

**Überprüfung neuronaler Rezeptoren bei parasitischen
Nematoden und *Caenorhabditis elegans* auf ihre
Beteiligung an anthelminthischen Wirkmechanismen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl. Biol. Sandra Miltsch
aus Hannover

2011

Die Dissertation wurde im Zeitraum von Juli 2008 bis Dezember 2009 am Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover begonnen und im Zeitraum von Januar 2009 bis November 2011 am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin an der Freien Universität Berlin weitergeführt.
Betreuer der Dissertation war Herr Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna.

1. Gutachter: Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna, Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin,
Freie Universität Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel,
Institut für Biologie,
Freie Universität Berlin

Disputation am: 06.01.2012

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
2. Literaturübersicht	9
2.1 Nematoda	9
2.1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	10
2.1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus	11
2.1.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellsystem für parasitische Nematoden	13
2.1.4 Ascarididea	14
2.1.5 <i>Toxocara canis</i>	15
2.2 Anthelminthika	19
2.2.1 Anthelminthikaresistenz	22
2.2.2 Anthelminthische Wechselwirkungen	26
2.3 Untersuchte anthelminthische Wirkstoffgruppen	29
2.3.1 Muscimol	29
2.3.2 Piperazin	30
2.3.3 Tribendimidin	31
2.3.4 HLR-9291	32
2.3.5 Cyclooctadepsipeptide	32
2.3.5.1 PF1022A	32
2.3.5.2 Emodepsid	34
2.4 Rezeptoren	36
2.4.1 GABA-Rezeptoren	36
2.4.2.1 <i>Unc-49</i>	38
2.4.2 Acetylcholin-Rezeptoren	40
2.4.3 SLO-1	41
3. Material und Methoden	43
3.1 Materialien	43
3.1.1 Puffer und Lösungen	43
3.1.2 Anthelminthika-Stammlösungen	43
3.1.3 Medien und Mikroorganismen	44
3.1.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> Stämme	46
3.1.5 Reagenzien	48

3.1.6 Enzyme	49
3.1.7 Reaktionskits	49
3.1.8 Geräte	50
3.1.9 Verbrauchsmaterialien	53
3.1.10 Software	54
3.2 Methoden	56
3.2.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> Haltung	56
3.2.1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> Haltung auf NGM-Agarplatten	56
3.2.1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> Haltung in Flüssigkultur	57
3.2.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> Synchronisation	58
3.2.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> Entwicklungsassay	59
3.2.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> Bewegungsassay	61
3.2.5 <i>Caenorhabditis elegans</i> Assays mit lebend-tot Farbstoffen	62
3.2.5.1 MTT-Assay	62
3.2.5.2 WST-1-Assay	63
3.2.5.3 Sytox [®] Green-Assay	63
3.2.6 <i>Caenorhabditis elegans</i> "rescue" Experiment	64
3.2.6.1 Plasmidkonstruktion	64
3.2.6.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> Injektion	70
3.2.7 Gewinnung von adulten <i>T. canis</i>	71
3.2.8 RNA-Isolierung aus <i>T. canis</i>	72
3.2.9 RNA-Isolierung aus <i>C. elegans</i>	73
3.2.10 RNA-Isolierung aus kleinen Mengen transgener <i>C. elegans</i>	73
3.2.11 cDNA Synthese für Reverse Transkriptase-PCR	74
3.2.12 cDNA Synthese für RACE-PCR-Anwendungen mit dem BD Smart Race cDNA Amplification Kit [®]	75
3.2.13 cDNA Synthese für RACE-PCR-Anwendungen mit dem Roche 5'/3'RACE Kit, 2 nd Generation	75
3.2.14 cDNA Synthese für RACE-PCR-Anwendungen mit Fermentas Reagenzien und dem Oligo-dT-Anker-Primer von Roche	76
3.2.15 DNA-Isolierung (Phenol-Chloroform-Methode)	76

3.2.16 Polymerasekettenreaktion (PCR)	77
3.2.17 Rapid-Amplification of cDNA-ends (RACE)-PCR	78
3.2.18 Reverse Transkriptase (RT)-PCR	79
3.2.19 Herstellung degenerierter Primer	79
3.2.20 Agarose-Gelelektrophorese	80
3.2.21 Extrahierung von DNA aus einem Agarosegel	81
3.2.22 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	81
3.2.23 Klonierung (TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing von Invitrogen)	82
3.2.24 Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> One Shot™ Top 10 (Invitrogen)	84
3.2.25 Transformation in chemisch kompetente XL10-Gold "Ultracompetent Cells" (Agilent Technologies)	84
3.2.26 Bakterienkulturen	84
3.2.27 Plasmid-Präparation (Nucleo Spin von Macherey-Nagel)	85
3.2.28 MIDI Preparation mit dem Pure Yiel™ Plasmid Mideprep System (Promega)	85
3.2.29 Überprüfung der Ausbeute aus der Plasmid-Präparation	85
3.2.30 Sequenzierung	86
3.2.31 Statistische Auswertung	86
3.2.32 Bioinformatische und phylogenetische Auswertungen	87
4. Ergebnisse	89
4.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> Assays mit lebend-tot Farbstoffen	90
4.1.1 MTT-Assay	90
4.2 Bewegungsgassay	93
4.2.1 Etablierung des Bewegungsassays mit dem Neurotransmitter GABA	94
4.2.2 Etablierung des Bewegungsassays mit dem GABA-agonistischen Anthelminthikum Piperazin	95
4.2.3 Etablierung des Bewegungsassays mit dem GABA-Agonist Muscimol	96
4.2.4 Emodepsid im Bewegungsassay mit <i>C. elegans</i> Wildtyp und GABA _A -Rezeptor "loss of function" <i>C. elegans</i>	99
4.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> Entwicklungsassay	104

4.3.1 Wirkung von Piperazin im Entwicklungsassay	104
4.3.2 Wirkung von Muscimol im Entwicklungsassay	107
4.3.3 Wirkung von Emodepsid im Entwicklungsassay	108
4.3.4 Wirkung von Tribendimidin im Entwicklungsassay	110
4.3.5 Wirkung von HLR-9291 im Entwicklungsassay	113
4.3.6 Synergismus	116
4.4 Die <i>unc-49B</i> Sequenz von <i>T. canis</i>	118
4.4.1 Vergleich der <i>T. canis unc-49B</i> Sequenz mit den <i>unc-49B</i> Sequenzen anderer Organismen	123
4.4.2 Bioinformatische Analysen der <i>unc-49B</i> Sequenz von <i>T. canis</i>	128
4.5 "Rescue" Experiment	131
4.5.1 Plasmidkonstrukte	131
4.5.2 "Rescue" Experiment: Mikroinjektion	133
4.5.3 "Rescue" Experiment: Bewegungsassay	138
4.5.4 "Rescue" Experiment: Bewegungsassay mit Muscimol	140
4.5.5 "Rescue" Experiment: Bewegungsassay mit Emodepsid	143
5. Diskussion	147
5.1 Überblick	147
5.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> Assays zur Überprüfung von anthelminthisch wirksamen Substanzen gegen parasitische Nematoden	148
5.2.1 MTT-Assay	151
5.2.2 Bewegungsassay	153
5.2.3 Entwicklungsassay	154
5.3 Wirkung des Neurotransmitters GABA auf <i>C. elegans</i> Wildtyp und GABA _A -Rezeptor <i>unc-49</i> "loss of function" Stämme	154
5.4 Wirkmechanismus des Anthelminthikums Piperazin	156
5.5 Wirkung des GABA-Agonisten Muscimol auf <i>C. elegans</i> Wildtyp und GABA _A -Rezeptor <i>unc-49</i> "loss of function" Stämme	157
5.6 Wirkmechanismus des Anthelminthikums Emodepsid	158
5.7 Wirkmechanismus des Anthelminthikums Tribendimidin	162
5.8 Wirkmechanismus des Anthelminthikums HLR-9291	163
5.9 Anthelminthische Wechselwirkungen und "negative cross resistance"	163
5.10 Die <i>T. canis</i> GABA _A -Rezeptor <i>unc-49B</i> Sequenz	166

5.10.1 Phylogenetische Einordnung der <i>T. canis</i> GABA _A -Rezeptor unc-49B Sequenz	168
5.10.2 Bioinformatische Analysen der <i>T. canis</i> GABA _A -Rezeptor unc-49B Sequenz	168
5.11 "Rescue" Experiment	169
5.11.1 "Rescue" Experiment: Bewegungsassay	170
5.11.2 "Rescue" Experiment: Muscimol	171
5.11.3 "Rescue" Experiment: Emodepsid	172
5.12 Schlußfolgerung und Ausblick	175
6. Zusammenfassung	177
7. Summary	179
8. Literaturverzeichnis	181
9. Abkürzungsverzeichnis	196
10. Anhang	198
10.1 Verwendete Primer	198
10.2 Verwendete Sequenzen	201
10.3 Verwendete Vektoren	202
10.3.1 pPD118.33 (Adgene plasmid: 1595)	202
10.3.2 PCR [®] 4.TopoVektor [®] (Invitrogen)	203
11. Curriculum vitae	204
12. Publikationsliste	206
13. Erklärung	208
Danksagung	209

1 Einleitung

Neben viralen und bakteriellen Infektionen verursachen parasitäre Erkrankungen jedes Jahr große Schäden bei Tier und Mensch. Die durch verschiedene *Plasmodium* Spezies hervorgerufene Malaria fordert jährlich ca. 800 000 Todesopfer. Sie ist somit eine der häufigsten tödlichen Infektionskrankheiten besonders in Entwicklungsländern (World Health Organisation, 2010). Auch gastrointestinale Nematoden sind weltweit verbreitet und führen vor allem in der Nutztierhaltung jährlich zu großen wirtschaftlichen Verlusten. Weiterhin spielen gastrointestinale Nematoden auch als Zoonoseerreger eine Rolle. Etwa 800 Millionen Menschen sind weltweit mit Ascariden infiziert, 600 Millionen mit Hakenwürmern und *Trichuris spec.* (Bethony et al., 2011). Aus diesem Grund spielt die Entwicklung von Bekämpfungsstrategien und medikamentöser Behandlung von parasitären Erkrankungen eine große Rolle in der naturwissenschaftlichen Forschung.

Parasitenbekämpfung umfasst sowohl hygienische Maßnahmen zur Reduzierung des Parasitendruckes, als auch Strategien zur Verhinderung von Reinfektionen, wie etwa Weidemanagement und Einsatz von antiparasitären Chemotherapeutika. Seit den frühen 60er Jahren sind verschiedene Klassen von Breitspektrum-Anthelminthika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen im Einsatz, unter anderem die Benzimidazole, die Acetylcholin-Rezeptor-Agonisten und die makrozyklischen Laktone. Der flächendeckende Einsatz und die zum Teil übermäßige Verabreichung von Anthelminthika begünstigen allerdings auch die Entwicklung von Resistenzen, was zu großen Problemen in der Nutztierhaltung führt (Kaplan, 2004; Wolstenholme et al., 2004). Ein Beispiel dafür sind die Benzimidazole, die vor allem in Australien, Neuseeland, Südamerika und Südafrika bereits kaum noch Wirkung gegen parasitische Infektionen bei Schafen zeigen. Auch bei parasitischen Nematoden von Rind und Pferd wurde bereits von Benzimidazolresistenzen berichtet (Overend et al., 1994; Eddi et al., 1996; van Wyk et al., 1999, von Samson-Himmelstjerna, 2006). In Südamerika häufen sich außerdem Fälle von Resistenzen gegen Ivermectin bei Rindernematoden (Suarez und Christel, 2007; Condi et al., 2009). Die Entdeckung neuer anthelminthischer Wirkstoffgruppen und ihrer Wirkmechanismen ist daher von großer Bedeutung. Ebenso wichtig ist die Evaluierung und Etablierung von geeigneten Modellsystemen zur Untersuchung anthelminthischer Wirksamkeiten gegen

parasitische Nematoden, besonders, da geeignete Modellsysteme die Notwendigkeit von Tierversuchen verringern können (Holmes et al., 2009).

Durch Untersuchungen von anthelminthischen Wirksamkeiten und Resistenzmechanismen am Modellnematoden *Caenorhabditis elegans* soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag zu dieser wichtigen anthelminthischen Grundlagenforschung liefern. *Caenorhabditis elegans* wurde in dieser Arbeit in verschiedenen Assays genutzt, um Untersuchungen an dem noch nicht vollständig aufgeklärten Wirkmechanismus des Anthelminthikums Emodepsid durchzuführen. Darüber hinaus diene *C. elegans* zur Aufklärung von Wirkungsweise und Möglichkeiten zur Resistenzbildung gegen Piperazin, Tribendimidin und dem Tribendimidinderivat HLR-9291.

In Studien mit Emodepsid, einem halbsynthetischen Derivat des PF1022A, welches zu den Anfang der 90er Jahre entdeckten anthelminthisch wirksamen Cyclooctadepsipeptiden gehört, wurden bereits verschiedene mögliche Rezeptoren für das neue Anthelminthikum identifiziert. Dazu gehörten der G-Protein-gekoppelte Rezeptor Lathrophiillin-1 (Saeger et al., 2001; Willson et al., 2004; Welz et al., 2005) und der Kalzium-aktivierte Kaliumkanal SLO-1 (Guest et al., 2007; Welz et al., 2011).

Weitere Untersuchungen legen die Beteiligung des γ -Aminobuttersäure (GABA_A)-Rezeptors *unc-49* als weiteren möglichen Rezeptor im Rahmen des Emodepsidwirkmechanismus nahe. So konnte an einem *Ascaris suum* Muskelpräparat nachgewiesen werden, dass PF1022A an den ionotropen GABA_A -Rezeptor bindet (Chen et al., 1996). Außerdem wurde in einer weiteren Studie nachgewiesen, dass GABA-Antagonisten wie Bicuculline PF1022A verdrängen und seine Wirkung teilweise aufheben (Harder et al., 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur weiteren Aufklärung des Emodepsidwirkmechanismus zu liefern und auch zur Entwicklung neuer anthelminthisch wirksamer Produkte basierend auf dem selben oder ähnlichen Wirkmechanismen beizutragen. Dazu sollte besonders die noch unbekannte Bedeutung des GABA_A -Rezeptors im Emodepsidwirkmechanismus überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde *C. elegans* als Modellorganismus verwendet, um die Motilität von Wildtyp-Nematoden und GABA_A -Rezeptor *unc-49B* "loss of function" *C. elegans* Stämmen unter Emodepsidwirkung zu vergleichen. Um die im Modellsystem gewonnenen Erkenntnisse anschließend auch auf parasitische

Nematoden übertragen zu können, wurde die unc-49B GABA_A-Rezeptor cDNA Sequenz des Ascariden *Toxocara canis* identifiziert, anschließend in ein Plasmid eingebaut und in einem "rescue" Versuch in unc-49B "loss of function" *C. elegans* Stämme injiziert. *Toxocara canis*, der Spulwurm des Hundes, wurde ausgewählt, da Emodepsid vor kurzem für die Behandlung von Hunden zugelassen wurde und daher besonders die Wirksamkeit auf Nematoden von Karnivoren von Interesse ist.

