M., De Nollin, S., De Brabander, M., and Thienpont, D. (1975). Influence of the anthelmintic mebendazole on microtubules and intracellular organelle movement in nematode intestinal cells. American journal of veterinary research *36*, 1153-1166.

Borgers, M., Van den Bossche, H., and De Brabander, M. (1983). The mechanism of action of the new antimycotic ketoconazole. The American journal of medicine 74, 2-8.

Borgsteede, F.H., Dercksen, D.D., and Huijbers, R. (2007). Doramectin and albendazole resistance in sheep in The Netherlands. Veterinary parasitology *144*, 180-183.

Borgsteede, F.H., Dvojnos, G.M., and Kharchenko, V.A. (1997). Benzimidazole resistance in cyathostomes in horses in the Ukraine. Veterinary parasitology *68*, 113-117.

Boulin, T., Fauvin, A., Charvet, C.L., Cortet, J., Cabaret, J., Bessereau, J.L., and Neveu, C. (2011). Functional reconstitution of Haemonchus contortus acetylcholine receptors in Xenopus oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance. British journal of pharmacology *164*, 1421-1432.

Bourguinat, C., Keller, K., Blagburn, B., Schenker, R., Geary, T.G., and Prichard, R.K. (2011). Correlation between loss of efficacy of macrocyclic lactone heartworm anthelmintics and P-glycoprotein genotype. Veterinary parasitology *176*, 374-381.

Brasil, B.S., Nunes, R.L., Bastianetto, E., Drummond, M.G., Carvalho, D.C., Leite, R.C., Molento, M.B., and Oliveira, D.A. (2012). Genetic diversity patterns of Haemonchus placei and Haemonchus contortus populations isolated from domestic ruminants in Brazil. International journal for parasitology *42*, 469-479.

Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., Dean, M., and Plasterk, R.H. (1996). Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode Caenorhabditis elegans. The EMBO journal *15*, 6132-6143.

Broeks, A., Janssen, H.W., Calafat, J., and Plasterk, R.H. (1995). A P-glycoprotein protects Caenorhabditis elegans against natural toxins. The EMBO journal 14, 1858-1866.

Brown, H.D., Matzuk, A.R., Ilves, I.R., Peterson, L.H., Harris, S.A., Sarett, L.H., Egerton, J.R., Yakstis, J.J., Campbell, W.C., and Cuckler, A.C. (1961). ANTIPARASITIC DRUGS. IV. 2-(4'-THIAZOLYL)-BENZIMIDAZOLE, A NEW ANTHELMINTIC. Journal of the American Chemical Society *83*, 1764-1765.

Bucknell, D.G., Gasser, R.B., and Beveridge, I. (1995). The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria, Australia. International journal for parasitology *25*, 711-724.

Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E., Birnbaum, J., Currie, S.A., Hartman, R., Kong, Y.L., Monaghan, R.L., Olson, G., Putter, I., *et al.* (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. Antimicrobial agents and chemotherapy *15*, 361-367.

Buxton, S.K., Charvet, C.L., Neveu, C., Cabaret, J., Cortet, J., Peineau, N., Abongwa, M., Courtot, E., Robertson, A.P., and Martin, R.J. (2014). Investigation of acetylcholine receptor diversity in a nematode parasite leads to characterization of tribendimidine- and derquantel-sensitive nAChRs. PLoS pathogens *10*, e1003870.

Bygarski, E.E., Prichard, R.K., and Ardelli, B.F. (2014). Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance *4*, 143-151.

Cai, J., and Gros, P. (2003). Overexpression, purification, and functional characterization of ATP-binding cassette transporters in the yeast, Pichia pastoris. Biochimica et biophysica acta *1610*, 63-76.

Campbell, A.J., Gasser, R.B., and Chilton, N.B. (1995). Differences in a ribosomal DNA sequence of Strongylus species allows identification of single eggs. International journal for parasitology *25*, 359-365.

Campbell, W.C., and Benz, G.W. (1984). Ivermectin: a review of efficacy and safety. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics 7, 1-16.

Canever, R.J., Braga, P.R., Boeckh, A., Grycajuck, M., Bier, D., and Molento, M.B. (2013). Lack of Cyathostomin sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. Veterinary parasitology *194*, 35-39.

Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi, K., Baret, P.V., Keniya, M.V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A., and Monk, B.C. (2009). Efflux-mediated antifungal drug resistance. Clinical microbiology reviews *22*, 291-321, Table of Contents.

Canul-Ku, H.L., Rodriguez-Vivas, R.I., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J., Perez-Cogollo, L.C., and Ojeda-Chi, M.M. (2012). Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. Veterinary parasitology *183*, 292-298.

Čerňanská, D., Paoletti, B., Kráľová-Hromadová, I., Iorio, R., Čudeková, P., Milillo, P., and Traversa, D. (2009). Application of a Reverse Line Blot hybridisation assay for the species-specific identification of cyathostomins (Nematoda, Strongylida) from benzimidazole-treated horses in the Slovak Republic. Veterinary parasitology *160*, 171-174.

Čerňanská, D., Várady, M., and Čorba, J. (2006). A survey on anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in the Slovak Republic. Veterinary parasitology *135*, 39-45.

Chapman, M.R., French, D.D., Monahan, C.M., and Klei, T.R. (1996). Identification and characterization of a pyrantel pamoate resistant cyathostome population. Veterinary parasitology *66*, 205-212.

Chapman, M.R., Kearney, M.T., and Klei, T.R. (2003). Equine cyathostome populations: accuracy of species composition estimations. Veterinary parasitology *116*, 15-21.

Cheeseman, C.L., Delany, N.S., Woods, D.J., and Wolstenholme, A.J. (2001). High-affinity ivermectin binding to recombinant subunits of the Haemonchus contortus glutamate-gated chloride channel. Molecular and Biochemical Parasitology *114*, 161-168.

Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M., and Roninson, I.B. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. Cell *47*, 381-389.

Chiejina, S.N., and Mason, J.A. (1977). Immature stages of Trichonema spp as a cause of diarrhoea in adult horses in spring. Vet Rec *100*, 360-361.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nature protocols *1*, 581-585.

Cirak, V.Y., Hermosilla, C., and Bauer, C. (1996). Study on the gastrointestinal parasite fauna of ponies in northern Germany. Applied parasitology *37*, 239-244.

Claros, M.G., and von Heijne, G. (1994). TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. Computer applications in the biosciences : CABIOS *10*, 685-686.

Coles, G.C. (2002). Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? Veterinary research *33*, 481-489.

Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., and Waller, P.J. (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. Veterinary parasitology *44*, 35-44.

Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., and Vercruysse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Veterinary parasitology *136*, 167-185.

Coles, G.C., Tritschler, J.P., 2nd, Giordano, D.J., Laste, N.J., and Schmidt, A.L. (1988). Larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. Research in veterinary science 45, 50-53.

Collobert-Laugier, C., Hoste, H., Sevin, C., and Dorchies, P. (2002). Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy, France. Veterinary parasitology *110*, 77-83.

Comer, K.C., Hillyer, M.H., and Coles, G.C. (2006). Anthelmintic use and resistance on thoroughbred training yards in the UK. Vet Rec 158, 596-598.

Consortium, C.e.S. (1998). Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. Science *282*, 2012-2018.

Corning, S. (2009). Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. Parasit Vectors 2 Suppl 2, S1.

Craven, J., Bjørn, H., Barnes, E.H., Henriksen, S.A., and Nansen, P. (1999). A comparison of in vitro tests and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. Veterinary parasitology *85*, 49-59.

Craven, J., Bjørn, H., Henriksen, S.A., Nansen, P., Larsen, M., and Lendal, S. (1998). Survey of anthelmintic resistance on Danish horse farms, using 5 different methods of calculating faecal egg count reduction. Equine veterinary journal *30*, 289-293.

Cully, D.F., Paress, P.S., Liu, K.K., Schaeffer, J.M., and Arena, J.P. (1996). Identification of a Drosophila melanogaster glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin. Journal of Biological Chemistry *271*, 20187-20191.

Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Paress, P.S., Van der Ploeg, L.H.T., Schaeffer, J.M., and Arena, J.P. (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from Caenorhabditis elegans. Nature *371*, 707-711.

Cwiklinski, K., Merga, J.Y., Lake, S.L., Hartley, C., Matthews, J.B., Paterson, S., and Hodgkinson, J.E. (2013). Transcriptome analysis of a parasitic clade V nematode: Comparative analysis of potential molecular anthelmintic targets in Cylicostephanus goldi. International journal for parasitology.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., and Posada, D. (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics 27, 1164-1165.

Davidse, L.C., and Flach, W. (1978). Interaction of thiabendazole with fungal tubulin. Biochimica et biophysica acta 543, 82-90.

Dawson, G.R., Wafford, K.A., Smith, A., Marshall, G.R., Bayley, P.J., Schaeffer, J.M., Meinke, P.T., and McKernan, R.M. (2000). Anticonvulsant and adverse effects of avermectin analogs in mice are mediated through the gamma-aminobutyric acid(A) receptor. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics *295*, 1051-1060.

De Graef, J., Demeler, J., Skuce, P., Mitreva, M., Von Samson-Himmelstjerna, G., Vercruysse, J., Claerebout, E., and Geldhof, P. (2013). Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant Cooperia oncophora isolate following in vivo and in vitro exposure to macrocyclic lactones. Parasitology *140*, 499-508.

Dean, M., and Annilo, T. (2005). Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. Annu Rev Genomics Hum Genet *6*, 123-142.

Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Journal of lipid research *42*, 1007-1017.

Demeler, J., Krücken, J., Algusbi, S., Ramunke, S., De Graef, J., Kerboeuf, D., Geldhof, P., Pomroy, W.E., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2013a). Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode Cooperia oncophora. Mol Biochem Parasitol *188*, 10-19.

Demeler, J., Krüger, N., Krücken, J., von der Heyden, V.C., Ramünke, S., Kuttler, U., Miltsch, S., Lopez Cepeda, M., Knox, M., Vercruysse, J., *et al.* (2013b). Phylogenetic characterization of beta-tubulins and development of pyrosequencing assays for benzimidazole resistance in cattle nematodes. PloS one *8*, e70212.

Demeler, J., Küttler, U., and 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. Veterinary parasitology *170*, 61-70.

Demeler, J., van Zeveren, A.M., Kleinschmidt, N., Vercruysse, J., Hoglund, J., Koopmann, R., Cabaret, J., Claerebout, E., Areskog, M., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2009). Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. Veterinary parasitology *160*, 109-115.

Dent, J.A., Davis, M.W., and Avery, L. (1997). avr-15 encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in Caenorhabditis elegans. EMBO Journal *16*, 5867-5879.

Dent, J.A., Smith, M.M., Vassilatis, D.K., and Avery, L. (2000). The genetics of ivermectin resistance in Caenorhabditis elegans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 2674-2679.

Deplazes, P., Eckert, J., Von Samson-Himmelstjerna, G., and Zahner, H. (2012). Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, 3. Auflage edn (Stuttgart: Enke Verlag).

Dicker, A.J., Nath, M., Yaga, R., Nisbet, A.J., Lainson, F.A., Gilleard, J.S., and Skuce, P.J. (2011a). Teladorsagia circumcincta: The transcriptomic response of a multi-drug-resistant isolate to ivermectin exposure in vitro. Experimental parasitology *127*, 351-356.

Dicker, A.J., Nisbet, A.J., and Skuce, P.J. (2011b). Gene expression changes in a P-glycoprotein (Tci-pgp-9) putatively associated with ivermectin resistance in Teladorsagia circumcincta. International journal for parasitology *41*, 935-942.

Díez-Baños, P., Pedreira, J., Sánchez-Andrade, R., Francisco, I., Suárez, J.L., Díaz, P., Panadero, R., Arias, M., Painceira, A., Paz-Silva, A., *et al.* (2008). Field Evaluation for Anthelmintic-Resistant Ovine Gastrointestinal Nematodes by In Vitro and In Vivo Assays. Journal of Parasitology *94*, 925-928.

Döppenschmitt, S., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C., and Langguth, P. (1998). Radioligand-Binding Assay Employing P-Glycoprotein-Overexpressing Cells: Testing Drug Affinities to the Secretory Intestinal Multidrug Transporter. Pharm Res 15, 1001-1006.

Driscoll, M., Dean, E., Reilly, E., Bergholz, E., and Chalfie, M. (1989). Genetic and molecular analysis of a Caenorhabditis elegans beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity. The Journal of cell biology *109*, 2993-3003.

Drogemüller, M., Failing, K., Schnieder, T., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2004a). Effect of repeated benzimidazole treatments with increasing dosages on the phenotype of resistance and the beta-tubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-resistant cyathostomin population. Veterinary parasitology *123*, 201-213.

Drogemüller, M., Schnieder, T., and Samson-Himmelstjerna, G. (2004b). Beta-Tubulin Complementary DNA Sequence Variations Observed Between Cyathostomins From Benzimidazole-Susceptible and -Resistant Populations. Journal of Parasitology *90*, 868-870.

Drogemüller, M., Schnieder, T., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2004c). Evidence of p-glycoprotein sequence diversity in cyathostomins. J Parasitol *90*, 998-1003.

Drudge, J.H., Lyons, E.T., Tolliver, S.C., and Fallon, E.H. (1990). Phenothiazine in the origin of benzimidazole resistance in population-B equine strongyles. Veterinary parasitology *35*, 117-130.

Duncan, J.L. (1974). Field Studies on Epidemiology of Mixed Strongyle Infection in Horse. Vet Rec 94, 337-345.

Dvojnos, G.M., and Harcenko, V.A. (1990). Morphology and differential diagnostics of parasitic larvae of some Strongylidae (Nematoda) of horses. Angewandte Parasitologie *31*, 15-28.

Edmonds, M.D., Johnson, E.G., and Edmonds, J.D. (2010). Anthelmintic resistance of Ostertagia ostertagi and Cooperia oncophora to macrocyclic lactones in cattle from the western United States. Veterinary parasitology *170*, 224-229.

El-Abdellati, A., De Graef, J., Van Zeveren, A., Donnan, A., Skuce, P., Walsh, T., Wolstenholme, A., Tait, A., Vercruysse, J., Claerebout, E., *et al.* (2011). Altered avr-14B gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, Cooperia oncophora and Ostertagia ostertagi. International journal for parasitology *41*, 951-957.

Eng, J.K.L., Blackhall, W.J., Osei-Atweneboana, M.Y., Bourguinat, C., Galazzo, D., Beech, R.N., Unnasch, T.R., Awadzi, K., Lubega, G.W., and Prichard, R.K. (2006). Ivermectin selection on β-tubulin: Evidence in Onchocerca volvulus and Haemonchus contortus. Molecular and Biochemical Parasitology *150*, 229-235.

Eng, J.K.L., and Prichard, R.K. (2005). A comparison of genetic polymorphism in populations of Onchocerca volvulus from untreated- and ivermectin-treated patients. Molecular and Biochemical Parasitology *142*, 193-202.

English, A.W. (1979). The epidemiology of equine strongylosis in southern Queensland. 2. The survival and migration of infective larvae on herbage. Australian veterinary journal *55*, 306-309.

Espinel-Ingroff, A., Kish, C.W., Jr., Kerkering, T.M., Fromtling, R.A., Bartizal, K., Galgiani, J.N., Villareal, K., Pfaller, M.A., Gerarden, T., Rinaldi, M.G., *et al.* (1992). Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. J Clin Microbiol *30*, 3138-3145.

Eysker, M. (1997). Some aspects of inhibited development of trichostrongylids in ruminants. Veterinary parasitology *72*, 265-272; discussion 272-283.

Eysker, M., Jansen, J., and Mirck, M.H. (1984). Inhibited development of cyathostominae in the horse in the early third stage. Research in veterinary science *37*, 355-356.

Eysker, M., van Graafeiland, A.E., and Ploeger, H.W. (2006). [Resistance of Teladorsagia circumcincta in goats to ivermectin in the Netherlands]. Tijdschrift voor diergeneeskunde *131*, 358-361.

Falzon, L.C., Menzies, P.I., Shakya, K.P., Jones-Bitton, A., Vanleeuwen, J., Avula, J., Stewart, H., Jansen, J.T., Taylor, M.A., Learmount, J., *et al.* (2013). Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. Veterinary parasitology *193*, 150-162.

Fiel, C.A., Saumell, C.A., Steffan, P.E., and Rodriguez, E.M. (2001). Resistance of Cooperia to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. Veterinary parasitology *97*, 211-217.

Figler, R.A., Omote, H., Nakamoto, R.K., and Al-Shawi, M.K. (2000). Use of chemical chaperones in the yeast Saccharomyces cerevisiae to enhance heterologous membrane protein expression: high-yield expression and purification of human P-glycoprotein. Archives of biochemistry and biophysics *376*, 34-46.

Fischer, J.K., Hinney, B., Denwood, M.J., Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., and Clausen, P.H. (2015). Efficacy of selected anthelmintic drugs against cyathostomins in horses in the federal state of Brandenburg, Germany. Parasitol Res *114*, 4441-4450.

Fisher, M.A., Jacobs, D.E., Grimshaw, W.T., and Gibbons, L.M. (1992). Prevalence of benzimidazole-resistance in equine cyathostome populations in south east England. Vet Rec *130*, 315-318.

Floren, L.C., Bekersky, I., Benet, L.Z., Mekki, Q., Dressler, D., Lee, J.W., Roberts, J.P., and Hebert, M.F. (1997). Tacrolimus oral bioavailability doubles with coadministration of ketoconazole[ast]. Clin Pharmacol Ther *62*, 41-49.

Ford, J.M., and Hait, W.N. (1990). Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. Pharmacological reviews 42, 155-199.

Forrester, S.G., Hamdan, F.F., Prichard, R.K., and Beech, R.N. (1999). Cloning, sequencing, and developmental expression levels of a novel glutamate-gated chloride channel homologue in the parasitic nematode Haemonchus contortus. Biochemical and biophysical research communications *254*, 529-534.

Forrester, S.G., Prichard, R.K., and Beech, R.N. (2002). A glutamate-gated chloride channel subunit from Haemonchus contortus: expression in a mammalian cell line, ligand binding, and modulation of anthelmintic binding by glutamate. Biochemical pharmacology *63*, 1061-1068.

Garcia, A., Brady, H.A., Nichols, W.T., and Prien, S. (2013). Equine Cyathostomin Resistance to Fenbendazole in Texas Horse Facilities. Journal of Equine Veterinary Science *33*, 223-228.

Gasbarre, L.C., Smith, L.L., Lichtenfels, J.R., and Pilitt, P.A. (2009). The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. Veterinary parasitology *166*, 281-285.

Gasser, R.B., Stevenson, L.A., Chilton, N.B., Nansen, P., Bucknell, D.G., and Beveridge, I. (1996). Species markers for equine strongyles detected in intergenic rDNA by PCR-RFLP. Molecular and Cellular Probes *10*, 371-378.

Gawor, J.J. (1995). The prevalence and abundance of internal parasites in working horses autopsied in Poland. Veterinary parasitology *58*, 99-108.

Geurden, T., Betsch, J.M., Maillard, K., Vanimisetti, B., D'Espois, M., and Besognet, B. (2013). Determination of anthelmintic efficacy against equine cyathostomins and Parascaris equorum in France. Equine Veterinary Education *25*, 304-307.

Ghannoum, M.A., and Rice, L.B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clinical microbiology reviews *12*, 501-517.

Ghosh, R., Andersen, E.C., Shapiro, J.A., Gerke, J.P., and Kruglyak, L. (2012). Natural Variation in a Chloride Channel Subunit Confers Avermectin Resistance in C. elegans. Science *335*, 574-578.

Gibson, T.E. (1953). The Effect of Repeated Anthelmintic Treatment with Phenothiazine on the Faecal Egg Counts of Housed Horses, with Some Observations on the Life Cycle of Trichonema spp. in the Horse. J Helminthol *27*, 29-40.

Giles, C.J., Urquhart, K.A., and Longstaffe, J.A. (1985). Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): a report of 15 clinical cases. Equine veterinary journal *17*, 196-201.

Gill, J.H., Redwin, J.M., Van Wyk, J.A., and Lacey, E. (1995). Avermectin inhibition of larval development in Haemonchus contortus — Effects of ivermectin resistance. International journal for parasitology *25*, 463-470.

Gilleard, J.S. (2006). Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. International journal for parasitology *36*, 1227-1239.

Giniger, E., Varnum, S.M., and Ptashne, M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. Cell *40*, 767-774.