Für die Untersuchungen mit Tribendimidin und HLR-9291 wurde ebenfalls das *C. elegans* Modellsystem herangezogen. In diesem Fall wurden in einem quantitativen Assay die Entwicklungsfähigkeit verschiedener Wildtyp und Tribendimidin-resistenter *C. elegans* Stämme unter dem Einfluß von HLR-9291 und Tribendimidin getestet. Außerdem wurde mit Hilfe des *C. elegans* Entwicklungsassays auch ein möglicher Synergismus zwischen Emodepsid, Tribendimidin und HLR-9291 überprüft.

Insgesamt sollten mit diesen Studien die Beteiligungen neuronaler Rezeptoren am Wirkmechanismus des bekannten Anthelminthikums Emodepsid und der noch wenig untersuchten anthelminthischen Substanzen Piperazin, Tribendimidin und HLR-9291 noch genauer und umfassender analysiert und ein Zusammenhang zwischen den Substanzen überprüft werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Nematoda

Der Stamm Nematoda (Rund- und Fadenwürmer) umfasst mehr als 26000 beschriebene Arten, die in unterschiedlichsten Biotopen, wie im Erdboden, in Süß- und Salzwasser und sogar in 6000 Meter Meerestiefe oder in bis zu 53 °C heißen Quellen, vorkommen (Schnieder und Tenter, 2006). Weltweit könnte ihre Gesamtanzahl aber auch wesentlich höher liegen, Schätzungen reichen von 40 000, über 500 000 bis hin zu 10 Millionen (Politz und Philipp, 1992; Blaxter, 1998). Etwa ein Drittel der Nematoden leben parasitierend an Pflanzen, Tieren oder Menschen (Eckert et al., 2005b).

Die Körperform der Nematoden ist spindelartig und langgestreckt, ihre Größe kann je nach Art von wenigen Millimetern bis zu einem Meter variieren (Politz und Philipp, 1992). Der mit Abstand größte Vertreter der Nematoden ist der Walnematode *Placentonema gigantissima* mit über 8 m Länge (Gubanov, 1951). Der Nematodenkörper besteht aus einem äußerlichen Integument, einer mit Flüssigkeit gefüllten primären Leibeshöhle, und den inneren Organen wie Verdauungstrakt und Geschlechtsorganen. Das aus Cuticula und Hypodermis bestehende Integument ist mit darunter liegenden Längsmuskelzellen zum sogenannten Hautmuskelschlauch verbunden. Dieser fungiert in Kombination mit der flüssigkeitsgefüllten Leibeshöhle als Hydroskelett und dient der Fortbewegung der Nematoden sowie der Körperstabilität (Politz und Philipp, 1992; Eckert et al., 2005b). Die Mundöffnung der Nematoden ist meist von Lippen umgeben, an denen sich Sinnesorgane befinden, dahinter folgen Mundhöhle und Ösophagus, der bei verschiedenen Nematodengruppen unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Der Mitteldarm besteht aus einer einfachen Lage von Epithelzellen und der Enddarm mündet als kurzes cutikuläres Rohr nach außen. Atmungs- und Zirkulationsorgane fehlen bei Nematoden, der Gasaustausch erfolgt über den Hautmuskelschlauch (Schnieder und Tenter, 2006).

Die meisten Nematodenarten sind getrenntgeschlechtlich. Sie legen Eier, aus denen Larven schlüpfen. Ihre Entwicklung verläuft über vier Larvenstadien bis zum adulten Tier. Da die Cuticula nicht wächst, finden zwischen den Entwicklungsstadien vier Häutungen statt (Politz und Philipp, 1992). Bei zahlreichen parasitischen Nematoden geht mit der Entwicklung auch eine

Körperwanderung innerhalb eines oder mehrerer Wirte einher. Auch sind viele Arten dazu in der Lage, ihre Entwicklung zu unterbrechen und ein widerstandsfähiges Ruhestadium zu bilden, was als Hypobiose bezeichnet wird. Dies hat erhebliche Relevanz für die Verbreitung, Kontrolle und Behandlung parasitärer Infektionen (Schnieder und Tenter, 2006).

2.1.1 *Caenorhabditis elegans*

Bei *C. elegans* handelt es sich um einen freilebenden, nicht parasitischen Vertreter der Nematoden, der in die Klasse Chromadorea, Ordnung Rhabditida und Familie Rhabditidae eingeordnet wird (Riddle et al., 1997; Blaxter, 1998; Bürglin et al., 1998). Er ernährt sich bakterivor und kommt häufig in Kompost oder anderem organischen Abbaumaterial gemäßigter Klimazonen in einem Temperaturbereich von 4 °C bis 30 °C vor (Brenner, 1974; Kenyon, 1988).

Wie alle Nematoden durchläuft *C. elegans* eine Entwicklung über vier Larvenstadien zum adulten, etwa 1-1,5 mm langen Wurm (Riddle et al., 1997; Bürglin et al., 1998). Die verschiedenen Entwicklungsstadien sind in Abbildung 2.1 zu sehen.

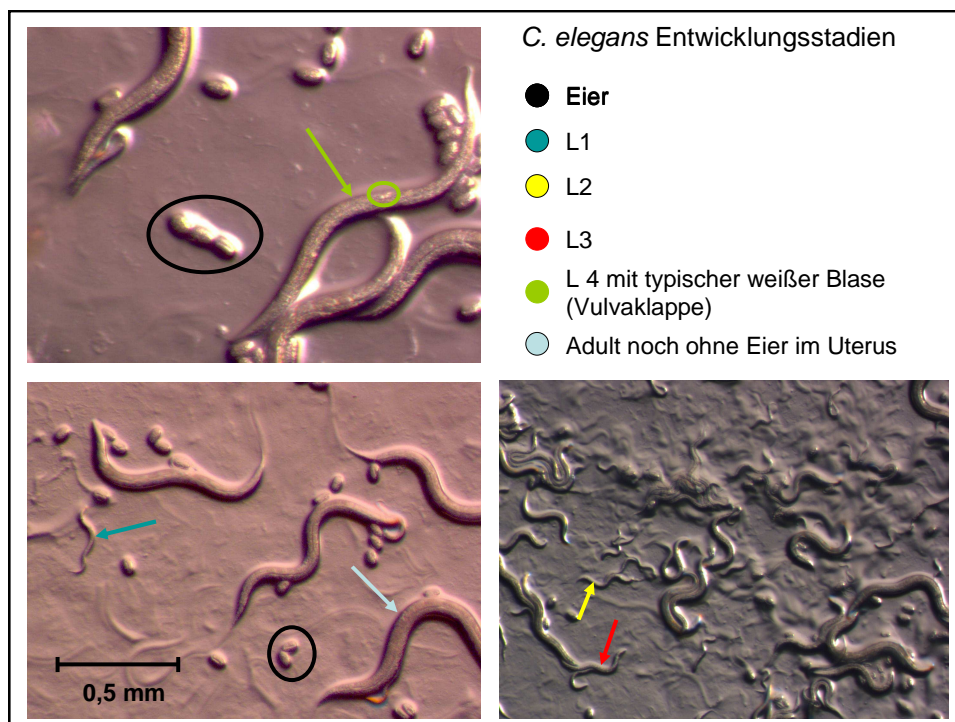


Abb. 2.1: *C. elegans* Entwicklungsstadien

Der Fortpflanzungsmechanismus von *C. elegans* bildet innerhalb der Nematoden eher die Ausnahme. Es handelt sich bei *C. elegans* meist um proteandrische Hermaphroditen, das heißt, zunächst werden männliche Geschlechtsprodukte ausgebildet, und dann wandelt sich der adulte Nematode zum Weibchen. Das zuvor gebildete Sperma wird in einer so genannten Spermathek aufbewahrt und dann zur Befruchtung der eigenen Eier genutzt (Brenner, 1974; Riddle et al., 1997). Dadurch genügt ein einzelnes Individuum zur Gründung einer neuen Population. Geschlechtliche Fortpflanzung ist nicht erforderlich, aber möglich, denn in seltenen Fällen treten auch Männchen auf, was genetische Rekombination in der Population ermöglicht (Riddle et al., 1997). Weibchen besitzen zwei X-Chromosomen (XX), Männchen nur eines (OX) (Kenyon, 1988). Die geschlechtsreifen, erwachsenen Weibchen legen zwischen 300 und 350 Eier bis sie etwa nach 18 Tagen sterben. Bei schlechten Umweltbedingungen, wie etwa Kälte, Hitze, Nahrungsmangel oder Überbevölkerung kann ein Dauerstadium aus der L3 Larve entstehen, das bis zu drei Monate in einer Art Ruhezustand überleben kann, der als Hypobiose bezeichnet wird. Dies sichert das Überleben einzelner Individuen in einem wechselhaften Lebensraum wie dem Boden oder Kompost und ermöglicht die Neubesiedlung des Lebensraumes, wenn die Bedingungen günstiger sind. Die Dauerlarven sind besonders dünn, Pharynx und Darm zeigen kein Lumen und der Pharynx hat keinerlei Pumpaktivität. Ihre Cuticula ist dicker und ähnelt eher der Cuticula von infektiösen dritten Larven parasitischer Nematoden (Cassada und Russell, 1975; Hu, 2007). Das Dauerstadium von *C. elegans* ist vergleichbar mit der infektiösen dritten Larve von parasitischen Nematoden, welche in der Umwelt überdauert, bis sie von einem geeigneten Wirt aufgenommen wird und ihre Entwicklung fortsetzen kann (Cassada und Russell, 1975; Riddle et al., 1997; Bürglin et al., 1998).

2.1.2 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

Erstmals wurde *C. elegans* entdeckt und beschrieben von Maupas im Jahre 1900, er nannte den Nematoden *Rhabditis elegans* (Maupas, 1900). In den 50er Jahren wurde er umbenannt in *Caenorhabditis elegans* und in den 60er Jahren begann Sydney Brenner mit ihm zu arbeiten und erkannte sein großes Potential als Modellorganismus (Brenner, 1974; Riddle et al., 1997). Zwei *C. elegans* Stämme sind von besonderer historischer Bedeutung, der Stamm Bergerac, der 1949 von

Victor Nigon in Frankreich isoliert wurde und der Stamm Bristol, welcher 1959 von L.N. Staniland aus Pilzkompost in der Nähe von Bristol isoliert wurde. Auch Sydney Brenner arbeitete mit einer Linie des Bristol Stammes, die N2 genannt wurde. Dieser N2 Laborstamm wurde 1965 als Wildtyp-Referenzstamm definiert (Riddle et al., 1997).

Es gibt eine Reihe von Gründen, weshalb *C. elegans* als Modellorganismus besonders geeignet ist und bis heute verwendet wird. Es handelt sich bei ihm um einen mehrzelligen Organismus, an dem sich eine Reihe von genetischen, entwicklungsbiologischen und physiologischen Fragestellungen untersuchen lassen und dessen Haltung und Untersuchung trotzdem so einfach ist wie die von Mikroorganismen (Brenner, 1974; Kenyon, 1988). Durch seine bakterivore Ernährung und Lebensweise ist der freilebende Nematode leichter zu kultivieren als parasitische Nematoden, die für ihre Entwicklung auf den Wirt angewiesen sind. Zumeist besitzen parasitische Nematoden komplexe Lebenszyklen, die im Labor schwer nachzustellen sind (Holden-Dye und Walker, 2007). *Caenorhabditis elegans* hingegen kann im Labor auf Agarplatten oder in Flüssigmedium gehalten und in großen Mengen herangezüchtet werden. Sein Lebenszyklus ist einfach und mit einer Generationszeit von nur drei Tagen schnell abgeschlossen (Hodgkin et al., 1995). Der Nematode ist transparent, was es ermöglicht, seine Körperfunktionen zu überwachen und die Entwicklung und Differenzierung jeder einzelnen Zelle zu verfolgen (Hodgkin et al., 1995). *Caenorhabditis elegans* toleriert Einfrieren bei -80 °C, was für den unkomplizierten Erhalt der *C. elegans* Stämme im Labor von Bedeutung ist. Eine Besonderheit von *C. elegans* ist seine konstante Zahl an Körperzellen (Eutelie), die bei Hermaphroditen stets 959 Zellen beträgt und bei Männchen 1031 Zellen. Auch erleichtert das hauptsächlichliche Vorkommen von Hermaphroditen in der Population den Erhalt homozygoter Stämme, und die Selbstbefruchtung macht es leicht, rezessive Mutanten zu isolieren (Brenner, 1974). Die einfache Haltung von *C. elegans* machte es möglich, eine Sammlung der meisten bekannten *C. elegans* Stämme und Mutanten anzulegen. Diese wird vom „*Caenorhabditis* Genetics Center“ (CGC) aufbewahrt, einer Institution, die 1979 an der Universität von Missouri gegründet wurde und dazu dient, die verschiedenen *C. elegans* Stämme und Mutanten zu sammeln und weiterzugeben. Außerdem gilt sie auch als Schlichter in Streitfragen über *C. elegans* Nomenklatur und als zentrale

Informationsquelle. Seit 1992 hat die CGC ihren Sitz an der Universität von Minnesota (Riddle et al., 1997).

Da *C. elegans* eine wichtige Stellung als Modellorganismus besitzt, wurde sein Genom 1998 vollständig aufgeklärt und auch seine Entwicklung ist sehr gut bekannt.

2.1.3 *Caenorhabditis elegans* als Modellsystem für parasitische Nematoden

Caenorhabditis elegans reagiert sensibel auf die meisten Anthelminthika, die gegen parasitische Nematoden verwendet werden. Er ist in seinem Körperaufbau den parasitischen Nematoden ähnlich und konnte bereits häufig erfolgreich für anthelminthische Wirksamkeitsstudien verwendet werden (Guest et al., 2007; Welz et al., 2011; Crisford et al., 2011). Er unterscheidet sich jedoch in der Lebensweise von Grund auf von den parasitischen Nematoden, was bei manchen Wissenschaftlern die Frage aufwirft, ob ein freilebender Nematode wie *C. elegans* als Modellorganismus für parasitische Nematoden geeignet ist (Geary und Thompson, 2001; Holden Dye und Walker, 2007). Es muss bedacht werden, dass die ganze Komplexität der parasitischen Lebensweise vielleicht nicht von einem freilebenden Nematoden als Modellsystem abgedeckt werden kann, da der gesamte Prozess der Infektion, der komplizierte Lebenszyklus und mögliche Zwischenwirte nicht Teil seiner Lebensweise sind (Geary und Thompson, 2001).

Ein wichtiger Aspekt für die Vergleichbarkeit ergibt sich sicher aus der Nähe der Verwandtschaft von *C. elegans* zu parasitischen Nematoden. So sind die Rhabditida, zu denen *C. elegans* gezählt wird, enger verwandt mit den Strongylida als beispielsweise mit *Trichinella spiralis* (Geary und Thompson, 2001). Allerdings macht der Verwandtschaftsgrad keinen Unterschied bei der Untersuchung von Breitspektrum-Anthelminthika. Da von ihnen viele verschiedene Nematodenarten geschädigt werden, ist auch davon auszugehen, dass ihre Wirkung auf *C. elegans* übertragbar auf andere Nematoden ist (Geary und Thompson, 2001).