Godoy, P., Che, H., Beech, R.N., and Prichard, R.K. (2015a). Characterization of Haemonchus contortus P-glycoprotein-16 and its interaction with the macrocyclic lactone anthelmintics. Molecular and Biochemical Parasitology *204*, 11-15.

Godoy, P., Che, H., Beech, R.N., and Prichard, R.K. (2016). Characterisation of P-glycoprotein-9.1 in Haemonchus contortus. Parasites & Vectors 9, 52.

Godoy, P., Lian, J., Beech, R.N., and Prichard, R.K. (2015b). Haemonchus contortus P-glycoprotein-2: in situ localisation and characterisation of macrocyclic lactone transport. International journal for parasitology *45*, 85-93.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. Science 274, 546, 563-547.

Goldstein, B. (1995). Cell contacts orient some cell division axes in the Caenorhabditis elegans embryo. The Journal of cell biology *129*, 1071-1080.

González Canga, A., Sahagún Prieto, A.M., José Diez Liébana, M., Martínez, N.F., Vega, M.S., and Vieitez, J.J.G. (2009). The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. The Veterinary Journal *179*, 25-37.

Gonzalez-Canga, A., Belmar-Liberato, R., and Escribano, M. (2012). Extra-label use of ivermectin in some minor ruminant species: pharmacokinetic aspects. Current pharmaceutical biotechnology *13*, 924-935.

Good, B., Hanrahan, J.P., de Waal, D.T., Patten, T., Kinsella, A., and Lynch, C.O. (2012). Anthelmintic-resistant nematodes in Irish commercial sheep flocks- the state of play. Irish veterinary journal 65, 21.

Gottesman, M.M., and Ling, V. (2006). The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research. FEBS letters *580*, 998-1009.

Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., and Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. Nucleic acids research *38*, W695-699.

Grant, W.N., and Mascord, L.J. (1996). Beta-tubulin gene polymorphism and benzimidazole resistance in Trichostrongylus colubriformis. International journal for parasitology *26*, 71-77.

Grelck, H., Hörchner, F., and Wohrl, H.E. (1977). Evolutivity and Survival Time of Larval Stages of Equine Strongyles in Environment. Prakt Tierarzt 58, 265-268.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic biology *59*, 307-321.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series *41*, 95-98.

Hamilton, R., Watanabe, C.K., and de Boer, H.A. (1987). Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodons in Saccharomyces cerevisiae mRNAs. Nucleic acids research *15*, 3581-3593.

Harder, A. (2002). Chemotherapeutic approaches to nematodes: current knowledge and outlook. Parasitol Res *88*, 272-277.

Harmon, B.G., Ruoff, W.W., and Huey, R. (1986). Cyathostome Colitis and Typhlitis in a Filly. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian *8*, S301-S306.

Hass, D.K. (1979). Equine parasitism. Veterinary medicine, small animal clinician : VM, SAC 74, 980-988.

Hearn, F.P., and Peregrine, A.S. (2003). Identification of foals infected with Parascaris equorum apparently resistant to ivermectin. Journal of the American Veterinary Medical Association *223*, 482-485, 455.

Henessy, D.R., and Alvinerie, M.R. (2002). Pharmacokinetics of the Macrocyclic Lactones: Conventional Wisdom and New Paradigms. In Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy, J. Vercruysse, und R.S. Rew, eds. (Wallington, Oxfordshire, UK: CAb International), pp. 97-133.

Herd, R.P. (1990). The Changing World of Worms: The Rise of the Cyathostomes and the Decline of *Strongylus vulgaris*. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian *12*, 732-734, 736.

Herd, R.P., and Coles, G.C. (1995). Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of horses in the United Kingdom. Vet Rec *136*, 481-485.

Herd, R.P., and Gabel, A.A. (1990). Reduced efficacy of anthelmintics in young compared with adult horses. Equine veterinary journal 22, 164-169.

Herd, R.P., and Majewski, G.A. (1994). Comparison of daily and monthly pyrantel treatment in yearling thoroughbreds and the protective effect of strategic medication of mares on their foals. Veterinary parasitology *55*, 93-104.

Herd, R.P., Miller, T.B., and Gabel, A.A. (1981). A field evaluation of pro-benzimidazole, benzimidazole, and non-benzimidazole anthelmintics in horses. Journal of the American Veterinary Medical Association *179*, 686-691.

Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol 8, 67-113.

Higgins, C.F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. Res Microbiol *152*, 205-210.

Higgins, C.F. (2007). Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature 446, 749-757.

Hodgkinson, J.E. (2006). Molecular diagnosis and equine parasitology.

Hodgkinson, J.E., Lichtenfels, J.R., Mair, T.S., Cripps, P., Freeman, K.L., Ramsey, Y.H., Love, S., and Matthews, J.B. (2003). A PCR-ELISA for the identification of cyathostomin fourth-stage larvae from clinical cases of larval cyathostominosis. International journal for parasitology *33*, 1427-1435.

Hoebeke, J., Van Nijen, G., and De Brabander, M. (1976). Interaction of oncodazole (R 17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin. Biochemical and biophysical research communications *69*, 319-324.

Hofmann (1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol Chem Hoppe-Seyler 374.

Hoglund, J., Gustafsson, K., Ljungstrom, B.L., Engstrom, A., Donnan, A., and Skuce, P. (2009). Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. Veterinary parasitology *161*, 60-68.

Holden-Dye, L., and Walker, R.J. (2007). Anthelmintic drugs. WormBook, ed The C elegans Research Community.

Howes, H.L., Jr. (1972). Trans-1,4,5,6-tetrahydro-2-(3-hydroxystyryl)-1-methyl pyrimidine (CP-14,445), a new antiwhipworm agent. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY) *139*, 394-398.

Huang, Y.J., and Prichard, R.K. (1999). Identification and stage-specific expression of two putative P-glycoprotein coding genes in Onchocerca volvulus. Mol Biochem Parasitol *102*, 273-281.

Hughes, P.L., Dowling, A.F., and Callinan, A.P. (2007). Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics and associated risk factors on sheep farms in the lower North Island of New Zealand. New Zealand veterinary journal *55*, 177-183.

Hung, G.C., Chilton, N.B., Beveridge, I., and Gasser, R.B. (2000). A molecular systematic framework for equine strongyles based on ribosomal DNA sequence data. International journal for parasitology *30*, 95-103.

Hung, G.C., Gasser, R.B., Beveridge, I., and Chilton, N.B. (1999). Species-specific amplification by PCR of ribosomal DNA from some equine strongyles. Parasitology *119 (Pt 1)*, 69-80.

Ihler, C.F. (1995). A field survey on anthelmintic resistance in equine small strongyles in Norway. Acta Vet Scand *36*, 135-143.

Ihler, C.F., and Bjorn, H. (1996). Use of two in vitro methods for the detection of benzimidazole resistance in equine small strongyles (Cyathostoma spp.).

Jabbar, A., Campbell, A., Charles, J., and Gasser, R. (2013). First report of anthelmintic resistance in Haemonchus contortus in alpacas in Australia. Parasites & Vectors *6*, 243.

Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M.N., and Afaq, M. (2006). Anthelmintic resistance: The state of play revisited. Life Sciences *79*, 2413-2431.

Jagannathan, S., Laughton, D.L., Critten, C.L., Skinner, T.M., Horoszok, L., and Wolstenholme, A.J. (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*, 129-140.

Jambre, L.F., and Martin, P.J. (1979). Effectiveness of morantel tartrate and naphthalophos against levamisole resistantOstertagia in sheep. Vet Res Commun *3*, 153-158.

James, C.E., and Davey, M.W. (2009). Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermeetin resistance in the model nematode Caenorhabditis elegans. International journal for parasitology *39*, 213-220.

Janssen, I.J., Krücken, J., Demeler, J., Basiaga, M., Kornas, S., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2013a). Genetic Variants and Increased Expression of Parascaris equorum P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility. PloS one *8*, e61635.

Janssen, I.J., Krücken, J., Demeler, J., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2013b). Caenorhabditis elegans: modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains. Experimental parasitology *134*, 171-177.

Janssen, I.J.I., Krücken, J., Demeler, J., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2015). Transgenically expressed Parascaris P-glycoprotein-11 can modulate ivermectin susceptibility in Caenorhabditis elegans. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance *5*, 44-47.

Jasko, D.J., and Roth, L. (1984). Granulomatous colitis associated with small strongyle larvae in a horse. Journal of the American Veterinary Medical Association *185*, 553-554.

Jeong, H., Herskowitz, I., Kroetz, D.L., and Rine, J. (2007). Function-altering SNPs in the human multidrug transporter gene ABCB1 identified using a Saccharomyces-based assay. PLoS genetics *3*, e39.

Jones, P.M., and George, A.M. (2005). Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling. International journal for parasitology *35*, 555-566.

Juliano, R.L., and Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 455, 152-162.

Kahm, M., Hasenbrink, G., Lichtenberg-Frate, H., Ludwig, J., and Kschischo, M. (2010). grofit: Fitting Biological Growth Curves with R. Journal of Statistical Software.

Kaplan, R.M. (2002). Anthelmintic resistance in nematodes of horses. Veterinary research 33, 491-507.

Kaplan, R.M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. Trends in Parasitology 20, 477-481.

Kaplan, R.M., Klei, T.R., Lyons, E.T., Lester, G., Courtney, C.H., French, D.D., Tolliver, S.C., Vidyashankar, A.N., and Zhao, Y. (2004). Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. Journal of the American Veterinary Medical Association *225*, 903-910.

Kaplan, R.M., and Matthews, J.B. (2004). Equine Cyathostomins. Veterinary parasitology 125, 203-220.

Kaplan, R.M., and Vidyashankar, A.N. (2012). An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. Veterinary parasitology *186*, 70-78.

Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G., and Ling, V. (1985). Detection of P-glycoprotein in multidrugresistant cell lines by monoclonal antibodies. Nature *316*, 820-823.

Kaschny, M., Demeler, J., Janssen, I.J., Kuzmina, T.A., Besognet, B., Kanellos, T., Kerboeuf, D., von Samson-Himmelstjerna, G., and Krucken, J. (2015). Macrocyclic lactones differ in interaction with recombinant Pglycoprotein 9 of the parasitic nematode Cylicocylus elongatus and ketoconazole in a yeast growth assay. PLoS pathogens *11*, e1004781. Kaye, J.N., Love, S., Lichtenfels, J.R., and McKeand, J.B. (1998). Comparative sequence analysis of the intergenic spacer region of cyathostome species. International journal for parasitology *28*, 831-836.

Kelly, J.D., Webster, J.H., Griffin, D.L., Whitlock, H.V., Martin, I.C.A., and Gunawan, M. (1981). RESISTANCE TO BENZIMIDAZOLE ANTHELMINTICS IN EQUINE STRONGYLES. Australian veterinary journal *57*, 163-171.

Kenworthy, J. (2013). P-Glycoprotein Genes in Haemonchus Contortus (Bath: University of Bath), pp. 147.

Kerboeuf, D., Blackhall, W., Kaminsky, R., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2003). P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. International journal of antimicrobial agents *22*, 332-346.

Kerboeuf, D., Chambrier, P., Le Vern, Y., and Aycardi, J. (1999). Flow cytometry analysis of drug transport mechanisms in Haemonchus contortus susceptible or resistant to anthelmintics. Parasitol Res *85*, 118-123.

Kerboeuf, D., and Guegnard, F. (2011). Anthelmintics are substrates and activators of nematode P glycoprotein. Antimicrobial agents and chemotherapy *55*, 2224-2232.

Kerr, I.D., Jones, P.M., and George, A.M. (2010). Multidrug efflux pumps: the structures of prokaryotic ATPbinding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues. The FEBS journal 277, 550-563.

Khakh, B.S., Proctor, W.R., Dunwiddie, T.V., Labarca, C., and Lester, H.A. (1999). Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *19*, 7289-7299.

Kiki-Mvouaka, S., Menez, C., Borin, C., Lyazrhi, F., Foucaud-Vignault, M., Dupuy, J., Collet, X., Alvinerie, M., and Lespine, A. (2010). Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: A comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals *38*, 573-580.

Klein, J.B., Bradley, R.E., Sr., and Conway, D.P. (1978). Anthelmintic efficacy of pyrantel pamoate against the roundworm, Toxocara canis, and the hookworm, ancylostoma caninum, in dogs. Veterinary medicine, small animal clinician : VM, SAC 73, 1011-1013.

Klokouzas, A., Shahi, S., Hladky, S.B., Barrand, M.A., and van Veen, H.W. (2003). ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. International journal of antimicrobial agents *22*, 301-317.

Köhler, P., and Bachmann, R. (1981). Intestinal tubulin as possible target for the chemotherapeutic action of mebendazole in parasitic nematodes. Molecular and Biochemical Parasitology *4*, 325-336.

Kolaczkowska, A., Kolaczkowski, M., Goffeau, A., and Moye-Rowley, W.S. (2008). Compensatory activation of the multidrug transporters Pdr5p, Snq2p, and Yor1p by Pdr1p in Saccharomyces cerevisiae. FEBS letters *582*, 977-983.

Königová, A., Várady, M., and Čorba, J. (2003). Comparison of in vitro methods and faecal egg count reduction test for the detection of benzimidazole resistance in small strongyles of horses. Veterinary Research Communications *27*, 281-288.

Kopp, S.R., Kotze, A.C., McCarthy, J.S., and Coleman, G.T. (2007). High-level pyrantel resistance in the hookworm Ancylostoma caninum. Veterinary parasitology *143*, 299-304.

Kopp, S.R., Kotze, A.C., McCarthy, J.S., Traub, R.J., and Coleman, G.T. (2008). Pyrantel in small animal medicine: 30 years on. Veterinary journal (London, England : 1997) *178*, 177-184.

Kose, M., Kozan, E., Sevimli, F.K., and Eser, M. (2007). The resistance of nematode parasites in sheep against anthelmintic drugs widely used in Western Turkey. Parasitol Res *101*, 563-567.

Krause, R.M., Buisson, B., Bertrand, S., Corringer, P.J., Galzi, J.L., Changeux, J.P., and Bertrand, D. (1998). Ivermeetin: A positive allosteric effector of the α 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Molecular pharmacology *53*, 283-294.

Krecek, R.C., Guthrie, A.J., Van Nieuwenhuizen, L.C., and Booth, L.M. (1994). A comparison between the effects of conventional and selective antiparasitic treatments on nematode parasites of horses from two management schemes. Journal of the South African Veterinary Association *65*, 97-100.

Kuchler, K., and Thorner, J. (1992). Functional expression of human mdr1 in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *89*, 2302-2306.

Kurz, C.L., Shapira, M., Chen, K., Baillie, D.L., and Tan, M.W. (2007). Caenorhabditis elegans pgp-5 is involved in resistance to bacterial infection and heavy metal and its regulation requires TIR-1 and a p38 map kinase cascade. Biochemical and biophysical research communications *363*, 438-443.

Kuzmina, T.A., and Kharchenko, V.O. (2008). Anthelmintic resistance in cyathostomins of brood horses in Ukraine and influence of anthelmintic treatments on strongylid community structure. Veterinary parasitology *154*, 277-288.

Kwa, M.S., Okoli, M.N., Schulz-Key, H., Okongkwo, P.O., and Roos, M.H. (1998). Use of P-glycoprotein gene probes to investigate anthelmintic resistance in Haemonchus contortus and comparison with Onchocerca volvulus. International journal for parasitology *28*, 1235-1240.

Kwa, M.S., Veenstra, J.G., Van Dijk, M., and Roos, M.H. (1995). Beta-tubulin genes from the parasitic nematode Haemonchus contortus modulate drug resistance in Caenorhabditis elegans. Journal of molecular biology *246*, 500-510.

Kwa, M.S.G., Veenstra, J.G., and Roos, M.H. (1993). Molecular characterisation of β -tubulin genes present in benzimidazole-resistant populations of Haemonchus contortus. Molecular and Biochemical Parasitology *60*, 133-143.

Lacey, E. (1988). The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. International journal for parasitology *18*, 885-936.

Lacey, E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. Parasitology Today 6, 112-115.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics *23*, 2947-2948.

Larsen, J. (1997). Acute colitis in adult horses. A review with emphasis on aetiology and pathogenesis. The Veterinary quarterly *19*, 72-80.

Larsen, M.L., Ritz, C., Petersen, S.L., and Nielsen, M.K. (2011). Determination of ivermectin efficacy against cyathostomins and Parascaris equorum on horse farms using selective therapy. The Veterinary Journal *188*, 44-47.

Laugier, C., Sevin, C., Ménard, S., and 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. Veterinary parasitology *188*, 185-189.

Lawson, J., O'Mara, M.L., and Kerr, I.D. (2008). Structure-based interpretation of the mutagenesis database for the nucleotide binding domains of P-glycoprotein. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes *1778*, 376-391.

Le Jambre, L.F. (1976). Egg hatch as an in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes. Veterinary parasitology *2*, 385-391.

Lee, S.H., and Altenberg, G.A. (2003). Expression of functional multidrug-resistance protein 1 in Saccharomyces cerevisiae: effects of N- and C-terminal affinity tags. Biochemical and biophysical research communications *306*, 644-649.

Lespine, A., Alvinerie, M., Vercruysse, J., Prichard, R.K., and Geldhof, P. (2008). ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. Trends Parasitol *24*, 293-298.

Lespine, A., Martin, S., Dupuy, J., Roulet, A., Pineau, T., Orlowski, S., and Alvinerie, M. (2007). Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: Structure–affinity relationship. European Journal of Pharmaceutical Sciences *30*, 84-94.

Lester, H.E., Spanton, J., Stratford, C.H., Bartley, D.J., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Coumbe, K., Mair, T., Swan, B., Lemon, G., *et al.* (2013a). Anthelmintic efficacy against cyathostomins in horses in Southern England. Veterinary parasitology *197*, 189-196.

Lester, H.E., Spanton, J., Stratford, C.H., Bartley, D.J., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Coumbe, K., Mair, T., Swan, B., Lemon, G., *et al.* (2013b). Anthelmintic efficacy against cyathostomins in horses in Southern England. Veterinary parasitology.

Lichtenfels, J.R. (2008). Identification keys to strongylid nematode parasites of equids. Preface. Veterinary parasitology *156*, 1-3.

Lichtenfels, J.R., Gibbons, L.M., and Krecek, R.C. (2002). Recommended terminology and advances in the systematics of the Cyathostominea (Nematoda: Strongyloidea) of horses. Veterinary parasitology *107*, 337-342.

Lichtenfels, J.R., Kharchenko, V.A., and Dvojnos, G.M. (2008). Illustrated identification keys to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). Veterinary parasitology *156*, 4-161.

Lichtenfels, R.J. (1975). Helminths of Domestic Equids: Illustrated Keys to Genera and Species with Emphasis on North American Forms. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 42, v-92 pp.

Lim, L.E., Vilcheze, C., Ng, C., Jacobs, W.R., Jr., Ramon-Garcia, S., and Thompson, C.J. (2013). Anthelmintic avermeetins kill Mycobacterium tuberculosis, including multidrug-resistant clinical strains. Antimicrobial agents and chemotherapy *57*, 1040-1046.

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

Lincke, C.R., The, I., van Groenigen, M., and Borst, P. (1992). The P-glycoprotein gene family of Caenorhabditis elegans. Cloning and characterization of genomic and complementary DNA sequences. Journal of molecular biology *228*, 701-711.

Lind, E., and Christensson, D. (2009). Anthelmintic efficacy on Parascaris equorum in foals on Swedish studs. Acta Vet Scand 51, 1-4.

Lind, E.O., Kuzmina, T., Uggla, A., Waller, P.J., and Hoglund, J. (2007). A field study on the effect of some anthelmintics on cyathostomins of horses in sweden. Vet Res Commun *31*, 53-65.

Lind, E.O., Uggla, A., Waller, P., and Höglund, J. (2005). Larval development assay for detection of anthelmintic resistance in cyathostomins of Swedish horses. Veterinary parasitology *128*, 261-269.

Lindgren, K., Ljungvall, Ö., Nilsson, O., Ljungström, B.L., Lindahl, C., and Höglund, J. (2008). Parascaris equorum in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. Veterinary parasitology *151*, 337-343.

Lindquist, W.D. (1975). Drug evaluation of pyrantel pamoate against Ancylostoma, Toxocara, and Toxascaris in eleven dogs. American journal of veterinary research *36*, 1387-1389.

Linton, K.J. (2007). Structure and function of ABC transporters. Physiology (Bethesda) 22, 122-130.

Little, D., Flowers, J.R., Hammerberg, B.H., and Gardner, S.Y. (2003). Management of drug-resistant cyathostominosis on a breeding farm in central North Carolina. Equine veterinary journal *35*, 246-251.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., and Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. Journal of biomedicine & biotechnology *2012*, 251364.