Die meisten Anthelminthika wirken auf neuromuskuläre Ziele im Nematodenkörper. Deshalb ist es wichtig, *C. elegans* besonders in diesen Bereichen mit parasitischen Nematoden zu vergleichen (Holden-Dye und Walker, 2007). In einer Studie der neuronalen Morphologie von *C. elegans* und *Ascaris suum* konnte gezeigt werden, dass sie sich trotz der großen Unterschiede zwischen den Nematoden in Größe, Habitat und Lebensweise in ihrem

Nervensystem sehr stark ähneln. Die Nervensysteme beider Nematodenarten enthalten etwa 300 gleich organisierte Nervenzellen und jedem Neuron in *A. suum* konnte ein homologes Neuron in *C. elegans* zugeordnet werden (Angstadt et al., 1989). Außerdem konnte Acetylcholin als wichtigster Neurotransmitter in den excitatorischen Motorneuronen (Johnson und Stretton, 1985) und GABA als wichtigster Neurotransmitter in den inhibitorischen Motorneuronen (Johnson und Stretton, 1987) bei *A. suum* und *C. elegans* ausgemacht werden. Mehr als 40 % der Gene von parasitischen Nematoden zeigen hohe Homologien zu *C. elegans* Genen (Hashmi et al., 2001).

Zukünftig kann *C. elegans* als Modellsystem für parasitische Nematoden noch von großem Nutzen sein, da bereits viele anthelminthische Wirkmechanismen mit seiner Hilfe aufgeklärt wurden und noch aufgeklärt werden können. Darüber hinaus kann *C. elegans* hilfreich bei der Aufklärung von Resistenzmechanismen und bei der Suche nach neuen anthelminthisch wirksamen Substanzen sein (Hashmi et al., 2001; Holden-Dye und Walker, 2007).

2.1.4 Ascarididea

Die Familie Ascarididae, auch als Spulwürmer bezeichnet, gehört zum Stamm Nematoda, den Rund- und Fadenwürmern. Sie weisen die typischen, bereits erwähnten Merkmale dieses Stammes auf, wie etwa den langgestreckten, drehrunden Körperbau und Getrenntgeschlechtlichkeit (Schnieder und Tenter, 2006).

Die Ascarididae parasitieren als Adulte im Dünndarm ihrer Wirte und leben dort frei im Darmlumen, wo sie sich von Schleimhaut und Darminhalt ernähren (Joachim, 2006).

Die Familie Ascarididae ist nach Schnieder und Tenter (2006) in die Klasse der Chromadorea einzuordnen und gehört zur Unterklasse Rhabditia. Die Ascarididae umfassen dreizehn Arten. Die in dieser Arbeit untersuchte Art *T. canis* wird zur Unterfamilie Toxocarinae gezählt (Schnieder und Tenter, 2006). Eine andere Systematik von Blaxter (1998) sortiert das Phylum Nematoda in ein System aus fünf "Clades" ein, indem die Ascariden in "Clade" III eingeteilt werden. Die Rhabditida, wie *C. elegans*, sowie die Strongylida werden beispielsweise in "Clade" V eingeteilt (Blaxter, 1998).

2.1.5 *Toxocara canis*

Toxocara canis parasitiert im Dünndarm von Kaniden wie Fuchs, Wolf oder Hund und gilt als Verursacher der Toxocarose. *Toxocara canis* besitzt das typische Askaridenvorderende mit dreilippigem Mund und außerdem auffällige Zervikalfügel (Alae) am Kopf (Mehlhorn und Piekarski, 2002). Die zwischen 10 und 12 cm langen Männchen haben am Hinterende einen fingerförmigen Fortsatz. Weibchen sind mit 12-18 cm Länge etwas größer als die Männchen. *Toxocara canis* ist weltweit verbreitet und seine Prävalenzen reichen von 3-80 % (Deplazes, 2006).

Der Entwicklungszyklus von *T. canis* verläuft über vier Larvenstadien. Die im Dünndarm von Kaniden parasitierenden Weibchen des Nematoden legen dickwandige, ca. 75 µm große, unembryonierte Eier, welche mit dem Kot des Wirtes in die Außenwelt abgegeben werden. In der Umwelt entwickeln sich in diesen Eiern temperaturabhängig innerhalb von 10-15 Tagen die Larven bis zur infektiösen Larve 3 (L3) (Mehlhorn und Piekarski, 2002).

Die Infektionswege sind bei *T. canis* vielfältig, wie in Abbildung 2.2 schematisch gezeigt ist.

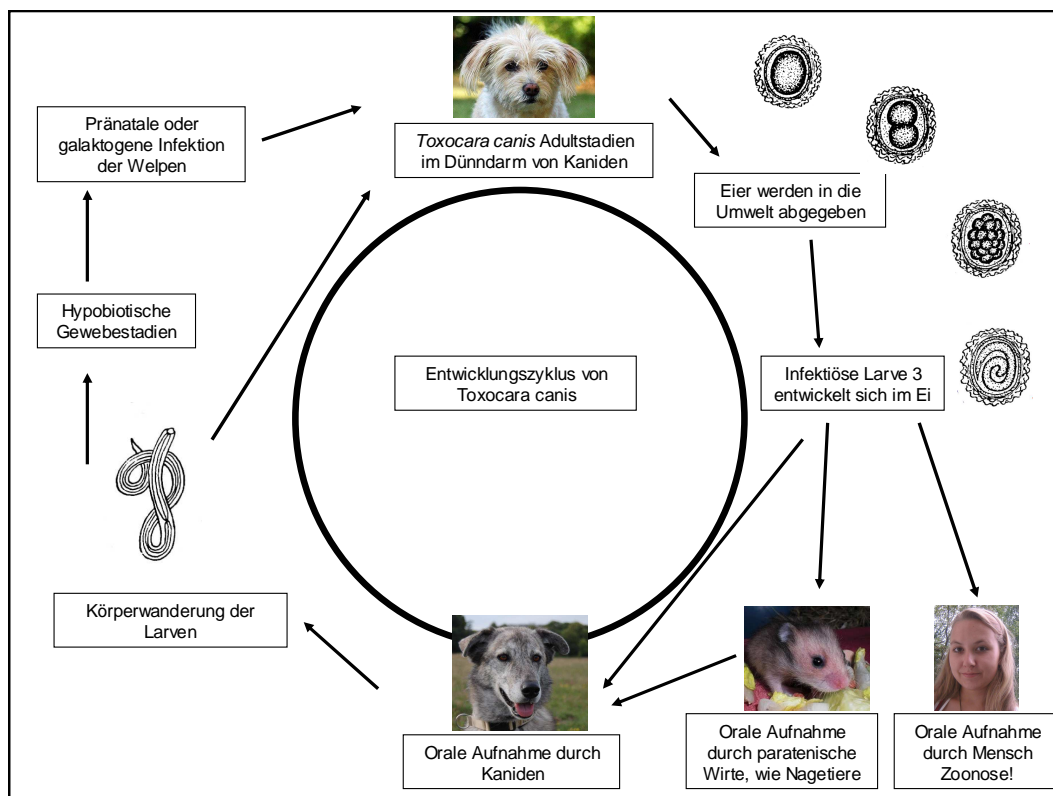


Abb. 2.2: Entwicklungszyklus von *T. canis*, verändert nach CDC/Alexander J. da Silva, PhD/Melanie Moser

Es ist sowohl eine Infektion des Endwirtes durch direkte orale Aufnahme der Eier möglich, als auch eine indirekte Aufnahme der dritten Larven durch das Fressen paratenischer Wirte, wie Nagetiere, Schweine oder Schafe (Schnieder et al., 2011). In den paratenischen Wirten entwickeln sich die Larven nicht weiter, sondern verbleiben als Larvenstadium im Gewebe der Tiere. Sie können dort bis zu 2 Jahre überdauern (Schnieder et al., 2011). Durch den Parasitenbefall können beim paratenischen Wirt Verhaltensänderungen auftreten. Dazu zählt eine geringere Aktivität und ein häufigeres Aufhalten in offenem Gelände, was dazu führt, dass befallene Tiere leichter von potentiellen Endwirten erbeutet werden können und so der Parasit seinen Entwicklungszyklus abschließen kann (Cox und Holland, 1998; Hamilton et al., 2006; Schnieder et al., 2011).

Ein weiterer Hauptinfektionsweg ist der Übergang von der Hündin auf die Welpen durch pränatale oder galaktogene Infektion. Die Larven machen im Körper des Endwirtes eine Körperwanderung durch, dabei werden mehrere Wanderwege unterschieden. Der tracheale Wanderweg der Larven kommt meist bei Jungtieren vor, deren Immunabwehr noch nicht vollständig ausgebildet ist. Dabei penetrieren die dritten Larven die Darmwand und dringend in das Blutgefäßsystem ein, von wo sie mit dem Blut über Pfortader und Leber zur Lunge gelangen (Schnieder et al., 2011). Die Larven steigen über die Trachea in den Pharynx auf und werden abgeschluckt. Die Häutung zur vierten Larve geschieht vermutlich zwischen der Ankunft in den Bronchiolen und der Passage des Magens (Schnieder et al., 2011). Sie kommen zurück in den Dünndarm, wo sie sich erneut häuten und als Adulte festsetzen. Die Präpatenz beträgt 27-35 Tage (Schnieder und Tenter, 2006).

Bei besser ausgebildeter Immunabwehr, was vor allem bei erwachsenen Tieren und älteren Welpen der Fall ist, kommt es nicht mehr zum trachealen, sondern zum somatischen Wanderweg der Larven. Dabei gelangen die Larven zunächst auch ins Blut und von dort in die Lunge, verbleiben dort aber nicht, sondern wandern wieder zurück ins Blut und streuen darüber in verschiedene Organe und vor allem in die quergestreifte Muskulatur, wo es zur Bildung von Granulomen kommt (Verkapselung). Hier können die Larven in Hypobiose jahrelang überdauern. Diese hypobiotischen Larven können bei trächtigen Hündinnen durch die Hormonumstellungen des Körpers wieder reaktiviert werden und dann über die Blutbahn und die Plazenta auch die Welpen schon im Mutterleib infizieren. Diese

Welpen scheiden dann bereits drei Wochen *post partum* Eier aus. Eine Hündin kann so auch mehrere Würfe infizieren. Außerdem ist eine galaktogene Infektion möglich, dabei wandern die Larven in die Milchdrüsen ein und infizieren die Welpen beim Säugen (Schnieder et al., 2011).

Die pränatale Infektion ist der wichtigste Infektionsweg für *T. canis*, deshalb sind Welpen auch am häufigsten betroffen. Wegen ihres noch schlecht ausgebildeten Immunsystems sind die Welpen meist stark infiziert und scheiden große Mengen Eier aus. Ältere Hunde zeigen auf Grund von Altersresistenz und gut ausgebildeter Immunabwehr seltener Eiausscheidung können aber in ihrem Leben auch mehrfach patent infiziert sein (Fahrion et al., 2008). Die Wanderungen der Larven im Körper der Welpen richten massive Schäden in den Organen an, besonders in Leber und Lunge, was durch Sekundärinfektionen zu noch schwereren Krankheitsbildern wie Pneumonie führen kann. Außerdem kann der massive Befall des Darms, der zum typischen aufgeblähten „Askaridenbauch“ führt, die Nahrungsaufnahme stören. Die Welpen leiden unter Durchfall, Fieber, magern ab, verkümmern und bleiben in ihrer Entwicklung zurück. In schweren Fällen kann der Befall auch zum Tod führen (Deplazes, 2006).

Eine Körperwanderung der Larven findet auch in den paratenischen Wirten statt. Nach dem Verzehr der paratenischen Wirte, wie z.B. Nagetieren, durch Karnivoren kommt es wiederum zur somatischen Wanderung der Larven, je nach Alter und Immunität des Wirtes (Deplazes, 2006).

Bei *T. canis* und anderen Askariden besteht außerdem eine Zoonosegefahr, denn auch der Mensch kann sich durch orale Aufnahme von larvenhaltigen *T. canis* Eiern infizieren. Da *T. canis* im Menschen nicht geschlechtsreif wird, können die aufgenommenen Larven über Monate im Körper umher wandern und dabei Schäden an den inneren Organen hervorrufen. Dies wird als *Larva migrans visceralis* bezeichnet. Die Larven wandern in viele Organe wie Leber und Lunge, sowie in Muskulatur und ZNS (Mehlhorn und Piekarski, 2002; Schnieder et al., 2011). Oft endet die Wanderung in der Lunge oder die Larven werden über den Blutkreislauf in alle Organe gestreut. Sie werden nach dem Auswandern aus den Gefäßen bindegewebig abgekapselt (Granulome) und können so Jahre überdauern und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aktiv werden (Kraus et al., 1997). Ebenfalls ist das Auftreten einer *Larva migrans ocularis* möglich, bei der die

wandernde Larve ins Auge gelangt und Schäden an der Netzhaut bis zur Erblindung herbeiführen kann (Schnieder et al., 2011).

Da von *T. canis* also auch eine Gefahr für den Menschen ausgeht, ist seine Verbreitung in der Umwelt kritisch zu beurteilen. Besonders gefährdet sind beispielsweise Kinder auf öffentlichen Kinderspielplätzen, auf Grund von potentiell mit Hunde- oder Fuchskot verunreinigter Sandkästen. In Großstädten konnten in über 70 % der öffentlichen Sandkästen *T. canis* Eier nachgewiesen werden (Kraus et al., 1997). Die Widerstandsfähigkeit der Eier, die sie in feuchter Umgebung selbst Kälteperioden, Monate oder Jahre überdauern lässt, erhöht für den Menschen die Gefahr einer Infektion (Deplazes, 2006). In einer Studie von Kimmig et al. (1991) wurde die Seroprävalenz von *T. canis* zwischen verschiedenen Volksgruppen verglichen. Deutsche zeigten eine durchschnittliche Seroprävalenz für *T. canis* von 4,8 %, während getestete Nicht-Europäer Prävalenzen von 13,7 % für *T. canis* und getestete Ost-Europäer Seroprävalenz von 17,7 % aufwiesen (Kimmig et al., 1991). Es besteht also möglicherweise ein erhöhtes Risiko, sich in osteuropäischen Ländern oder außerhalb Europas mit *T. canis* zu infizieren. Ein erhöhtes Infektionsrisiko können auch die Lebensumstände herbeiführen. So infizieren sich bestimmte Risikogruppen in der Bevölkerung mit größerer Wahrscheinlichkeit. Beispiele für solche Risikogruppen sind Hundehalter, bei denen die Seroprävalenz bei 5,6 % liegt, Katzenhalter mit einer Prävalenz von 10,9 % und Landwirte, deren Prävalenz bei 22,6 % liegt (Kimmig et al., 1991). In dieser Seroprävalenzstudie ist jedoch auch eine Kreuzreaktion mit *Toxocara cati* nicht auszuschließen, vor allem wegen der hohen Prävalenz bei Katzenhaltern.