Loh, E.Y., Elliott, J.F., Cwirla, S., Lanier, L.L., and Davis, M.M. (1989). Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain. Science 243, 217-220.

Love, S., and Duncan, J.L. (1992). The development of naturally acquired cyathostome infection in ponies. Veterinary parasitology *44*, 127-142.

Love, S., Murphy, D., and Mellor, D. (1999). Pathogenicity of cyathostome infection. Veterinary parasitology *85*, 113-121; discussion 121-112, 215-125.

Lugo, M.R., and Sharom, F.J. (2005). Interaction of LDS-751 and rhodamine 123 with P-glycoprotein: evidence for simultaneous binding of both drugs. Biochemistry *44*, 14020-14029.

Lumaret, J.P., Errouissi, F., Floate, K., Rombke, J., and Wardhaugh, K. (2012). A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. Current pharmaceutical biotechnology *13*, 1004-1060.

Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Tacca, M.D., and Kelly, S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. Trends in Molecular Medicine *8*, 76-81.

Lynagh, T., and Lynch, J.W. (2012). Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors. Trends in pharmacological sciences.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., and Collins, S.S. (2009). Probable reason why small strongyle EPG counts are returning "early" after ivermectin treatment of horses on a farm in Central Kentucky. Parasitol Res *104*, 569-574.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Collins, S.S., Ionita, M., Kuzmina, T.A., and Rossano, M. (2011). Field tests demonstrating reduced activity of ivermectin and moxidectin against small strongyles in horses on 14 farms in Central Kentucky in 2007-2009. Parasitol Res *108*, 355-360.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., and Drudge, J.H. (1999). Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. Veterinary parasitology *85*, 97-112.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Collins, S.S., and Swerczek, T.W. (2001). Continuance of studies on Population S benzimidazole-resistant small strongyles in a Shetland pony herd in Kentucky: effect of pyrantel pamoate (1992-1999). Veterinary parasitology *94*, 247-256.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Stamper, S., Swerczek, T.W., and Granstrom, D.E. (1996a). Critical test evaluation (1977-1992) of drug efficacy against endoparasites featuring benzimidazole-resistant small strongyles (population S) in Shetland ponies. Veterinary parasitology *66*, 67-73.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Stamper, S., Swerczek, T.W., and Granstrom, D.E. (1996b). Critical test evaluation (1977–1992) of drug efficacy against endoparasites featuring benzimidazole-resistant small strongyles (Population S) in Shetland ponies. Veterinary parasitology *66*, 67-73.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Ionita, M., and Collins, S.S. (2008a). Evaluation of parasiticidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxibendazole, 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*, 287-291.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Ionita, M., Lewellen, A., and Collins, S.S. (2008b). Field studies indicating reduced activity of ivermectin on small strongyles in horses on a farm in Central Kentucky. Parasitol Res *103*, 209-215.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Kuzmina, T.A., and Collins, S.S. (2010). Critical tests evaluating efficacy of moxidectin against small strongyles in horses from a herd for which reduced activity had been found in field tests in Central Kentucky. Parasitol Res *107*, 1495-1498.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Rathgeber, R.A., and Collins, S.S. (2007). Parasite field study in central Kentucky on thoroughbred foals (born in 2004) treated with pyrantel tartrate daily and other parasiticides periodically. Parasitol Res *100*, 473-478.

Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans pathogenesis model. Cell *96*, 47-56.

Mair, T.S. (1993). Recurrent diarrhoea in aged ponies associated with larval cyathostomiasis. Equine veterinary journal 25, 161-163.

Mair, T.S. (1994). Outbreak of larval cyathostomiasis among a group of yearling and two-year-old horses. Vet Rec 135, 598-600.

Mair, T.S., Sutton, D.G., and Love, S. (2000). Caecocaecal and caecocolic intussusceptions associated with larval cyathostomosis in four young horses. Equine veterinary journal Supplement, 77-80.

Mao, Q., and Scarborough, G.A. (1997). Purification of functional human P-glycoprotein expressed in Saccharomyces cerevisiae. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes *1327*, 107-118.

Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., *et al.* (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. Nucleic acids research *39*, D225-229.

Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., *et al.* (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. Nucleic acids research *41*, D348-352.

Martin, P.J., Anderson, N., and Jarrett, R.G. (1989). Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. Australian veterinary journal *66*, 236-240.

Martin, R.J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. Veterinary journal (London, England : 1997) 154, 11-34.

Martin, R.J., Clark, C.L., Trailovic, S.M., and Robertson, A.P. (2004). Oxantel is an N-type (methyridine and nicotine) agonist not an L-type (levamisole and pyrantel) agonist: classification of cholinergic anthelmintics in Ascaris. International journal for parasitology *34*, 1083-1090.

Martin, R.J., and Robertson, A.P. (2007). Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. Parasitology *134*, 1093-1104.

Martin, R.J., Robertson, A.P., Buxton, S.K., Beech, R.N., Charvet, C.L., and Neveu, C. (2012). Levamisole receptors: a second awakening. Trends Parasitol 28, 289-296.

Martin-Downum, K., Yazwinski, T., Tucker, C., Fincher, M., Ralph, J., and Hamilton, J. (2001). Cyathostome fecal egg count trends in horses treated with moxidectin, ivermectin or fenbendazole. Veterinary parasitology *101*, 75-79.

Mason, P.C., and McKay, C.H. (2006). Field studies investigating anthelmintic resistance in young cattle on five farms in New Zealand. New Zealand veterinary journal *54*, 318-322.

Matouskova, P., Vokral, I., Lamka, J., and Skalova, L. (2016). The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. Trends Parasitol *32*, 481-491.

Matthews, J.B. (2008). An update on cyathostomins: Anthelmintic resistance and worm control. Equine Veterinary Education *20*, 552-560.

Matthews, J.B. (2011). Facing the threat of equine parasitic disease. Equine veterinary journal 43, 126-132.

Matthews, J.B., Hodgkinson, J.E., Dowdall, S.M., and Proudman, C.J. (2004). Recent developments in research into the Cyathostominae and Anoplocephala perfoliata. Veterinary research *35*, 371-381.

Maurice, M., Pichard, L., Daujat, M., Fabre, I., Joyeux, H., Domergue, J., and Maurel, P. (1992). Effects of imidazole derivatives on cytochromes P450 from human hepatocytes in primary culture. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *6*, 752-758.

McArthur, C.L., Bartley, D.J., Shaw, D.J., and Matthews, J.B. (2011). Assessment of ivermectin efficacy against gastrointestinal nematodes in cattle on four Scottish farms. Vet Rec *169*, 658.

McDonnell, A., Love, S., Tait, A., Lichtenfels, J.R., and Matthews, J.B. (2000). Phylogenetic analysis of partial mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I and large ribosomal RNA sequences and nuclear internal transcribed spacer I sequences from species of Cyathostominae and Strongylinae (Nematoda, Order Strongylida), parasites of the horse. Parasitology *121 Pt 6*, 649-659.

McKellar, Q.A., and Scott, E.W. (1990). The benzimidazole anthelmintic agents--a review. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics *13*, 223-247.

McKenna, P.B. (1985). The efficacy of levamisole and ivermectin against a morantel-resistant strain of Trichostrongylus colubriformis. New Zealand veterinary journal *33*, 198-199.

Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M., and Cantor, G.H. (2001). Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the mdr1 gene. Pharmacogenetics *11*, 727-733.

Mechetner, E.B., Schott, B., Morse, B.S., Stein, W.D., Druley, T., Davis, K.A., Tsuruo, T., and Roninson, I.B. (1997). P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity. Proceedings of the National Academy of Sciences *94*, 12908-12913.

Meier, A., and Hertzberg, H. (2005). Strongyliden beim Pferd. II. Vorkommen von Anthelminthika-Resistenzen in der Schweiz. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 147, 389-396.

Menon, R., Gasser, R.B., Mitreva, M., and Ranganathan, S. (2012). An analysis of the transcriptome of Teladorsagia circumcineta: its biological and biotechnological implications. BMC genomics *13 Suppl 7*, S10.

Milillo, P., Boeckh, A., Cobb, R., Otranto, D., Lia, R.P., Perrucci, S., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., *et al.* (2009). Faecal Cyathostomin Egg Count distribution and efficacy of anthelmintics against cyathostomins in Italy: a matter of geography? Parasit Vectors *2 Suppl 2*, S4.

Miltsch, S.M., Krücken, J., Demeler, J., Janssen, I.J., Kruger, N., Harder, A., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2012). Decreased emodepside sensitivity in unc-49 gamma-aminobutyric acid (GABA)-receptor-deficient Caenorhabditis elegans. International journal for parasitology *42*, 761-770.

Mitchell, E.S., Hunt, K.R., Wood, R., and McLean, B. (2010). Anthelmintic resistance on sheep farms in Wales. Vet Rec *166*, 650-652.

Molento, M.B., Antunes, J., Bentes, R.N., and Coles, G.C. (2008). Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. Vet Rec 162, 384-385.

Molento, M.B., Depner, R.A., and Mello, M.H. (2006). Suppressive treatment of abamectin against Dictyocaulus viviparus and the occurrence of resistance in first-grazing-season calves. Veterinary parasitology *141*, 373-376.

Molento, M.B., Nielsen, M.K., and Kaplan, R.M. (2012). Resistance to avermectin/milbemycin anthelmintics in equine cyathostomins - current situation. Veterinary parasitology *185*, 16-24.

Mottier, M.d.L., and Prichard, R.K. (2008). Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on Haemonchus contortus. Pharmacogenetics and genomics *18*, 129-140 110.1097/FPC.1090b1013e3282f4711d.

Muhammed Ameen, S., and Drancourt, M. (2013). Ivermectin lacks antituberculous activity. The Journal of antimicrobial chemotherapy *68*, 1936-1937.

Murphy, D., and Love, S. (1997). The pathogenic effects of experimental cyathostome infections in ponies. Veterinary parasitology *70*, 99-110.

Nana-Djeunga, H., Bourguinat, C., Pion, S.D.S., Kamgno, J., Gardon, J., Njiokou, F., Boussinesq, M., and Prichard, R.K. (2012). Single nucleotide polymorphisms in β -tubulin selected in Onchocerca volvulus following repeated ivermectin treatment: Possible indication of resistance selection. Molecular and Biochemical Parasitology *185*, 10-18.

Näreaho, A., Vainio, K., and Oksanen, A. (2011). Impaired efficacy of ivermectin against Parascaris equorum, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland. Veterinary parasitology *182*, 372-377.

Neveu, C., Charvet, C.L., Fauvin, A., Cortet, J., Beech, R.N., and Cabaret, J. (2010). Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated transcripts associated with resistance. Pharmacogenetics and genomics *20*, 414-425.

Niimi, M., Wada, S., Tanabe, K., Kaneko, A., Takano, Y., Umeyama, T., Hanaoka, N., Uehara, Y., Lamping, E., Niimi, K., *et al.* (2005). Functional analysis of fungal drug efflux transporters by heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae. Japanese journal of infectious diseases *58*, 1-7.

Nilsson, O., Lindholm, A., and Christensson, D. (1989). A field evaluation of anthelmintics in horses in Sweden. Veterinary parasitology *32*, 163-171.

Njue, A.I., Hayashi, J., Kinne, L., Feng, X.P., and Prichard, R.K. (2004). Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel alpha3 and beta subunits from ivermectin-resistant Cooperia oncophora affect agonist sensitivity. Journal of neurochemistry *89*, 1137-1147.

Njue, A.I., and Prichard, R.K. (2004). Genetic variability of glutamate-gated chloride channel genes in ivermectin-susceptible and -resistant strains of Cooperia oncophora. Parasitology *129*, 741-751.

Ogbourne, C.P. (1973). Survival on Herbage Plots of Infective Larvae of Strongylid Nematodes of Horse. J Helminthol 47, 9-16.

Ohara, O., Dorit, R.L., and Gilbert, W. (1989). One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *86*, 5673-5677.

Omura, S., and Crump, A. (2004). The life and times of ivermectin - a success story. Nature reviews Microbiology *2*, 984-989.

Operations, C. (2004). Clone Manager Suite. Cloning 1.

Orpin, P. (2010). Potential avermectin resistance in a cattle herd. Vet Rec 167, 69-70.

Papadopoulos, E., Gallidis, E., and Ptochos, S. (2012). Anthelmintic resistance in sheep in Europe: a selected review. Veterinary parasitology 189, 85-88.

Papaefthimiou, C., de Guadalupe Cabral, M., Mixailidou, C., Viegas, C.A., Sá-Correia, I., and Theophilidis, G. (2004). Comparison of two screening bioassays, based on the frog sciatic nerve and yeast cells, for the assessment of herbicide toxicity. Environmental Toxicology and Chemistry *23*, 1211-1218.

Pape, M. (2001). Molekulare Untersuchungen zur Benzimidazolresistenz bei den kleinen Strongyliden der Pferde (Hannover: Tierärztl. Hochsch.), pp. 143.

Pape, M., Posedi, J., Failing, K., Schnieder, T., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2003). Analysis of the betatubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-susceptible and -resistant cyathostome population. Parasitology *127*, 53-59.

Peregrine, A.S., McEwen, B., Bienzle, D., Koch, T.G., and Weese, J.S. (2006). Larval cyathostominosis in horses in Ontario: an emerging disease? The Canadian veterinary journal La revue veterinaire canadienne *47*, 80-82.

Pettengill, M.A., Lam, V.W., Ollawa, I., Marques-da-Silva, C., and Ojcius, D.M. (2012). Ivermectin inhibits growth of Chlamydia trachomatis in epithelial cells. PloS one 7, e48456.

Pook, J.F., Power, M.L., Sangster, N.C., Hodgson, J.L., and Hodgson, D.R. (2002). Evaluation of tests for anthelmintic resistance in cyathostomes. Veterinary parasitology *106*, 331-343.

Prasad, R., and Goffeau, A. (2012). Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. Annual review of microbiology *66*, 39-63.

Prichard, R. (2001). Genetic variability following selection of Haemonchus contortus with anthelmintics. Trends in Parasitology *17*, 445-453.

Prichard, R.K. (1990). Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. International journal for parasitology *20*, 515-523.

Prichard, R.K., Hall, C.A., Kelly, J.D., Martin, I.C., and Donald, A.D. (1980). The problem of anthelmintic resistance in nematodes. Australian veterinary journal *56*, 239-251.

Proudman, C., and Matthews, J. (2000). Control of intestinal parasites in horses. In Practice 22, 90-97.

Qian, H., Robertson, A.P., Powell-Coffman, J.A., and Martin, R.J. (2008). Levamisole resistance resolved at the single-channel level in Caenorhabditis elegans. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *22*, 3247-3254.

Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P., and Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC genomics *13*, 341.
R Development Core Team (2011). A language and environment for statistical computing (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing).

Rajasekariah, G.R., Deb, B.N., Jones, M.P., Dhage, K.R., and Bose, S. (1991). Response of pre-adult and adult stages of Trichuris muris to common anthelmintics in mice. International journal for parasitology *21*, 697-702.

Rautio, J., Humphreys, J.E., Webster, L.O., Balakrishnan, A., Keogh, J.P., Kunta, J.R., Serabjit-Singh, C.J., and Polli, J.W. (2006). In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals *34*, 786-792.

Rayes, D., De Rosa, M.a.J., Spitzmaul, G., and Bouzat, C. (2001). The anthelmintic pyrantel acts as a low efficacious agonist and an open-channel blocker of mammalian acetylcholine receptors. Neuropharmacology *41*, 238-245.

Rees, D.C., Johnson, E., and Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. Nature reviews Molecular cell biology *10*, 218-227.

Reid, S.W., Mair, T.S., Hillyer, M.H., and Love, S. (1995). Epidemiological risk factors associated with a diagnosis of clinical cyathostomiasis in the horse. Equine veterinary journal *27*, 127-130.

Reilly, G.A., Cassidy, J.P., and Taylor, S.M. (1993). Two fatal cases of diarrhoea in horses associated with larvae of the small strongyles. Vet Rec *132*, 267-268.

Reinemeyer, C.R. (1986). Small strongyles. Recent advances. The Veterinary clinics of North America Equine practice 2, 281-312.

Reinemeyer, C.R., Smith, S.A., Gabel, A.A., and Herd, R.P. (1984). The prevalence and intensity of internal parasites of horses in the U.S.A. Veterinary parasitology *15*, 75-83.

Relf, V.E., Lester, H.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., and Matthews, J.B. (2014). Anthelmintic efficacy on UK Thoroughbred stud farms. International journal for parasitology *44*, 507-514.

Robertson, A.P., Bjørn, H.E., and Martin, R.J. (2000). Pyrantel resistance alters nematode nicotinic acetylcholine receptor single-channel properties. Eur J Pharmacol *394*, 1-8.

Roepstorff, A., Bjorn, H., and Nansen, P. (1987). Resistance of Oesophagostomum spp. in pigs to pyrantel citrate. Veterinary parasitology 24, 229-239.

Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczkowski, M., Carvajal, E., Balzi, E., and Goffeau, A. (2001). The pleitropic drug ABC transporters from Saccharomyces cerevisiae. Journal of molecular microbiology and biotechnology *3*, 207-214.

Roos, M.H., Kwa, M.S.G., and Grant, W.N. (1995). New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. Parasitology Today 11, 148-150.

Roos, M.H., Kwa, M.S.G., Veenstra, J.G., Kooyman, F.N.J., and Boersema, J.H. (1993). Molecular aspects of drug resistance in parasitic helminths. Pharmacology & Therapeutics *60*, 331-336.

Rossano, M.G., Smith, A.R., and Lyons, E.T. (2010). Shortened strongyle-type egg reappearance periods in naturally infected horses treated with moxidectin and failure of a larvicidal dose of fenbendazole to reduce fecal egg counts. Veterinary parasitology *173*, 349-352.

Roulet, A., Puel, O., Gesta, S., Lepage, J.F., Drag, M., Soll, M., Alvinerie, M., and Pineau, T. (2003). MDR1deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. Eur J Pharmacol *460*, 85-91. Salphati, L., and Benet, L.Z. (1998). Effects of ketoconazole on digoxin absorption and disposition in rat. Pharmacology *56*, 308-313.

Sanchez, C.P., Rotmann, A., Stein, W.D., and Lanzer, M. (2008). Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in Plasmodium falciparum. Molecular microbiology *70*, 786-798.

Sangster, N.C. (1994). P-glycoproteins in nematodes. Parasitology today (Personal ed) 10, 319-322.

Sangster, N.C. (1999a). Anthelmintic resistance: past, present and future. International journal for parasitology 29, 115-124; discussion 137-118.

Sangster, N.C. (1999b). Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? Veterinary parasitology *85*, 189-204.

Sangster, N.C. (2001). Managing parasiticide resistance. Veterinary parasitology 98, 89-109.

Sangster, N.C., Bannan, S.C., Weiss, A.S., Nulf, S.C., Klein, R.D., and Geary, T.G. (1999). Haemonchus contortus: sequence heterogeneity of internucleotide binding domains from P-glycoproteins. Experimental parasitology *91*, 250-257.

Sangster, N.C., and Dobson, R.J. (2002). Anthelmintic resistance. In The Biology of Nematodes, D.L. Lee, ed. (London and New York: Taylor and Francis), pp. 531-567.

Sangster, N.C., and Gill, J. (1999). Pharmacology of Anthelmintic Resistance. Parasitology Today 15, 141-146.

Sangster, N.C., Whitlock, H.V., Russ, I.G., Gunawan, M., Griffin, D.L., and Kelly, J.D. (1979). Trichostrongylus colubriformis and Ostertagia circumcincta resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains. Research in veterinary science *27*, 106-110.

Sargison, N.D., Jackson, F., Bartley, D.J., and Moir, A.C. (2005). Failure of moxidectin to control benzimidazole-, levamisole- and ivermectin-resistant Teladorsagia circumcinda in a sheep flock. Vet Rec *156*, 105-109.

Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G., and Varadi, A. (2006). Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. Physiological reviews *86*, 1179-1236.

Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P., and Milon, A. (2003). Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. CMLS, Cell Mol Life Sci *60*, 1529-1546.

Saunders, G.I., Wasmuth, J.D., Beech, R., Laing, R., Hunt, M., Naghra, H., Cotton, J.A., Berriman, M., Britton, C., and Gilleard, J.S. (2013). Characterization and comparative analysis of the complete Haemonchus contortus β -tubulin gene family and implications for benzimidazole resistance in strongylid nematodes. International journal for parasitology *43*, 465-475.