Zur Behandlung von *T. canis* Infektionen können verschiedene Anthelminthika eingesetzt werden, z.B. das zu den Benzimidazolen gehörende Fenbendazol oder auch das zur neuen Wirkstoffklasse der Cyclooctadepsipeptide gehörende Emodepsid. Um Infektionen vorzubeugen, sollten erwachsene Hunde zweimal bis viermal pro Jahr auf *T. canis* untersucht und gegebenenfalls behandelt werden (Deplazes, 2006). In Tierheimen und Versuchstieranstalten, wo viele Tiere auf engem Raum zusammenleben, muss auf Hygiene und das gründliche Beseitigen von Kot geachtet werden (ESCCAP-Empfehlungen, 2009). Besonders empfehlenswert ist eine Dampfstrahlreinigung der Ställe und Ausläufe, da ein Abtöten der widerstandsfähigen Eier von *T. canis* durch Hitze über 70 °C möglich ist (Deplazes, 2006). Desinfektionsmaßnahmen sind wegen der hohen

Widerstandsfähigkeit der Eier nur bedingt erfolgreich. Die höchste Wirksamkeit gegen Ascariden Eier zeigen Phenolderivate wie Kresol, welches z. B. im Neopredisan 135-1 enthalten ist (DVG Desinfektionsmittelliste für die Tierhaltung, 2011). Wichtig sind dabei die Konzentration des Wirkstoffes und eine ausreichend lange Einwirkzeit. Im Falle der Verwendung von Neopredisan 135-1 gegen Ascariden Eier sollte das Desinfektionsmittel mindesten 2 Stunden einwirken (Schnieder und Tenter, 2006; DVG Desinfektionsmittelliste für die Tierhaltung, 2011).

2.2 Anthelminthika

Anthelminthika sind Chemotherapeutika, welche dazu dienen, den Befall mit parasitischen Helminthen zu behandeln und gegebenenfalls neuen Parasitosen vorzubeugen, ohne dabei dem Wirt zu schaden (Ungemach, 2002; Holden-Dye und Walker, 2007). Die WHO vermutet, dass etwa 2 Milliarden Menschen mit parasitischen Helminthen infiziert sind, hinzu kommen die vielfältigen Infektionen von Nutz- und Haustieren (Holden-Dye und Walker, 2007).

Parasitische Helminthen richten besonders in Entwicklungsländern viel Schaden an, und die Gruppe der gegen sie wirksamen Stoffe ist vor allem in der Humanmedizin sehr klein. Dies liegt zum Teil daran, dass gerade die Länder, die am meisten unter parasitischen Infektionen leiden, am wenigsten finanzielle Mittel besitzen, die sie in die Bekämpfung der Parasitosen investieren könnten (Holden-Dye und Walker, 2007).

Die Anthelminthika unterteilen sich anhand ihrer chemischen Struktur und ihres Wirkmechanismus in verschiedene Gruppen von Wirkstoffen, wie etwa Benzimidazole, Imidazothiazole oder makrozyklische Laktone (Holden-Dye und Walker, 2007).

Ein sehr früher Vertreter der anthelminthischen Substanzen ist das seit den 50er Jahren als Anthelminthikum eingesetzte Piperazin. Es zeigt Wirkung gegen Darmnematoden und soll dabei durch Öffnung von GABA-kontrollierten Chloridionenkanälen zu einer Paralyse führen (Courtney, 1995; Martin, 1997; Eckert et al., 2005a).

Die 1961 mit ihrem ersten Vertreter, dem Thiabendazol, auf dem Markt eingeführten Benzimidazole wirken auf das β -Tubulin der Nematoden (Holden-Dye und Walker, 2007). Sie führen zu einer Hemmung der Polymerisation des β -

Tubulins mit dem α -Tubulin zu Mikrotubuli. Dies verhindert die Zellteilung und intrazellulären Stofftransport. Weitere Vertreter der Benzimidazole sind Fenbendazol, Flubendazol, Mebendazol und Febantel. Sie werden sowohl gegen Magen-Darm-, als auch gegen Lungennematoden sowie z.T. auch gegen Cestoden und Trematoden eingesetzt (Eckert et al., 2005a).

Die nicotinergeren Acetylcholin-Rezeptor-Agonisten, zu denen z.B. das Imidazothiazol Levamisol und das Tetrahydropyrimidin Pyrantel gehören, wirken ebenfalls gegen Magen-Darm- und Lungennematoden. Ihre Angriffspunkte sind nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren, auf die sie eine agonistische Wirkung haben, sie also dauerhaft aktivieren, was eine spastische Lähmung der Nematoden hervorruft und sie aus dem Darm ablöst (Martin et al., 2005; Holden-Dye und Walker, 2007). Zusätzlich wirken sie hemmend auf die Acetylcholin-Esterase (Ungemach, 2002).

Die seit den 70er Jahren bekannten makrozyklischen Laktone unterteilen sich in zwei Unterklassen, die Avermectine und die Milbemycine (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002). Zu ihnen gehören z.B. Ivermectin und Milbemycin. Das Ivermectin wurde in den 80er Jahren von der Firma Merck als halbsynthetisches Derivat des Avermectins, einem Sekundärmetaboliten des Mikroorganismus *Streptomyces avermitilis*, eingeführt (Holden-Dye und Walker, 2007). Im Unterschied zu den zuvor genannten Anthelminthika wirken die makrozyklischen Laktone sowohl gegen parasitische Nematoden als auch gegen einige parasitische Arthropoden. Sie binden spezifisch an Glutamat- und GABA-kontrollierte Chloridionenkanäle, was zu einer Hyperpolarisation durch Einstrom von Chloridionen führt, die Reizleitung wird gestört und es kommt zu einer Paralyse, die zum Tod führt (Eckert et al., 2005a).

Seit den 80er Jahren ist die Paraherquamid/Marcfortine Familie als Gruppe von anthelminthisch wirksamen Substanzen bekannt (Zinser et al., 2002). Paraherquamid ist ein Oxindol-Alkaloid-Metabolit und wurde aus *Penicillium paraherquei* und *Penicillium charlesii* isoliert (Yamazaki und Okuyama, 1981; Ondeyka et al., 1990; Shoop et al., 1991). Paraherquamid und seine Derivate wirken als nicotinische cholinerge Antagonisten sowohl in Nematoden als auch in Vertebraten, was sie sowohl wirksam gegen die Nematoden als auch giftig für den Wirt macht (Zinser et al., 2002). Die Anthelminthika dieser Familie blockieren die cholinerge neuromuskuläre Transmission und führen somit zu einer

schlaffen Paralyse. Da ihr Wirkmechanismus sich von den Wirkmechanismen der älteren und schon lange gegen Nematoden eingesetzten Anthelminthikaklassen unterscheidet, zeigen sie auch Wirksamkeit gegen Nematoden, die gegen andere Anthelminthika bereits Resistenzen entwickelt haben (Shoop et al., 1991; Zinser et al., 2002). Die Wirksamkeit der Paraherquamide konnte in neuesten Studien auch an resistenten Population von parasitischen Nematoden im Schaf bei einer Behandlung mit dem Paraherquamid Derquantel in Kombination mit dem makrozyklischen Lakton Abamectin gezeigt werden (Little et al., 2011).

Die seit den 90er Jahren bekannten anthelminthischen Cyclooctadepsipeptide, zu denen als erster Vertreter das PF1022A und sein Derivat das Emodepsid gehören, sind ebenfalls eine Wirkstoffklasse mit gänzlich neuem Wirkmechanismus. Dies macht sie als resistenzbrechende Substanzen gegen viele Nematodenstämme, die bereits Resistenzen gegen andere Substanzklassen entwickelt haben, sehr wertvoll (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002). Der genaue Wirkmechanismus der Cyclooctadepsipeptide ist noch nicht gänzlich aufgeklärt, jedoch bewirken sie eine schlaffe Paralyse der Nematoden und es sind bereits verschiedene mögliche Rezeptoren eingegrenzt worden. Die Cyclooctadepsipeptide werden im Folgenden (unter Punkt 2.3.5) noch eingehender dargestellt.

Eine weitere neue Anthelminthikaklasse wurde erst kürzlich identifiziert. Dabei handelt es sich um die sogenannten Amino-Acetonitril-Derivate (AAD), zu denen als erster kommerzialisierter Vertreter das Monepantel[®] gehört (Kaminsky et al., 2008a). Die AADs zeigen eine hohe Wirksamkeit gegen ein breites Nematodenspektrum und sind ebenfalls resistenzbrechend, da ihr Wirkmechanismus völlig neu ist. Angriffspunkt der AADs scheint ein spezieller Acetylcholin-Rezeptor der DEG-3 Unterfamilie zu sein, der nur bei Nematoden vorkommt (Kaminsky et al., 2008b; Rufener et al., 2010).

Es wird beständig weiter nach neuen Substanzen geforscht, welche die durch Resistenzen entstehenden Lücken in den Reihen der Anthelminthika wieder auffüllen könnten. Einer der dabei entdeckten und untersuchten Stoffe ist das Tribendimidin und sein Derivat das HLR-9291. Beide haben eine vermutlich dem Levamisol ähnliche Wirkung auf den Acetylcholin-Rezeptor und bewirken eine spastische Lähmung (Hu et al., 2009). Sie werden im Folgenden noch ausführlicher vorgestellt.

Auf Grund von fortschreitender Resistenzbildung ist es wichtig, die Wirkmechanismen der vorhandenen Anthelminthika zu kennen, um entscheiden zu können, welche Medikamente bei resistenten Populationen vermutlich noch Wirkung zeigen und welche auf Grund eines ähnlichen Wirkmechanismus nicht mehr in Frage kommen (Martin, 1997). Ferner ist es von großem Interesse, potentielle synergistische Wirkungen zwischen den Substanzen zu erkennen und zu nutzen (Hu et al., 2010).

2.2.1 Anthelminthikaresistenz

Resistenz besteht, wenn mehr Individuen einer Population in der Lage sind, hohe Konzentrationen eines Medikamentes zu tolerieren, als dies in einer voll empfänglichen Population der Fall wäre (Prichard et al., 1980).

Resistenzen können in unterschiedlicher Art und Ausprägung auftreten. Im einfachsten Fall richten sie sich nur gegen einen Wirkstoff oder eine Wirkstoffgruppe, jedoch können Resistenzen auch mehrere Substanzklassen betreffen. Bei so genannten Nebenresistenzen richtet sich die Resistenz nicht nur gegen einen Wirkstoff, sondern auch gegen andere, chemisch ähnliche im Wirkmechanismus verwandte Substanzen. Bei einer Kreuzresistenz ist auch ein chemisch nicht verwandter Stoff von der Resistenz mit betroffen. Am problematischsten sind multiple Resistenzen, bei denen Resistenz gegen mehrere Wirkstoffgruppen gleichzeitig besteht (Eckert et al., 2005a; Tenter, 2006). Es gibt einige generelle Mechanismen, die dazu führen können, dass Anthelminthika nicht mehr ihre volle Wirkung entfalten können und Populationen als resistent eingestuft werden müssen: 1. Veränderungen der Resorption des Medikaments (Albert, 1985). 2. Ausschleusen aus der Zelle durch Pumpmechanismen, wie etwa durch P-glycoproteine (Kerboeuf und Guegnard, 2011). 3. Veränderungen in der Anzahl der Zielstrukturen des anthelminthischen Wirkstoffes, z.B. Verringerung der Rezeptoranzahl (Albert, 1985). 4. Genetische Modifikationen am Rezeptorgen, die z.B. eine Bindung der anthelminthischen Substanz verhindern (Albert, 1985). 5. Posttranslationale Rezeptormodifikationen, z.B. Phosphorylierung, die ebenfalls eine Bindung des anthelminthischen Stoffes erschweren (Albert, 1985). 6. Erhöhter Metabolismus, der zum Abbau von Wirkstoffen beiträgt, z.B. durch Cytochrom P450 Enzym (Brown et al., 2008).

Die Entwicklung einer Arzneimittelresistenz wird durch eine vermehrte Verabreichung des Wirkstoffes über längere Zeiträume hinweg vorangetrieben. Diejenigen Individuen einer Population, welche beispielsweise durch einen der bereits genannten Mechanismen eine Resistenz besitzen und somit unempfindlich gegen die Behandlung mit einem oder mehreren Chemotherapeutika geworden sind, werden mit jeder weiteren Behandlung positiv selektiert. Sie und ihre Nachkommen überleben, während alle empfindlichen Individuen der Population absterben. Dadurch steht ihnen mehr Platz und mehr Nahrung zur Verfügung, die resistenten Individuen können sich stärker vermehren, und somit wird ihr Anteil an der Gesamtpopulation immer größer (Eckert et al., 2005a). Desweiteren können sich durch genetische Rekombination unterschiedliche Resistenzmechanismen kombinieren und so die Resistenz verstärken. Diese Entwicklung vollzieht sich besonders schnell bei Organismen mit einer hohen Reproduktionsrate und einer kurzen Generationszeit.

Die World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) gibt Richtlinien vor, nach denen Anthelminthikaresistenz bewertet, untersucht und überwacht werden kann. Zu diesen Methoden zählt beispielsweise für Schafe der Eizahlreduktionstest (FECRT), bei dem eine unter 95 % liegende Eizahlreduktion mit einer unteren Grenze des 95 % Konfidenzintervalls unter 90 % auf das Bestehen einer Resistenz hinweist (Coles et al., 1992; Coles et al., 2006). Im sogenannten Larven-Schlupf-Hemmtest sollte die Schlupfhemmung für definierte Konzentrationen eines Medikamentes, die an sensiblen Isolaten etabliert wurden, sogar bei über 99 % liegen (Diskriminierende Dosis). Niedrigere Werte lassen auch hier Resistenzbildung vermuten (Coles et al., 2006).

In vielen Teilen der Welt richtet die fortschreitende Entwicklung von Resistenzen gegen die gängigen anthelminthischen Wirkstoffe bereits große ökonomische Schäden an, wobei vor allem multiresistente Stämme ein Problem darstellen (Kaplan, 2004; Wolstenholme et al., 2004). Besonders von Resistenzbildungen betroffen sind die Magen-Darm-Parasiten der Nutztiere, z.B. die kleinen Strongyliden des Pferdes, bei denen bereits von Resistenzen gegen Benzimidazole, Pyrantel und Ivermectin berichtet wurde, sowie die Trichostrongyliden von Schaf und Rind (von Samson-Himmelstjerna, 2006; von Samson-Himmelstjerna et al., 2007). Resistenzen gegen Levamisol, Benzimidazole und auch makrozyklische Laktone sind bei Schafen und Rindern

bereits sehr weit verbreitet. Besonders betroffen sind die Schafherden in Australien, Neuseeland und Südafrika sowie die großen Rinderherden in Südamerika (Overend et al., 1994; Eddi et al., 1996; van Wyk et al., 1999; von Samson-Himmelstjerna, 2006). In Argentinien konnten bei Rindern Fälle von Multiresistenzen gegen Avermectine und Benzimidazole festgestellt werden, wobei eine Behandlung mit beiden Substanzklassen nur eine 15%ige Reduktion im FECRT ergab (Anziani et al., 2004). Ebenfalls in Argentinien zeigte eine Studie von Eddi et al. (1996) das Auftreten von Resistenzen gegen die meisten gängigen Anthelminthikaklassen bei Untersuchungen auf 65 Schaffarmen. Vierzig Prozent der Farmen wiesen Resistenzen gegen Benzimidazole auf, 22 % waren mit Levamisol-resistenten Nematodenpopulationen befallen, ein geringer Prozentsatz zeigte auch Resistenzen gegen Ivermectin und anthelminthische Kombinationspräparate (Eddi et al., 1996). In Brasilien ist die Situation der Schaffarmen tatsächlich noch kritischer. Auf 97 % von 182 untersuchten Schaffarmen konnten resistente Nematodenstämme gefunden werden. Neunzig Prozent der Nematodenpopulationen auf den Farmen zeigten Resistenzen gegenüber Benzimidazolen, 84 % auch gegenüber Levamisol und 73 % waren resistent gegen eine Kombination aus beiden Substanzklassen. Auf 13 % der Farmen ließen sich sogar Probleme mit Ivermectinresistenzen feststellen (Echevarria et al., 1996). Ähnlich schwierig ist die Situation der Schaffarmer in Südafrika, auch dort sind bereits weitreichende Resistenzbildungen zu verzeichnen (van Wyk et al., 1999).