Schinkel, A.H., Smit, J.J.M., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A.A.M., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P.J., *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.

Schougaard, H., and Nielsen, M.K. (2007). Apparent ivermectin resistance of Parascaris equorum in foals in Denmark. Vet Rec *160*, 439-440.

Scott, E.W., Kinabo, L.D., and McKellar, Q.A. (1990). Pharmacokinetics of ivermectin after oral or percutaneous administration to adult milking goats. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics *13*, 432-435.

Scott, I., Bishop, R.M., and Pomroy, W.E. (2015). Anthelmintic resistance in equine helminth parasites - a growing issue for horse owners and veterinarians in New Zealand? New Zealand veterinary journal *63*, 188-198.

Shan, Q., Haddrill, J.L., and Lynch, J.W. (2001). Ivermectin, an unconventional agonist of the glycine receptor chloride channel. The Journal of biological chemistry *276*, 12556-12564.

Shapiro, A.B., Fox, K., Lam, P., and Ling, V. (1999). Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. European Journal of Biochemistry 259, 841-850.

Sharom, F.J. (2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. Essays in biochemistry 50, 161-178.

Sharp, P.M., Tuohy, T.M., and Mosurski, K.R. (1986). Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. Nucleic acids research *14*, 5125-5143.

Sheps, J.A., Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D.L., and Ling, V. (2004a). The ABC transporter gene family of Caenorhabditis elegans has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. Genome biology *5*, 1-17.

Sheps, J.A., Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D.L., and Ling, V. (2004b). The ABC transporter gene family of Caenorhabditis elegans has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. Genome biology *5*, R15.

Shoop, W.L., Mrozik, H., and Fisher, M.H. (1995a). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. Veterinary parasitology *59*, 139-156.

Shoop, W.L., Ostlind, D.A., Rohrer, S.P., Mickle, G., Haines, H.W., Michael, B.F., Mrozik, H., and Fisher, M.H. (1995b). Avermeetins and milbemycins against Fasciola hepatica: In vivo drug efficacy and in Vitro receptor binding. International journal for parasitology *25*, 923-927.

Silva, L.V., Sanguinetti, M., Vandeputte, P., Torelli, R., Rochat, B., and Sanglard, D. (2013). Milbemycins: more than efflux inhibitors for fungal pathogens. Antimicrobial agents and chemotherapy *57*, 873-886.

Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R.J., Carvalho, F., de Lourdes Bastos, M., and Remião, F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. Pharmacology & Therapeutics *149*, 1-123.

Silvestre, A., and Cabaret, J. (2002). Mutation in position 167 of isotype 1 β -tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? Molecular and Biochemical Parasitology *120*, 297-300.

Silvestre, A., and Humbert, J.F. (2002). Diversity of benzimidazole-resistance alleles in populations of small ruminant parasites. International journal for parasitology *32*, 921-928.

Sipos, G., and Kuchler, K. (2006). Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification. Current drug targets 7, 471-481.

Sissay, M.M., Asefa, A., Uggla, A., and Waller, P.J. (2006). Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: exploitation of refugia to restore anthelmintic efficacy. Veterinary parasitology *135*, 337-346.

Slocombe, J.O., and Cote, J.F. (1977). Small strongyles of horses with cross resistance to benzimidazole anthelmintics and susceptibility to unrelated compounds. The Canadian veterinary journal La revue veterinaire canadienne *18*, 212-217.

Slocombe, J.O., and de Gannes, R.V. (2006). Cyathostomes in horses in Canada resistant to pyrantel salts and effectively removed by moxidectin. Veterinary parasitology *140*, 181-184.

Slocombe, J.O., de Gannes, R.V., and Lake, M.C. (2007). Macrocyclic lactone-resistant Parascaris equorum on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. Veterinary parasitology *145*, 371-376.

Smets, K., Shaw, D.J., Deprez, P., and Vercruysse, J. (1999). Diagnosis of larval cyathostominosis in horses in Belgium. Vet Rec 144, 665-668.

Smith, M.A., Nolan, T.J., Rieger, R., Aceto, H., Levine, D.G., Nolen-Walston, R., and Smith, B.I. (2015). Efficacy of major anthelmintics for reduction of fecal shedding of strongyle-type eggs in horses in the Mid-Atlantic region of the United States. Veterinary parasitology *214*, 139-143.

Stafford, K., and Coles, G.C. (1999). Nematode control practices and anthelmintic resistance in dairy calves in the south west of England. Vet Rec 144, 659-661.

Stein, L.D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M.R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., *et al.* (2003). The genome sequence of Caenorhabditis briggsae: a platform for comparative genomics. PLoS biology *1*, E45.

Stratford, C.H., Lester, H.E., Pickles, K.J., McGorum, B.C., and Matthews, J.B. (2014). An investigation of anthelmintic efficacy against strongyles on equine yards in Scotland. Equine veterinary journal *46*, 17-24.

Stratford, C.H., McGorum, B.C., Pickles, K.J., and Matthews, J.B. (2011). An update on cyathostomins: anthelmintic resistance and diagnostic tools. Equine veterinary journal *43 Suppl 39*, 133-139.

Suarez, V.H., and Cristel, S.L. (2007). Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina. Veterinary parasitology *144*, 111-117.

Sutherland, I.A., Damsteegt, A., Miller, C.M., and Leathwick, D.M. (2008). Multiple species of nematodes resistant to ivermectin and a benzimidazole-levamisole combination on a sheep farm in New Zealand. New Zealand veterinary journal *56*, 67-70.

Sutherland, I.A., and Leathwick, D.M. (2011). Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? Trends in Parasitology *27*, 176-181.

Takano, M., Hasegawa, R., Fukuda, T., Yumoto, R., Nagai, J., and Murakami, T. (1998). Interaction with P-glycoprotein and transport of erythromycin, midazolam and ketoconazole in Caco-2 cells. Eur J Pharmacol *358*, 289-294.

Takiguchi, Y., Mishima, H., Okuda, M., Terao, M., Aoki, A., and Fukuda, R. (1980). Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical properties. The Journal of antibiotics *33*, 1120-1127.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular biology and evolution 24, 1596-1599.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular biology and evolution *28*, 2731-2739.

Tandon, R., and Kaplan, R.M. (2004). Evaluation of a larval development assay (DrenchRite®) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomin nematodes of horses. Veterinary parasitology *121*, 125-142.

Tarigo-Martinie, J.L., Wyatt, A.R., and Kaplan, R.M. (2001). Prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in cyathostomes of horses. Journal of the American Veterinary Medical Association *218*, 1957-1960.

Taylor, M.A., and Hunt, K.R. (1989). Anthelmintic drug resistance in the UK. Vet Rec 125, 143-147.

Taylor, M.A., Hunt, K.R., and Goodyear, K.L. (2002). Anthelmintic resistance detection methods. Veterinary parasitology *103*, 183-194.

Thamsborg, S.M., Leifsson, P.S., Grondahl, C., Larsen, M., and Nansen, P. (1998). Impact of mixed strongyle infections in foals after one month on pasture. Equine veterinary journal *30*, 240-245.

Todd, A.C., Crowley, J., Jr., Scholl, P., and Conway, D.P. (1975). Critical tests with pyrantel pamoate against internal parasites in dogs from Wisconsin. Veterinary medicine, small animal clinician : VM, SAC 70, 936-939.

Tolliver, S.C., Lyons, E.T., and Drudge, J.H. (1987). Prevalence of internal parasites in horses in critical tests of activity of parasiticides over a 28-year period (1956-1983) in Kentucky. Veterinary parasitology *23*, 273-284.

Torres-Acosta, J.F., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., and Cuellar-Ordaz, J.A. (2012). Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. Veterinary parasitology *189*, 89-96.

Toussaint, M., and Conconi, A. (2006). High-throughput and sensitive assay to measure yeast cell growth: a bench protocol for testing genotoxic agents. Nature protocols *I*, 1922-1928.

Toussaint, M., Levasseur, G., Gervais-Bird, J., Wellinger, R.J., Elela, S.A., and Conconi, A. (2006). A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis *606*, 92-105.

Traversa, D., Castagna, G., von Samson-Himmelstjerna, G., Meloni, S., Bartolini, R., Geurden, T., Pearce, M.C., Woringer, E., Besognet, B., Milillo, P., *et al.* (2012). Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. Veterinary parasitology *188*, 294-300.

Traversa, D., Iorio, R., Klei, T.R., Kharchenko, V.A., Gawor, J., Otranto, D., and Sparagano, O.A. (2007a). New method for simultaneous species-specific identification of equine strongyles (nematoda, strongylida) by reverse line blot hybridization. J Clin Microbiol *45*, 2937-2942.

Traversa, D., Iorio, R., Otranto, D., Giangaspero, A., Milillo, P., and Klei, T.R. (2009a). Species-specific identification of equine cyathostomes resistant to fenbendazole and susceptible to oxibendazole and moxidectin by macroarray probing. Experimental parasitology *121*, 92-95.

Traversa, D., Klei, T.R., Iorio, R., Paoletti, B., Lia, R.P., Otranto, D., Sparagano, O.A., and Giangaspero, A. (2007b). Occurrence of anthelmintic resistant equine cyathostome populations in central and southern Italy. Preventive veterinary medicine *82*, 314-320.

Traversa, D., Paoletti, B., Otranto, D., and Miller, J. (2007c). First report of multiple drug resistance in trichostrongyles affecting sheep under field conditions in Italy. Parasitol Res *101*, 1713-1716.

Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Milillo, P., Schurmann, S., Barnes, H., Otranto, D., Perrucci, S., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., *et al.* (2009b). Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. Parasit Vectors *2 Suppl 2*, S2.

Trawford, A.F., Burden, F.A., and Hodgkinson, J. (2005). Suspected moxidectin resistance in cyathostomes in two donkey herds at The Donkey Sanctuary, UK. In 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, WAAVP (New Zealand).

Tsotetsi, A.M., Njiro, S., Katsande, T.C., Moyo, G., Baloyi, F., and Mpofu, J. (2013). Prevalence of gastrointestinal helminths and anthelmintic resistance on small-scale farms in Gauteng Province, South Africa. Tropical animal health and production *45*, 751-761.