Nach einer Zusammenfassung von Sutherland und Leathwick (2010) konnten 145 dokumentierte Fälle von Anthelminthikaresistenz bei Rindern gegen die gängigen Breitspektrum-Anthelminthika festgestellt werden. Dabei waren insgesamt zehn verschiedene gastrointestinale Nematodenspezies betroffen in insgesamt 11 Ländern und die überwiegende Zahl der Fälle war in den letzten fünf Jahren dokumentiert worden (Sutherland und Leathwick, 2010). Dies könnte auf eine Zunahme von Resistenzen hindeuten oder aber nur durch einen Anstieg in der Häufigkeit der Tests auf Resistenz bedingt sein, vermutlich spielt beides eine Rolle (Sutherland und Leathwick, 2010). Besonders hoch ist die Anzahl der Rinderfarmen mit Resistenzproblemen in Neuseeland, Australien und Südamerika. In Neuseeland konnten 2005 auf mehr als 90 % der Farmen resistente Parasiten gefunden werden (Sutherland und Leathwick, 2010). Neueste Studien

dokumentieren aber auch bereits einen Fall von Multiresistenz bei parasitischen Nematoden von Rindern in den USA (Gasbarre et al., 2009a; Gasbarre et al., 2009b).

Insgesamt ist die Ausbildung von Resistenz in Europa bei Rindernematoden weniger problematisch als bei Schafnematoden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Behandlungsfrequenz und damit die Ausbildung von Resistenzen im Schaf höher sind als im Rind. Außerdem liegt die Behandlungsfrequenz bei Rindern außerhalb von Europa, wie etwa in Südamerika, höher als innerhalb Europas. Eine weitere Ursache könnte die Bildung eines Refugiums sein. In der gemäßigten Klimazone Europas ist das Überleben von vielen Larven außerhalb des Wirtes, und damit die Bildung eines Refugiums, eher gewährleistet als in ariden Gebieten, wo das Überleben der Larven außerhalb des Wirtes problematisch ist.

Beim Konzept des Refugiums als für die Entwicklung der Anthelminthikaresistenz mitentscheidendem Faktor wird davon ausgegangen, dass nur etwa 5 % der Population von parasitierenden Magen-Darm-Nematodenlarven einer Rinderherde sich im Tier befinden und somit unter direktem Anthelminthikaeinfluss stehen. Die restlichen 95 % der Population befinden sich auf der Weide (Barnes et al., 1988; Kenyon et al., 2009). Sie bilden dort ein sogenanntes Refugium, einen Teil der Population, der sich aus Entwicklungsstadien zusammensetzt, die nicht der Anthelminthikabehandlung im Wirt ausgesetzt sind (van Wyk, 2001; Soulsby, 2007). Auf diese Weise kann der durch die Anthelminthika hervorgerufene Selektionsdruck auch nur in dem geringen Prozentsatz der Nematoden, die tatsächlich im Tier sind, die Entwicklung von Resistenzen hervorrufen. Der Prozentsatz der Nachkommen resistenter Nematoden auf der Weide ist bei wenigen Behandlungen pro Jahr dann auch eher gering, kann aber mit steigendem Selektionsdruck, also bei verstärkter Behandlungsfrequenz, auch ansteigen. Wenn schließlich der Anteil resistenter Individuen in der Population überwiegt, ist eine Anthelminthikaresistenz festzustellen. Wie schnell dieser Zeitpunkt eintritt, hängt sehr stark von Behandlungsintensität und -frequenz ab. Um die Entwicklung von Anthelminthikaresistenzen zu stoppen wird diskutiert, zielgerichtet nur akut erkrankte Tiere zu behandeln, den Rest der Herde nicht (Kenyon et al., 2009). Diese Strategie ist jedoch bei sehr großen Herden auf Grund der fehlenden Übersicht problematisch.

Darüber hinaus ist die Entwicklung neuer anthelminthischer Wirkstoffe mit neuen Wirkmechanismen gegen resistente Parasitenpopulationen sehr wichtig, um Alternativen zu den alten, bereits wirkungslos gewordenen Substanzklassen zu schaffen (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002). Aus diesem Grund waren auch die Entdeckung der Cyclooctadepsipeptide und ihrer ersten Vertreter, PF1022A und Emodepsid in den 90er Jahren, sowie die kürzliche Identifizierung der Amino-Acetonitril-Derivate und ihres ersten Vertreters Monepantel, ebenso wie die Entdeckung der Paraherquamide und ihres Vertreters Derquantel als anthelminthisch wirksame Substanzklassen wichtige Erfolge. Allerdings ist Emodepsid bisher nur für Hunde und Katzen, und Monepantel und Derquantel nur für Schafe zugelassen, was diese Substanzen nur für einen kleinen Teil der Wirtstiere zur Bekämpfung parasitischer Infektionen nützlich macht.

2.2.2 Anthelminthische Wechselwirkungen

Eine weitere Möglichkeit zur besseren Nutzung der vorhandenen Substanzklassen ist die Erforschung von Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Substanzen und die Überprüfung von Möglichkeiten zur Bildung von Kombinationstherapien (Hu et al., 2010).

Das vermehrte Auftreten von Anthelminthikaresistenzen ist ein weltweites Problem und die Forschung nach neuen Wirkstoffen ist daher umso wichtiger. Allerdings sollten auch andere Maßnahmen in Betracht gezogen werden, welche zur Überwindung von Resistenzen von Nutzen sein könnten. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf mögliche Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Anthelminthikaklassen gelegt werden (Hu et al., 2010). Man unterscheidet mehrere Arten von Wechselwirkungen. Als Potenzierung bezeichnet man einen Fall, in dem ein Präparat A wirkungslos ist und ein Präparat B eine gewisse Wirkung zeigt, beide zusammen verabreicht aber eine Wirkung zeigen, die größer ist als die von B alleine (Chou, 2006). Zwei Medikamente deren Wirkungen sich addieren bezeichnet man als additiv. Fördern sich die beiden Medikamente sogar in ihrer Wirkung, so dass ihr gemeinsamer Effekt größer ist als additiv, bezeichnet man das als Synergismus. Bei einem sogenannten Antagonismus zwischen zwei Substanzen ist die Wirkung bei gemeinsamer Anwendung geringer als die Summe der additiven Einzelwirkungen (Chou, 2006). Diese Art von Wechselwirkungen kann mathematisch durch einen Kombinationsindex (KI) dargestellt werden. Ein KI

Wert kleiner 1 zeigt Synergismus an, gleich 1 Additivität und größer 1 Antagonismus (Chou, 2006).

Es gibt bereits einige Beispiele für ein synergistisches Zusammenwirken anthelminthischer Wirkstoffe, beispielsweise konnte ein Synergismus zwischen den Acetylcholin-Rezeptor-Agonisten Tribendimidin, Levamisol und Pyrantel und dem Crystal Protein CRY5B aus *Bacillus thuringiensis* festgestellt werden (Hu et al., 2010). Es zeigte sich in Forschungen an *C. elegans*, dass die Dosis von Levamisol in einem *C. elegans* Assay in Gegenwart von CRY5B Protein 39-fach geringer sein konnte als bei alleiniger Behandlung mit Levamisol, um das gleiche Ergebnis zu erzielen. Die Tribendimidinkonzentration konnte bei gleichzeitiger Verabreichung von CRY5B Protein 10-fach niedriger sein bei gleichbleibender Wirksamkeit (Hu et al., 2010). Ein weiteres Beispiel für eine synergistische Wirkung zweier Anthelminthika zeigt eine Studie, in der das Anthelminthikum Piperazin und das zyklische Depsipeptid Emodepsid gegen *Trichinella spiralis* Larven eine deutlich synergistische Wirkung aufweisen (Nicolay et al., 2000).

Auch in der Insektizidforschung gibt es Beispiele für Synergismen. So konnte festgestellt werden, dass sich der insektizide Effekt des Pyrethroids Permethrin und des Carbamats Propoxur in Kombination synergistisch verstärken (Corbel et al., 2006).

Eine weitere wichtige Wechselwirkung zwischen anthelminthischen Wirkstoffen ist das Auftreten von sogenannter Hypersensibilität, die auch als "negative cross resistance" (NCR) bezeichnet wird (Pittendrigh et al., 2000). Dabei kann beobachtet werden, dass Parasitenpopulationen, die beispielsweise durch Rezeptormutationen gegen eine Anthelminthikaklasse resistent geworden sind, dafür besonders sensibel auf andere Anthelminthikaklassen reagieren (Hu et al., 2010). Auch das konnte bereits bei einer Untersuchung mit CRY5B Protein und Acetylcholin-Rezeptor-Agonisten festgestellt werden. Levamisol-, Pyrantel- und Tribendimidin-resistente *C. elegans* zeigten sich hypersensibel gegenüber CRY5B Protein, das bedeutet, sie waren empfindlicher als Wildtyp-Nematoden. Im umgekehrten Fall zeigten CRY5B Protein-resistente *C. elegans* eine Hypersensibilität gegen Levamisol, Tribendimidin und Pyrantel (Hu et al., 2010). Innerhalb der parasitischen Nematoden ist das Auftreten der NCR noch nicht näher untersucht, besser bekannt ist es im Bereich der Schadarthropoden. So konnte an *Drosophila melanogaster* para^{ts-1} Mutanten, welche resistent gegen

DDT sind, eine gleichzeitige Hypersensibilität für Deltamethrin festgestellt werden. Die Mutanten waren siebenmal sensibler als der Wildtyp (Pedra et al., 2004). Ein ähnliches Ergebnis war in einem Experiment mit grünen Zikaden *Nephotettix cincticeps*, welche in Japan große Schäden am Reisbeständen anrichten, zu beobachten (Yamamoto et al., 1993). Das Insektizid N-Methylcarbamat zeigt einen deutlichen Synergismus in Kombination mit den Insektiziden N-Propylcarbamate und Oxadiazolon. Weiterhin sind gegen N-Methylcarbamate resistente Zikaden hypersensibel gegenüber N-Propylcarbamate und Oxadiazolone. Es zeigt sich eine deutliche negative Kreuzresistenz, die sich sogar resistenzbrechend auswirkt, da ein Kombinationspräparat aus den Wirkstoffen alle Zikaden abtötet (Yamamoto et al., 1993).

Dies ist ein gutes Beispiel dafür, wie es durch das Prinzip der NCR sogar möglich ist, resistente Populationen wieder zu re-sensibilisieren, indem man gegen die resistenten Allele in der Population gezielt selektiert (Pittendrigh et al., 2000). Behandelt man beispielsweise eine Fliegenpopulation lange mit dem gleichen Insektizid und es bildet sich eine Resistenz heraus, so wird der Anteil der Resistenzträger mit jeder weiteren Behandlung durch dieses Medikament ansteigen, bis fast nur noch resistente Individuen übrig sind. Kann nun eine NCR zu einem anderen Insektizid ausgemacht werden und wird in der Behandlung auf dieses Medikament gewechselt, so werden all die resistenztragenden Individuen der Population stärker durch dieses zweite Insektizid geschädigt als nicht resistente, da mit der Resistenz gegen das erste Insektizid eine Hypersensibilität für das zweite Insektizid einhergeht. Das bedeutet, dass nun besonders die Fliegen, welche gegen das erste Insektizid resistent waren, abgetötet werden. Übrig bleiben nur die sensiblen Individuen, aus denen sich die neue Population gründet, welche nun wiederum vollkommen empfänglich für das erste Insektizid ist (Pittendrigh et al., 2000).

In diesem Bereich besteht weiterer Forschungsbedarf und -potential. Ein Hochdurchsatz "Screening" nach Substanzen, wie es heute für die Suche nach neuen anthelminthisch wirksamen Stoffen schon durchgeführt wird, wäre auch für die Suche nach NCR zwischen bekannten Stoffen wichtig (Pittendrigh und Gaffney, 2001).

Der Nutzen dieser anthelminthischen Wechselwirkungen für die praktische Anwendung ist nicht zu unterschätzen. So ist es beispielsweise unerlässlich zu

wissen, ob zwei in Kombination oder relativ schnell hintereinander verabreichte Medikamente sich in ihrer Wirksamkeit behindern oder gänzlich aufheben, um unwirksame Therapien zu vermeiden. Ebenso wichtig ist es, synergistische Wirkungen zwischen anthelminthischen Substanzen zu erkennen und diese für die Behandlung auszunutzen. Auf diese Weise lässt sich die Dosierung einzelner Medikamente bei gleichbleibender Wirksamkeit drastisch senken, was mögliche Toxizität und Nebenwirkungen von Medikamenten verringern und die Behandlungskosten senken kann. Das Ausnutzen eines synergistischen Effektes kann außerdem die Effizienz der Therapie erhöhen und Resistenzbildungen vorbeugen (Hu et al., 2010).

Auch das Phänomen der Hypersensibilität sollte weiterhin erforscht werden. Informationen darüber, dass Resistenz gegenüber einer Anthelminthikaklasse möglicherweise die Population besonders empfänglich für eine andere macht, können helfen, die Behandlung von Parasiteninfektionen zu optimieren (Pittendrigh et al., 2000; Hu, 2010). Zumindest stellt es eine Alternative zu dem derzeitigen Ansatz dar, Anthelminthika solange zu verabreichen, bis sie keine Wirkung mehr besitzen und sie dann durch Neue zu ersetzen ("use-and-discard"-Prinzip) (Pittendrigh et al., 2000).

2.3 Untersuchte anthelminthische Wirkstoffgruppen

2.3.1 Muscimol

Muscimol (5-(Aminomethyl)-3(2H)-Isoxazolone), auch bezeichnet als Agarin oder Pantherine, ist eine natürliche, haluzinogene Substanz, die von Pilzen der Familie Amanita gebildet wird, wie beispielsweise dem Fliegenpilz, *Amanita muscaria*. Muscimol bindet als Agonist an den GABA_A-Rezeptor (Macdonald und Olsen, 1994) und verursacht so eine schlaffe Paralyse des Muskels. Während Wildtyp *C. elegans* auf Muscimol mit Lähmung reagieren, bleiben *unc-49* "loss of function" Mutanten von der Substanz unbeeinflusst (McIntire et al., 1993). Die Strukturformel von Muscimol ist in Abbildung 2.3 im Vergleich zur Strukturformel von GABA dargestellt.

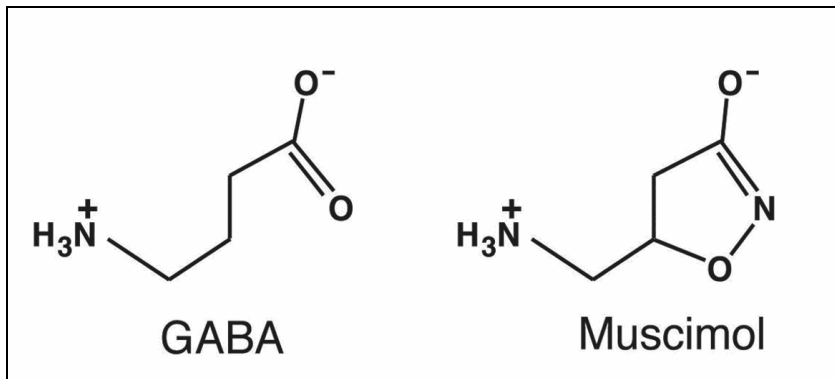


Abb. 2.3: Strukturformel von GABA und Muscimol im Vergleich (verändert nach: Wormbook, Jorgensen, 2005)

2.3.2 Piperazin

Die Verbindung 1,4-Diethylendiamine, genannt Piperazin (Abb.:2.4) wird seit den 50er Jahren als Anthelminthikum eingesetzt. Seitdem wurden verschiedene Derivate davon erzeugt und für die Bekämpfung von Nematodeninfektionen verwendet (Courtney, 1995). Piperazin besitzt eine einfache Ringstruktur, ist gut löslich in Wasser und Glycerol, weniger gut löslich in Alkohol und unlöslich in Ether. Es ist eine starke Base und relativ instabil, weshalb es sich empfiehlt, mit seinen wesentlich stabileren Salzen zu arbeiten.

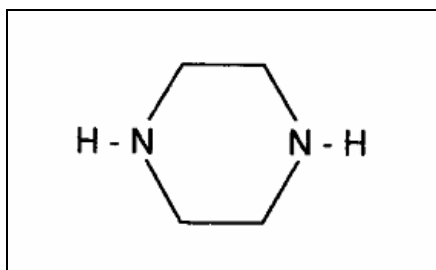


Abb. 2.4: Strukturformel von Piperazin

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass Piperazin wie GABA auf den GABA-Rezeptor wirkt und dort zu einem Einstrom von Chloridionen führt, der wiederum eine Hyperpolarisation der Plasmamembran bewirkt. Dies führt zu einer schlaffen, reversiblen Paralyse der Körpermuskulatur (Martin, 1985; Martin, 1997). Jedoch ist die Wirkung bis zu 100-fach geringer als die von GABA, was in Studien an *A. suum* gezeigt werden konnte (Martin, 1985). Es könnte sich bei Piperazin um einen wenig effizient wirksamen GABA-Agonisten handeln (Holden Dye und Walker, 2007).

2.3.3 Tribendimidin

Bei dem Anthelminthikum Tribendimidin handelt es sich um ein symmetrisches Aminophenyldimidin, das als Derivat des Amidantels im Jahre 1983 vom "Chinese National Institute of Parasitic Diseases" in Shanghai entwickelt und 2004 von der chinesischen Regierung als Präparat für Menschen zugelassen wurde (Xiao et al., 2005; Keiser et al., 2008; Hu et al., 2009). Chinesische Studien stufen die Substanz als sicher ein und sie verfügt über ein breites Wirkungsspektrum gegen parasitische Nematoden. Bereits bewiesen sind unter anderem Wirksamkeiten gegen *Ascaris*, *Trichuris*, Hakenwürmer, *Strongyloides*, Trematoden und Cestoden (Keiser et al., 2008; Steinmann et al., 2008; Hu et al., 2009).

Der Name Tribendimidin steht für N,N'-bis(4'-(1-dimethyl amino ethylen)amino)phenyl)-1,4-phenylen-dimethyldiylne amin, seine Strukturformel ist in Abbildung 2.5 zu sehen (Xiao et al., 2005).

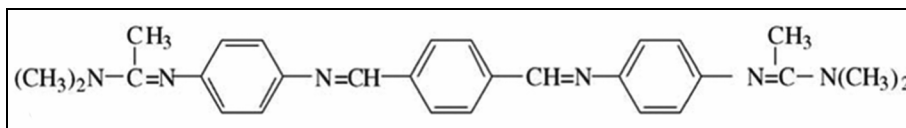


Abb. 2.5: Strukturformel von Tribendimidin (Xiao et al., 2005)

Bei Tribendimidin handelt es sich um ein gelbes, kristallines Pulver, welches geschmackslos ist und sich am besten in Chloroform löst. Weniger gut löst es sich in Dimethylsulfoxyd (DMSO), Alkohol oder Aceton. In Wasser ist es gänzlich unlöslich (Xiao et al., 2005).

Sein tatsächlicher Wirkmechanismus ist noch ungeklärt. Man hoffte lange, es könnte möglicherweise einen ganz neuen Wirkmechanismus besitzen und so zur Brechung von Resistenzen beitragen. Neuere Studien zeigten allerdings, dass es eine enge Verwandtschaft im Wirkmechanismus von Tribendimidin, Levamisol und Pyrantel gibt (Hu et al., 2009). Gegen Levamisol und Pyrantel resistente *C. elegans* Stämme, erwiesen sich ebenfalls als resistent gegen Tribendimidin (z.B. *unc-63*, *unc-38*, *unc-29*, *lev-1*, *lev-8*). Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der gleichen Gene, welche für die Levamisolresistenz verantwortlich sind, auch zu einer Tribendimidinresistenz führt. Außerdem führt Tribendimidin, ähnlich wie Levamisol, zu einer Hyperkontraktion der Körpermuskeln und somit zu einer spastischen Paralyse der Nematoden (Boulin et al., 2008), sowie zur verstärkten Eiablage (Hu et al., 2009). Daher muss davon ausgegangen werden, dass

Tribendimidin ebenfalls ein Mitglied der Acetylcholin-Rezeptor-Agonisten Anthelminthikaklasse ist und auch an die gleichen Untereinheiten bindet wie Levamisol und Pyrantel (Hu et al., 2009). Es ist somit nicht resistenzbrechend und bietet im Falle von Levamisolresistenz keine Lösung. Es ist jedoch hilfreich im Falle von Resistenz gegen Benzimidazole oder makrozyklische Laktone (Hu et al., 2009). Außerdem besitzt Tribendimidin im Gegensatz zu Levamisol eine große therapeutische Breite (Xiao et al., 2005), was ein möglicher Vorteil des Tribendimidins gegenüber dem Levamisol sein kann, selbst wenn sie den gleichen Wirkmechanismus besitzen

2.3.4 HLR-9291

HLR-9291 ist ein Derivat des Tribendimidins. Es ist ein hellgelbes kristallines Pulver, welches sich nicht in Wasser löst und nur mäßige Löslichkeit in Alkohol und DMSO aufweist. Da dieser Stoff bisher nicht zugelassen ist und es sich dabei noch um eine experimentelle Formulierung handelt, sind darüber bis jetzt keine Einzelheiten bekannt.

2.3.5 Cyclooctadepsipeptide

Bei den Cyclooctadepsipeptiden handelt es sich um eine noch relativ junge anthelminthisch wirksame Stoffklasse, deren erster Vertreter, das PF1022A, Anfang der 90er Jahre entdeckt wurde. Der Wirkmechanismus der Cyclooctadepsipeptide ist noch nicht gänzlich erforscht, unterscheidet sich jedoch von den Wirkmechanismen der bisher bekannten Anthelminthikagruppen, was dazu führt, dass die Cyclooctadepsipeptide auch gegen Nematodenpopulationen wirksam sind, die bereits Resistenzen gegen andere Anthelminthika entwickelt haben (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002; von Samson-Himmelstjerna et al., 2005). Das erste im Handel erhältliche Cyclooctadepsipeptid ist ein Derivat des PF1022A, das Emodepsid.

2.3.5.1 PF1022A

Die anthelminthische Wirkung des PF1022A wurde im Jahre 1990 durch den japanischen Konzern Meiji Seika Kaisha entdeckt. PF1022A ist ein Fermentationsprodukt des Pilzes *Rosellinia* sp. PF1022. Der Pilz gehört zum Phylum Ascomycota und bildet auf den Blättern der Pflanze *Camellia japonica*

einen Teil der Mikroflora (Sasaki et al., 1992; Miyadoh et al. 2000; Harder et al., 2003). PF1022A wurde aus einer *Rosellinia* sp. PF1022 Kultur isoliert und seine chemischen Eigenschaften, sowie seine biologische Aktivität untersucht. Bei PF1022A handelt es sich um eine chemisch neutrale Substanz mit einem Schmelzpunkt von 104-106 °C. Es ist löslich in verschiedenen Alkoholen, DMSO und Chloroform, aber nicht in Wasser. Die Summenformel von PF1022A ist $C_{52}H_{76}N_{40}O_{12}$ (Sasaki et al., 1992). Es enthält vier N-Methyl-L-Leucine, sowie zwei D-Laktat-Moleküle und zwei D-Phenyl-Laktat-Moleküle. Diese bilden das zyklische Oktadepsipeptid und alternieren in L-D-L-Konfiguration (Sasaki et al., 1992; Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002; Harder et al., 2003). Zu sehen ist die Strukturformel von PF1022A und seinem halbsynthetischen Derivat Emodepsid in Abbildung 2.6.

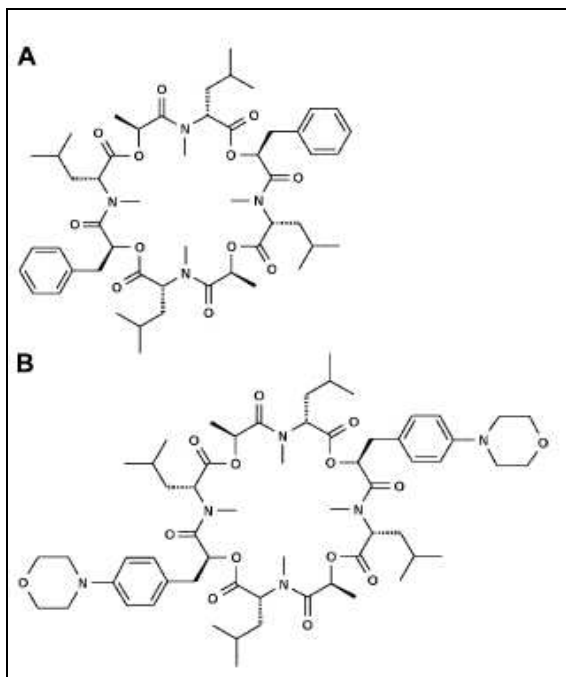


Abb. 2.6: Struktur des PF1022A (A) und Emodepsid (B) im Vergleich (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002).

Eine Unbedenklichkeit von PF1022A für den Wirtsorganismus konnte in Versuchen mit *Ascaridia galli* infizierten Hühnern bewiesen werden. PF1022A zeigte eine starke anthelminthische Aktivität gegen die Nematoden ohne dem Wirtsorganismus Schaden zuzufügen (Sasaki et al., 1992; von Samson-Himmelstjerna et al., 2000).

Im Jahre 1993 wurde durch die Firma Fujisawa Pharmaceutical Co. in Japan ein halbsynthetisches Derivat des PF1022A erzeugt und patentiert, das Emodepsid. Es enthält zwei zusätzliche Morpholinringe, wie in Abbildung 2.6 zu sehen ist, die an den D-Phenyl-Laktat-Molekülen in para Position angehängt sind. Seine anthelminthische Wirksamkeit, sowie Löslichkeit sind im Vergleich zum PF1022A verbessert (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002; Harder et al., 2003).

2.3.5.2 Emodepsid

Das PF1022A-Derivat Emodepsid hat ein sehr breites Wirkungsspektrum. Es wirkt gegen verschiedene Arten von Nematoden bei Maus, Ratte, Geflügel, Schaf, Rind, Pferd, Hund und Katze (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002), außerdem auch gegen *T. spiralis* Larven im Muskel, Mikrofilarien, präadulte Filarien und *Dictyocaulus viviparus* (von Samson-Himmelstjerna et al., 2000; Harder et al., 2003).

Als erstes zugelassenes Emodepsidpräparat wurde von der Firma Bayer HealthCare im Jahre 2005 das Spot-on Präparat Profender® für Katzen herausgebracht. Dabei handelt es sich um ein Kombinationspräparat aus Emodepsid und Praziquantel, welches eine Vielzahl von in Europa vorkommenden gastrointestinalen Endoparasiten bekämpft. Während Emodepsid gegen mehrere Stadien von Spul- und Hakenwürmern wirkt (Altreuther et al., 2005; Reinemeyer et al., 2005), greift das enthaltene Praziquantel vor allem Cestoden an (Charles et al., 2005). Im Jahre 2009 wurde dann ein ähnliches Kombinationspräparat aus Emodepsid und Praziquantel ebenfalls unter dem Namen Profender® zur oralen Einnahme für Hunde zugelassen (Altreuther et al., 2009).

Das neuste Kombinationspräparat mit Emodepsid und Toltrazuril ist unter dem Namen Procox® für Hunde und Katzen zugelassen. Seine Wirkung gegen *T. canis*, *Ancylostoma caninum*, *Uncinaria stenocephala* und *Isospora spec.* konnte gezeigt werden (Schimmel et al., 2011; Altreuther et al., 2011; Petry et al., 2011).

Emodepsid zeigt besonderen Nutzen in der Anwendung gegen anthelminthikaresistente Stämme. Grund dafür ist sein sich von allen anderen Anthelminthikaklassen unterscheidender Wirkmechanismus (Harder et al., 2003). In einer Studie mit Benzimidazol-, Levamisol-, und Ivermectin-resistenten *Haemonchus contortus* und *Cooperia oncophora* Populationen konnte die

resistenzbrechende Wirkung von Emodepsid verdeutlicht werden (von Samson-Himmelstjerna et al., 2005). Während das Benzimidazol Febantel, sowie Ivermectin und Levamisol gegen die resistenten *H. contortus* und *C. oncophora* Populationen kaum Wirkung zeigten, war Emodepsid in der Lage, alle untersuchten resistenten Stämme abzutöten. Bei den resistenten *C. oncophora* konnte beispielsweise mit Ivermectin nur eine 23%ige Reduktion der Wurmbürde erreicht werden, während Emodepsid eine 96%ige Reduktion bewirkte. Die Eizahlreduktion der resistenten *H. contortus* Population betrug bei Behandlung mit Levamisol nur etwa 12 %. Mit Emodepsid konnte eine 94%ige Eizahlreduktion erreicht werden (von Samson-Himmelstjerna et al., 2005).