Uhlinger, C., and Johnstone, C. (1985). Prevalence of benzimidazole-resistant small strongyles in horses in a southeastern Pennsylvania practice. Journal of the American Veterinary Medical Association *187*, 1362-1366.

van den Elsen, J.M.H., Kuntz, D.A., Hoedemaeker, F.J., and Rose, D.R. (1999). Antibody C219 recognizes an α -helical epitope on P-glycoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences *96*, 13679-13684.

van Es, H.H., Karcz, S., Chu, F., Cowman, A.F., Vidal, S., Gros, P., and Schurr, E. (1994). Expression of the plasmodial pfmdr1 gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. Molecular and cellular biology *14*, 2419-2428.

van Wyk, J.A. (2001). Refugia--overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. The Onderstepoort journal of veterinary research *68*, 55-67.

van Wyk, J.A., and Malan, F.S. (1988). Resistance of field strains of Haemonchus contortus to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. Vet Rec *123*, 226-228.

Várady, M., Königová, A., and Čorba, J. (2000). Benzimidazole resistance in equine cyathostomes in Slovakia. Veterinary parasitology *94*, 67-74.

Vercruysse, J., and Rew, R. (2002a). General efficacy of the macrocyclic lactones to control parasites of cattle. Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy CABI Publishing, Wallingford, UK, 185-222.

Vercruysse, J., and Rew, R.S. (2002b). Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy (Wallingford : CABI).

Vermunt, J.J., West, D.M., and Pomroy, W.E. (1996). Inefficacy of moxidectin and doramectin against ivermectin-resistant Cooperia spp. of cattle in New Zealand. New Zealand veterinary journal 44, 188-193.

Veronesi, F., Moretta, I., Moretti, A., Fioretti, D.P., and Genchi, C. (2009). Field effectiveness of pyrantel and failure of Parascaris equorum egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms. Veterinary parasitology *161*, 138-141.

Volkman, S.K., Cowman, A.F., and Wirth, D.F. (1995). Functional complementation of the ste6 gene of Saccharomyces cerevisiae with the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 8921-8925.

von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. Journal of molecular biology 225, 487-494.

von Moltke, L.L., Granda, B.W., Grassi, J.M., Perloff, M.D., Vishnuvardhan, D., and Greenblatt, D.J. (2004). Interaction of triazolam and ketoconazole in P-glycoprotein-deficient mice. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals *32*, 800-804.

von Samson-Himmelstjerna, G. (2012). Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. Veterinary parasitology *185*, 2-8.

von Samson-Himmelstjerna, G., Blackhall, W.J., McCarthy, J.S., and Skuce, P.J. (2007a). Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. Parasitology *134*, 1077-1086.

Von Samson-Himmelstjerna, G., Buschbaum, S., Wirtherle, N., Pape, M., and Schnieder, T. (2003). TaqMan minor groove binder real-time PCR analysis of beta-tubulin codon 200 polymorphism in small strongyles (Cyathostomin) indicates that the TAC allele is only moderately selected in benzimidazole-resistant populations. Parasitology *127*, 489-496.

von Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G.C., Jackson, F., Bauer, C., Borgsteede, F., Cirak, V.Y., Demeler, J., Donnan, A., Dorny, P., Epe, C., *et al.* (2009). Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. Parasitology Research *105*, 825-834.

von Samson-Himmelstjerna, G., Fritzen, B., Demeler, J., Schurmann, S., Rohn, K., Schnieder, T., and 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. Veterinary parasitology *144*, 74-80.

Von Samson-Himmelstjerna, G., Ilchmann, G., Clausen, P.H., Schein, E., Fritzen, B., Handler, J., Lischer, C.J., Schnieder, T., Demeler, J., Reimers, G., *et al.* (2011). Empfehlungen Zur Nachhaltigen Kontrolle Von Magen-Darmwurminfektionen Beim Pferd in Deutschland. Pferdeheilkunde *27*, 127-140.

von Samson-Himmelstjerna, G., von Witzendorff, C., Sievers, G., and Schnieder, T. (2002). Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment. Veterinary parasitology *108*, 227-235.

Waller, P.J. (1997). Anthelmintic resistance. Veterinary parasitology 72, 391-412.

Walsh, T.K., Donnan, A.A., Jackson, F., Skuce, P., and Wolstenholme, A.J. (2007). Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in Haemonchus contortus using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. Veterinary parasitology *144*, 304-312.

Wang, Z., Abubucker, S., Martin, J., Wilson, R.K., Hawdon, J., and Mitreva, M. (2010). Characterizing Ancylostoma caninum transcriptome and exploring nematode parasitic adaptation. BMC genomics *11*, 307.

Warringer, J., and Blomberg, A. (2003). Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in Saccharomyces cerevisiae. Yeast 20, 53-67.

West, D.M., Vermunt, J.J., Pomroy, W.E., and Bentall, H.P. (1994). Inefficacy of ivermectin against Cooperia spp. infection in cattle. New Zealand veterinary journal *42*, 192-193.

West, R.W., Jr., Yocum, R.R., and Ptashne, M. (1984). Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. Molecular and cellular biology *4*, 2467-2478.

Williamson, S.M., Storey, B., Howell, S., Harper, K.M., Kaplan, R.M., and Wolstenholme, A.J. (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.

Williamson, S.M., and Wolstenholme, A.J. (2012). P-glycoproteins of Haemonchus contortus: development of real-time PCR assays for gene expression studies. J Helminthol *86*, 202-208.

Winterrowd, C.A., Pomroy, W.E., Sangster, N.C., Johnson, S.S., and Geary, T.G. (2003). Benzimidazoleresistant β -tubulin alleles in a population of parasitic nematodes (Cooperia oncophora) of cattle. Veterinary parasitology *117*, 161-172.

Wirtherle, N., Schnieder, T., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2004). Prevalence of benzimidazole resistance on horse farms in Germany. Vet Rec 154, 39-41.

Wloch, S., Palasz, A., and Kaminski, M. (2009). Active and passive transport of drugs in the human placenta. Ginekologia polska *80*, 772-777.

Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., and Sangster, N.C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. Trends Parasitol *20*, 469-476.

Wolstenholme, A.J., and Kaplan, R.M. (2012). Resistance to macrocyclic lactones. Current pharmaceutical biotechnology *13*, 873-887.

Wolstenholme, A.J., and Rogers, A.T. (2005). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. Parasitology *131 Suppl*, 885-95.

Woods Jr, T.F., Lane, T.J., Zeng, Q.Y., and Courtney, C.H. (1998). Anthelmintic resistance on horse farms in north central Florida. Equine Pratice 20, 14-17.

Xu, M., Molento, M., Blackhall, W., Ribeiro, P., Beech, R., and Prichard, R. (1998). Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. Mol Biochem Parasitol *91*, 327-335.

Yan, R., Urdaneta-Marquez, L., Keller, K., James, C.E., Davey, M.W., and Prichard, R.K. (2012). The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in Caenorhabditis elegans. Veterinary parasitology.

Yates, D.M., Portillo, V., and Wolstenholme, A.J. (2003). The avermectin receptors of Haemonchus contortus and Caenorhabditis elegans. International journal for parasitology *33*, 1183-1193.

Young, K.E., Garza, V., Snowden, K., Dobson, R.J., Powell, D., and Craig, T.M. (1999). Parasite diversity and anthelmintic resistance in two herds of horses. Veterinary parasitology *85*, 205-214.

12. Publikationsverzeichnis

M. Kaschny, J. Krücken, J. Demeler, T. Kuzmina, G. von Samson-Himmelstjerna (2011), Charakterisierung von P-Glykoproteinen in ausgewählten kleinen Strongyliden des Pferdes, DVG Tagung, Berlin, Deutschland, 04.-06.Juli 2011 (Posterpräsentation)

M. Kaschny, J. Krücken, J. Demeler, T. Kuzmina, G. von Samson-Himmelstjerna (2012), Involvement of P-glycoproteins in macrocyclic lactone resistance in small strongyles, Short Course for Young Parasitologists und DGP Tagung, Heidelberg, Deutschland, 11.-14.03.2012 (Vortrag)

M. Kaschny, J. Krücken, J. Demeler, T. Kuzmina, T. Kanellos, G. von Samson-Himmelstjerna (2012), Charakterisierung von P-Glykoproteinen in ausgewählten Cyathostominen-Spezies, DVG Tagung, Hannover, Deutschland, 02.-04.Juni 2012 (Vortrag)

M. Kaschny, J. Demeler, D. Kerboeuf, T. Kuzmina, B. Besognet, T. Kanellos, G. von Samson-Himmelstjerna, J. Krücken (2013), Funktionelle Charakterisierung von *Ceg*Pgp-9 als Transporter von Anthelminthika, DVG Tagung, Giessen, Deutschland, 08.-10.07.2013 (Vortrag)

13. Danksagung

In meinem Fall war nicht der Anfang das Schwerste, sondern eigentlich ganz einfach. Und dafür und für die Überlassung und Betreuung eines wissenschaftlichen Projektes mit viel Potential möchte ich Prof. Georg von Samson-Himmelstjerna danken.

Der Weg in die molekularbiologische Forschung war nur möglich durch die offenen Türen im ersten Stock des alten Institutes für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin. Dafür gilt mein besonderer Dank Prof. Janina Demeler Ph. D. und PD. Dr. Jürgen Krücken.

Darüber hinaus möchte ich Zoetis und besonders Dr. Theo Kanellos und Dr. Bruno Besognet danken für ihr Interesse und die finanzielle Förderung des Projektes.

Von großer Bedeutung für diese Arbeit waren auch Tetjana Kuzmina Ph.D. und Dr. Dominique Kerboeuf. Ohne die professionelle Speziesidentifizierung und ohne die FACS-Analyse wäre meine Arbeit ohne Ergebnis.

Wenn ich sage, dass die Zeit der Doktorarbeit eine meiner besten war, dann denke ich dabei nicht an die ergebnislosen Durststrecken im Labor oder das ewige Schreiben, sondern vor allem an euch, Paradocs. Ich bin sehr froh, dass wir uns alle im "Aufzuchtbecken Königsweg 67" begegnet sind und ich wünsche mir noch viele "beste Zeiten" mit euch.

Keinen Schritt weit hätte ich geschafft ohne die ganz vielseitige Unterstützung meiner Eltern und meiner ganzen Familie. Wir haben das sozusagen gemeinsam gemeistert und dafür kann ich euch nicht genug danken.

14. Selbstständigkeitserklärung

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

Stuttgart, den 12.09.2017

Maximiliane Kaschny





 mbvberlin
 mensch und buch verlag

 49,90
 Euro
 ISBN: 978-3-86387-910-5