Der Emodepsidwirkmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, doch es sind bereits mehrere Rezeptoren bekannt, die im Emodepsidwirkmechanismus eine wichtige Rolle spielen. Emodepsid wirkt auf den Bewegungsapparat der Nematoden und führt zu einer schlaffen Paralyse, sowohl der Körper- als auch der Pharynxmuskulatur. Durch die Bewegungsunfähigkeit und Störung der Nahrungsaufnahme sterben die Nematoden ab (Willson et al., 2003). Bei den ersten Untersuchungen zum Emodepsidwirkmechanismus stieß man beim Immunoscreening einer cDNA Bank von *H. contortus* mit einem PF1022A-Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH) Konjugat und einem gegen dieses Konjugat gerichteten Kaninchenantiserum auf den Transmembranrezeptor HC110-R (Saeger et al., 2001; Harder et al., 2005). Der in der Plasmamembran lokalisierte Rezeptor HC110-R ist den Lathrofillin-Rezeptoren der Säugetiere und dem Lat-1 von *C. elegans* sehr ähnlich. Emodepsid, PF1022A und α -Latrotoxin, das Gift der schwarzen Witwe, binden an HC110-R (Saeger et al., 2001; Harder et al., 2005). Es wurde daraufhin vermehrt nach orthologen Sequenzen zu solchen Rezeptoren in anderen parasitischen Nematoden gesucht. Diese konnten in Form der Depsiphiline gefunden werden. Die Depsiphiline konnten bereits bei verschiedenen Nematoden nachgewiesen werden, z.B. bei *C. oncophora* und *Ostertagia ostertagi* (Welz et al., 2005). Jedoch zeigen neuere Studien, dass Lathrofillin-ähnliche Rezeptoren eine eher untergeordnete Rolle im Emodepsidwirkmechanismus spielen, da sich eine andere Gruppe von Rezeptoren als wesentlich relevanter erwies. Neueren Untersuchungen an *C. elegans* zur Folge hat sich der Kalzium-aktivierte Kaliumkanal SLO-1 als besonders wichtig für die anthelminthische Wirkung von Emodepsid herausgestellt

(Guest et al., 2007). Darüber hinaus legen weitere Studien auch die Beteiligung eines anderen potentiellen Rezeptors am Emodepsidwirkmechanismus, des γ -Aminobuttersäure-Rezeptors (GABA_A -Rezeptor) *unc-49B*, nahe. Es konnte bereits sehr früh an einem *A. suum* Muskelpräparat nachgewiesen werden, dass PF1022A an einen ionotropen GABA_A -Rezeptor bindet (Chen et al., 1996). Auch wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass GABA_A -Antagonisten wie Bicuculline das PF1022A verdrängen und seine Wirkung teilweise aufheben (Harder et al., 2003).

2.4 Rezeptoren

Viele anthelminthische Wirkstoffgruppen haben als Zielstrukturen Rezeptoren des Nervensystems der Nematoden, wie etwa Imidazothiazole, deren Angriffspunkt die Acetylcholin-Rezeptoren darstellen (Boulin et al., 2008). Aus diesem Grund ist es bei der Suche nach anthelminthischen Wirkmechanismen wichtig, mögliche Wirkungen auf neuronale Rezeptoren aufzuklären. In dieser Arbeit wurden verschiedene Rezeptoren und ihre Bedeutung als anthelminthische Zielstrukturen untersucht.

2.4.1 GABA-Rezeptoren

Die Aminosäure γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Nervensystem von Nematoden. Sie wird mit Hilfe des Enzyms Glutaminsäure Decarboxylase aus Glutamat gebildet, wie in Abbildung 2.7 gezeigt ist (Macdonald und Olsen, 1994).

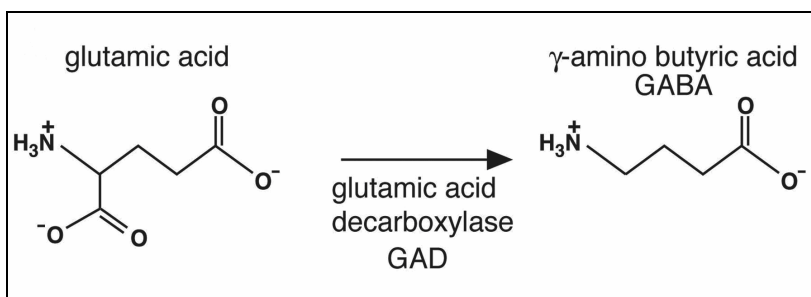


Abb. 2.7: Synthese von GABA aus Glutamat. (Verändert nach Wormbook, Jorgensen, 2005)

GABA bindet an GABA_A -Rezeptoren, wobei die ionotropen GABA_A -Rezeptoren die größte Rolle im Nervensystem von Vertebraten und Invertebraten spielen

(Macdonald und Olsen, 1994). Bei GABA_A-Rezeptoren handelt es sich um Membranproteine, die Chloridionenkanäle formen. Sie sind unter anderem im Nervensystem an den Motoneuronen lokalisiert. Die Bindung von GABA an GABA_A-Rezeptoren bewirkt eine Konformationsänderung, die zur Öffnung einer Pore im Chloridionenkanal führt durch die Chloridionen in die Zelle strömen können, was zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials führt (McIntire et al., 1993; Bamber et al., 2003). GABA-Rezeptoren sind ein Angriffspunkt für viele Medikamente, wie etwa Antiparasitika bei Invertebraten (Bamber et al., 2003). Sie sind somit für die medizinische Forschung von großem Interesse.

Abbildung 2.8 zeigt die Strukturformeln einiger Stoffe, die mit GABA-Rezeptoren interagieren. Beispiele für Wirkstoffe, welche eine agonistische Wirkung auf GABA-Rezeptoren haben, sind Muscimol und Baclofen. Diese Stoffe imitieren den Neurotransmitter GABA und aktivieren an seiner Stelle den GABA-Rezeptor. Wirkstoffe mit GABA-antagonistischer Wirkung sind Bicuculline und Saclofen. Sie hemmen die Wirkung von GABA auf den GABA-Rezeptor.

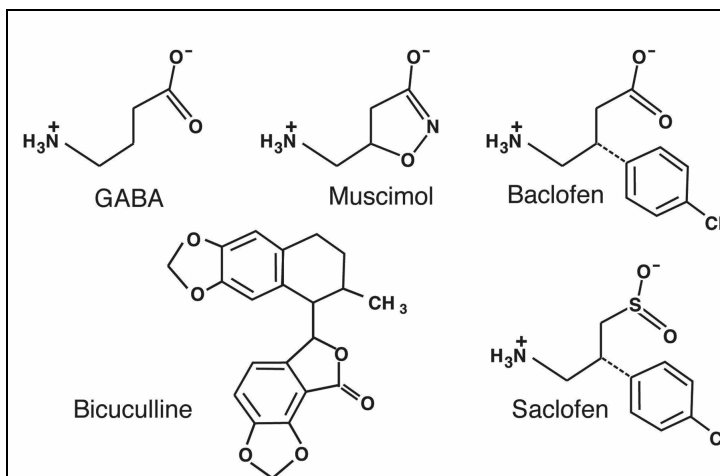


Abb. 2.8: Wirkstoffe, die an GABA-Rezeptoren binden: Muscimol und Baclofen sind GABA_A-Agonisten, während Bicuculline und Saclofen antagonistisch auf den GABA_A-Rezeptor wirken (Verändert nach Wormbook, Jorgensen, 2005).

An der neuromuskulären Synapse bewirken GABA_A-Rezeptoren bei Bindung von GABA eine Hyperpolarisation des Membranpotentials. Verursacht wird dies durch die Erhöhung der Membranleitfähigkeit für Chloridionen. Daraus resultiert eine postsynaptische Hemmung, was wiederum zum Erschlaffen des Muskels führt (Iravani, 1965). So kommt beispielsweise die schlängelnde Fortbewegung von Nematoden zu Stande, in dem die ventralen und dorsalen Muskelstränge

abwechselnd angespannt und durch GABA-Bindung wieder relaxiert werden, was zur typischen sinusoidalen Schlängelbewegung zum Beispiel bei *C. elegans* führt (McIntire et al., 1993). An der neuromuskulären Synapse von *C. elegans* wird nur ein GABA_A-Rezeptor exprimiert, welcher von dem Gen *unc-49* codiert wird (Richmond und Jorgensen, 1999).

2.4.1.1 *Unc-49*

Unc-49 codiert in Nematoden für einen GABA_A-Rezeptor, der die inhibitorische Neurotransmission zwischen Nerv und Muskel vermittelt. Dies ist für die koordinierte Bewegung des Wurmes von entscheidender Bedeutung (McIntire et al., 1993). UNC-49 ist in *C. elegans* der einzige inhibitorische GABA_A-Rezeptor, der an der neuromuskulären Synapse eine Rolle spielt (Richmond und Jorgensen, 1999). Abbildung 2.9 zeigt schematisch die Bindung von GABA an den GABA_A-Rezeptor an der neuromuskulären Synapse.

Caenorhabditis elegans denen das Gen *unc-49* fehlt, sind daran zu erkennen, dass sich die ventralen und dorsalen Muskelstränge gleichzeitig kontrahieren statt alternierend, was im Gegensatz zu einer regulären Schlängelbewegung ein Zusammenziehen des Wurmes bewirkt. Dieser spezielle Phänotyp wird als „Shrinker“ bezeichnet. Dadurch sind *C. elegans* Stämme mit abnormaler GABA-Funktion phänotypisch gut zu erkennen (McIntire et al., 1993). *Unc-49* kodiert für einen Transmembrankanal, mit einem extrazellulär liegenden NH₂-Terminus, der die GABA-Bindungsstelle trägt, und vier Transmembrandomänen M1-M4, von denen die M2 Domäne den Kanal formt, durch den die Chloridionen in die Zelle strömen. Der intrazelluläre Loop zwischen der Domäne M3 und M4 ist phosphoryliert (Bamber et al., 1999).

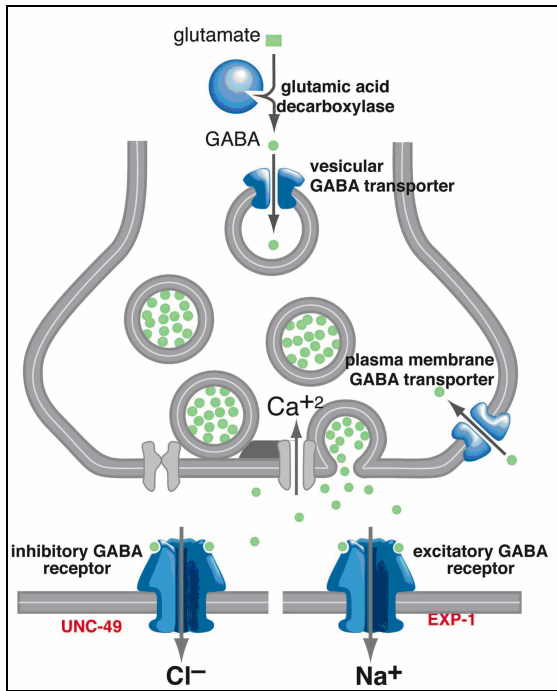


Abb. 2.9: Der Neurotransmitter GABA wird aus Glutamat gebildet und in Vesikeln vom Neuron an die neuromuskuläre Synapse abgegeben, wo die Bindung von GABA an den inhibitorischen GABA-Rezeptor zum Einstrom von Clorid-Ionen in die Zelle und so zu einem negativen Membranpotential führt. Das Gen *unc-49* codiert für diesen GABA_A-Rezeptor (verändert nach Wormbook, Jorgensen, 2005).

Unc-49 besitzt drei alternative "Splicing"-Varianten, die Untereinheiten *unc-49A*, *unc-49B* und *unc-49C*, von denen aber nur *unc-49B* und *C* *in vivo* stark exprimiert werden. Alle drei Untereinheiten haben etwa 40 % der codierenden Sequenz für den NH₂-Terminus gemeinsam, während sie sich im COOH-Terminus, in den Transmembrandomänen und der GABA-Bindungsstelle stark unterscheiden (Bamber et al., 1999; Siddiqui et al., 2010). Darüber hinaus scheinen sie unterschiedlich bedeutsam zu sein. Eine Expression von *unc-49A* konnte in *C. elegans* Hermaphroditen nicht gemessen werden. *Unc-49B* und *unc-49C* werden zwar beide an der neuromuskulären Synapse stark exprimiert, doch nur *unc-49B* ist alleine in der Lage, *in vivo* einen funktionellen GABA-Rezeptor zu bilden. *Unc-49C* ist dazu nur in Kombination mit *unc-49B* in der Lage, nicht jedoch alleine. Dafür spricht auch, dass sämtliche *C. elegans* GABA "loss of function" Stämme eine Mutation besitzen, die sich auf die Untereinheit *unc-49B* bezieht. Eine "loss of function" Mutation in der C-Untereinheit führt nicht zu einer phänotypischen Ausprägung. *Unc-49B* benötigt die Untereinheit *unc-49C* nicht, um einen funktionsfähigen Kanal zu formen. *Unc-49C* ist jedoch umgekehrt

durchaus auf *unc-49B* angewiesen, was zeigt, dass *unc-49B* nötig ist, um einen funktionsfähigen GABA_A-Rezeptor an der neuromuskulären Synapse zu formen (Bamber et al., 2005).

2.4.2 Acetylcholin-Rezeptoren

Acetylcholin ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Nervensystem von Nematoden und dient zur Übertragung von Erregungspotentialen von Synapsen auf die Effektorzelle (Rand, 2007). Nervenfasern, die Acetylcholin als Transmitter nutzen, bezeichnet man als cholinerg (Löscher, 2002). Acetylcholin dient bei Säugetieren zur Erregungsübertragung an postsynaptischen, parasymphatischen Nervenendigungen, somatomotorischen Nerven der neuromuskulären Synapse und präganglionären Fasern an allen vegetativen Ganglien und am Nebennierenmark (Löscher, 2002).

Eine Bindung von Acetylcholin an nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren führt zu einer Durchlässigkeit für verschiedene Kationen und somit zu einer Depolarisation des Membranpotentials, was wiederum zu einer leichteren Erregbarkeit und Reizweiterleitung führt, welche das Anspannen von Muskeln zur Folge hat.

Acetylcholin-Rezeptoren sind auch ein Angriffspunkt für Anthelminthika. Levamisol und Pyrantel beispielsweise binden an Levamisol-sensitive Acetylcholin-Kanäle (Boulin et al., 2008). Diese Acetylcholin-Agonisten haben eine wesentlich stärkere Wirkung auf die Acetylcholin-Rezeptoren von Invertebraten, als von Vertebraten. Dies macht sie als Anthelminthika sehr nützlich, da sie dem Wirt geringeren Schaden zufügen als dem Parasit. Bei Nematoden hat eine Aktivierung der Acetylcholin-Rezeptoren durch anthelminthische Wirkstoffe eine Hyperkontraktion der Muskeln und somit eine spastische Lähmung zur Folge (Boulin et al., 2008). Wie in Studien an *C. elegans* gezeigt werden konnte, sind acht Gene für die Bildung eines funktionsfähigen Levamisol sensitiven Acetylcholin-Rezeptors nötig, fünf Rezeptoruntereinheiten *lev-1*, *lev-8*, *unc-29*, *unc-63* und *unc-38*, sowie drei Hilfsproteine RIC-3, UNC-50 und UNC-74 (Boulin et al., 2008). Ein *C. elegans* Stamm mit einer Mutation in einer der fünf Untereinheiten reagiert nicht mehr sensitiv auf Levamisol (Boulin et al., 2008). Eine Acetylcholin-Rezeptoruntereinheit, besteht aus einem extrazellulären NH₂-Terminus mit Cysteine Bindungsstelle, vier Transmembranregionen TM1-TM4 und einem zytoplasmatischen Loop zwischen TM3 und TM4 (Martin et al., 2005). Der

Acetylcholin-Rezeptor besteht aus fünf dieser Untereinheiten, welche kreisförmig um eine zentrale Pore herum angeordnet sind, wodurch sie den transmembranen Ionenkanal formen. Die Kanalpore wird aus den Transmembranregionen TM2 aller Untereinheiten gebildet (Martin et al., 2005).

2.4.3 SLO-1

Beim Vergleich des Genomes von mutagenisierten, Emodepsid-unempfindlichen *C. elegans* und Wildtyp-Organismen wurde festgestellt, dass den Mutanten ein Gen fehlt, welches für den Kalzium-aktivierten Kaliumkanal SLO-1 codiert. Slo-1 "knock out" *C. elegans* werden durch Emodepsid nicht in ihrer Bewegungsfähigkeit beeinträchtigt (Guest et al., 2007). Der SLO-1 Kaliumkanal befindet sich in den Muskeln und Neuronen der Nematoden (Carre-Pierrat et al., 2006). Die Wirkung von Emodepsid auf die Körpermuskulatur wird vor allem über muskuläre SLO-1 vermittelt, während bei der Hemmung der Pharynxmuskulatur wahrscheinlich neuronale SLO-1 Kanäle in Zusammenarbeit mit dem *Lathrophilin 1* für die Wirkung von Emodepsid verantwortlich sind (Guest et al., 2007).

Abbildung 2.10 zeigt schematisch den Aufbau von SLO-1. Der Kalzium-aktivierte Kaliumkanal besteht aus einer α -Untereinheit mit 7 Transmembrandomänen (S0-S6) und einer porenformenden Domäne (P), welche den P-Loop, den Transmembrankanal bildet. Daran schließen sich die regulatorischen Domänen (RCK1 und RCK2) und die Kalzium-bindende Region ("calcium bowl") an. Sowohl RCK1 als auch die Kalzium-bindende Region enthalten Kalzium-Bindungsstellen (Holden-Dye et al., 2007).

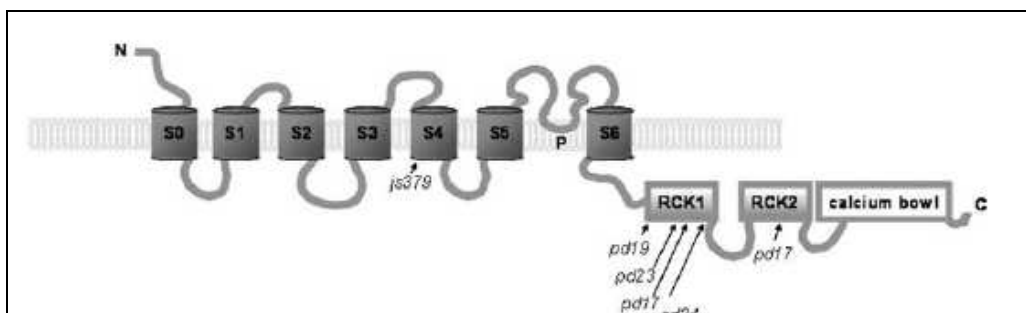


Abb. 2.10: Schema der strukturellen SLO-1 Komponenten (Holden-Dye et al., 2007).

Der NH₂-Terminus der SLO-1 α -Untereinheit liegt extrazellulär. Der lange COOH-Terminus liegt intrazellulär und enthält die Kalzium-Bindungsstellen (Meera et al., 1997). Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle sind sehr variabel, was beispielsweise ihre Kalzium-Sensitivität betrifft. Diese kann je nach Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Da Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle in vielen verschiedenen Zelltypen, wie etwa Muskelzellen, sekretorischen Zellen des endokrinen Systems, sensorischen Zellen und in Zellen des zentralen Nervensystems auftreten, ist diese Variabilität wichtig (Salkoff et al., 2006). Prä- und posttranslationale Mechanismen regulieren die Diversität der Ionenkanäle (Salkoff et al., 2006), wie etwa die Ausbildung einer großen Anzahl an alternativen "Splicing"-Varianten die bei SLO-1 identifiziert wurden und welche zur Ausbildung von SLO-1 Ionenkanälen mit voneinander abweichenden Eigenschaften führen (Salkoff et al., 2006). Außerdem können die sogenannten β -Untereinheiten, kleine ca. 200 Aminosäuren lange Proteine, mit der Transmembranregion S0 der SLO-1 α -Untereinheit interagieren. Dies kann sowohl Auswirkungen auf die Kalzium-Sensitivität des Ionenkanals, als auch auf die Porenbildung haben (Salkoff et al., 2006). Die β -Untereinheiten besitzen meist 2 Transmembranregionen und sind an einem extrazellulären Loop glycosyliert (Weiger et al., 2002). Sie sind bei Säugetieren wesentlich besser erforscht als bei Nematoden (Salkoff et al., 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Puffer und Lösungen

0,8 %, 1 %, 1,5 %, 2 % Agarose-Gele	0,8 %, 1 %, 1,5 %, 2 % Agarose in 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle aufkochen, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat. Danach werden die Flaschen dauerhaft bei 56 °C gehalten, um ein Gelieren der Agarose zu verhindern. Vor der Überführung in eine Gelkammer wird 1 µl Gel Star/ GRGreen pro 10 ml Agarose dazu gegeben
DEPC-Wasser	Bidest. H ₂ O mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat versetzen und 12 h rühren, danach autoklavieren
Guanidinthiocyanat-Puffer (GIT-Puffer)	4 M Guanidin, 0,1 M Tris (pH 7,5) und 1 % β-Mercapto-Ethanol in autoklaviertem bidest. H ₂ O
Ladungspuffer für Agarosegele (6 × Loading Dye)	0,25 % Bromphenolblau und 40 % Succrose in bidest. H ₂ O
TAE-Puffer 50 ×	2 M Tris, 5,71 % Eisessig, 1 mM EDTA (pH 8,0) in bidest. H ₂ O
1 M Kalium Citrat	20 g Zitronensäuremonohydrat, 904 mM Tri-Kalium Zitronensäuremonohydrat auf pH 6,0 einstellen mit bidest. H ₂ O auf 1 Liter auffüllen
"Trace metal solution"	5 mM Dinatrium EDTA, 2,5 mM FeSO ₄ × 7 H ₂ O, 1 mM MnCl ₂ × 4 H ₂ O, 1 mM ZnSO ₄ × 7 H ₂ O, 1 mM CuSO ₄ × 5 H ₂ O, in bidest. H ₂ O
M9-Puffer	22 mM KH ₂ PO ₄ , 42 mM Na ₂ HPO ₄ , 8,3 mM MgSO ₄ , 85 mM NaCl in bidest. H ₂ O autoklavieren

3.1.2 Anthelminthika-Stammlösungen

Anthelminthikum	Stammlösungen
Piperazin Lösung 1	1 M Piperazin in bidest H ₂ O

Piperazin Lösung 2	100 mM Piperazin in bidest H ₂ O
Piperazin Lösung 3	10 mM Piperazin in bidest H ₂ O
Piperazin Lösung 4	1 mM Piperazin in bidest H ₂ O
Muscimol Lösung 1	1 M Muscimol in bidest H ₂ O
Muscimol Lösung 2	100 Muscimol in bidest H ₂ O
Muscimol Lösung 3	10 mM Muscimol in bidest H ₂ O
Muscimol Lösung 4	1 mM Muscimol in bidest H ₂ O
HLR-9291 Lösung 1	100 mM HLR-9291 in Ethanol
HLR-9291 Lösung 2	10 mM HLR-9291 in Ethanol
HLR-9291 Lösung 3	1 mM HLR-9291 in Ethanol
HLR-9291 Lösung 4	100 µM HLR-9291 in Ethanol
Tribendimidin Lösung 1	100 mM Tribendimidin in Ethanol
Tribendimidin Lösung 2	50 mM Tribendimidin in Ethanol
Tribendimidin Lösung 3	10 mM Tribendimidin in Ethanol
Tribendimidin Lösung 4	1 mM Tribendimidin in Ethanol
Tribendimidin Lösung 5	100 µM Tribendimidin in Ethanol
Emodepsid Lösung 1	5 mM Emodepsid in Ethanol
Emodepsid Lösung 2	1 mM Emodepsid in Ethanol
Emodepsid Lösung 3	100 µM Emodepsid in Ethanol
Emodepsid Lösung 4	50 µM Emodepsid in Ethanol
Emodepsid Lösung 5	10 µM Emodepsid in Ethanol
Emodepsid Lösung 6	1 µM Emodepsid in Ethanol

3.1.3 Medien und Mikroorganismen

<i>Escherichia coli</i> One Shot™ Top 10 (INVITROGEN) chemisch kompetente Zellen	<i>F</i> ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacx</i> ZΔM15 Δ <i>lacx74 rec A1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>gal/K rps</i> (Str ^R) <i>end A1 nupG</i>

XL10-Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies)	Tet ^r Δ(<i>mcrA</i>)183Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte (F' proAB lac1^{*q}ZΔM15Tn10(Tet^r)Amy Cam^{*r})</i>
Luria Bertani (LB-Medium) (ROTH)	25 g/l (entspricht 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; (pH 7,0), autoklavieren und vor Gebrauch mit Antibiotika (Kanamycin oder Carbenicillin, Konzentration: 50 µl/ml) versetzen
Luria Bertani (LB)-Agar (Roth)	15 g Agar pro Liter LB-Medium autoklavieren und vor Gebrauch mit Antibiotika (Kanamycin oder Carbenicillin, Konzentration: 50 µl/ml) versetzen
Nematode Growth Medium (NGM-Agar)	51 mM NaCl, 2,5 g Peptone, 20 g Agar in 1 Liter bidest H ₂ O autoklavieren, dann hinzufügen: 1 mM CaCl ₂ , 1 mM MgSO ₄ , 40 mM KH ₂ PO ₄ (pH 6), 1 ml Cholesterol (5 mg/ml in EtOH)
S-Basal	100 mM NaCl, 5,7 mM K ₂ HPO ₄ , 44 mM KH ₂ PO ₄ , 1 ml Cholesterol (5 mg/ ml in Ethanol) mit bidest. H ₂ O auf 1 Liter auffüllen
S-Medium	1 Liter S-Basal, 10 mM Kaliumcitratlösung pH 6, 10 ml Trace metal Solution, 3 mM CaCl ₂ , 3 mM MgSO ₄ , pH 6
sS-Medium	1 Liter S-Basal, 10 ml 1 M Kaliumcitratlösung pH 6, 10 ml Trace metal Solution, 3 ml 1 M MgSO ₄ , einstellen auf pH 7,3 mit 2 M Natriumhydroxydlösung

3.1.4 *Caenorhabditis elegans* Stämme

Alle Stämme wurden aus dem "*Caenorhabditis elegans* Genetics Center" (CGC) bezogen. Die Informationen über die Stämme stammen ebenfalls von der CGC oder der Nematodendatenbank Wormbase.org (Harris et al., 2010)

Stamm	Genotyp	Beschreibung
Bristol N2	Wildtyp	<i>C. elegans</i> Wildtyp, Bewegung: sinusoidale Schlängelbewegung, (ca. 25-30 "body bends"/min), normale Rückwärtsbewegung (ca. 2/min)
CB382	<i>unc-49(e382)III</i>	"Missense" Punktmutation in einem Exon des <i>unc-49</i> Gens, welche alle drei "splicing" Varianten des GABA _A - Rezeptors außer Funktion setzt, Phänotyp: unkoordinierter „shrinker“ (kontrahiert dorsale und ventrale Muskeln gleichzeitig), Muscimol- resistent, Bewegung: langsam (ca. 20 "body bends"/min), unkoordiniert
CB407	<i>unc-49(e407)III</i>	"Nonsense" Punktmutation setzt die <i>unc-49B</i> -Untereinheit des GABA _A - Rezeptors außer Funktion, Phänotyp: unkoordinierter „shrinker“ (kontrahiert dorsale und ventrale Muskeln gleichzeitig), Muscimol-resistent, Bewegung: langsam (ca. 20 "body bends"/min), unkoordiniert
NM1968	<i>slo-1(js379)V</i>	Mutation setzt den Kalzium-aktivierten Kaliumkanal <i>slo-1</i> außer Funktion, Phänotyp: resistent gegen Emodepsid und flüchtige Anästhetika wie Ethanol, Bewegung: schnell (ca. 30 "body bends"/min), ruckartig, vermehrte

		Rückwärtsbewegung (ca. 5/min)
CB904	<i>unc-38(e264)I</i>	Mutation setzt die <i>unc-38</i> α -Untereinheit nicotinerger Acetylcholin-Rezeptoren außer Funktion, Phänotyp: Levamisol- und Tribendimidin-resistent, akkumuliert Eier, Bewegung: unkoordiniert
CB293	<i>unc-29(e293)I</i>	Mutation setzt die <i>unc-29</i> -Untereinheit nicotinerger Acetylcholin-Rezeptoren außer Funktion, Phänotyp: Levamisol-resistent, Bewegung: unkoordiniert
ZZ13	<i>unc-63(x13)I</i>	Mutation setzt die <i>unc-63</i> α -Untereinheit nicotinerger Acetylcholin-Rezeptoren außer Funktion, Phänotyp: Levamisol- und Tribendimidin-resistent, akkumuliert Eier, Bewegung: leicht unkoordiniert
CB211	<i>lev-1(e211)IV</i>	Mutation setzt die <i>lev-1</i> -Untereinheit nicotinerger Acetylcholin-Rezeptoren außer Funktion, Phänotyp: Levamisol- und Tribendimidin-resistent, Bewegung: normal
ZZ15	<i>lev-8 (x15)x</i>	Mutation setzt die <i>lev-8</i> -Untereinheit nicotinerger Acetylcholin-Rezeptoren außer Funktion, Phänotyp: Levamisol- und Tribendimidin-resistent, Bewegung: normal

3.1.5 Reagenzien

BACHEM, Weil am Rhein, Deutschland

Muscimol

BAYER Health Care, Animal Health, Monheim, Deutschland

Tribendimidin (Reinsubstanz), HLR-9291 (Reinsubstanz), Emodepsid (Reinsubstanz)

CAMBREX, East Rutherford, USA

GelStar® Nucleid Acid Gel stain

FERMENTAS, St. Leon-Rot, Deutschland

Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder, Gene Ruler 100 bp Ladder, Glycogen RNA Grade

FLUKA (SIGMA-ALDRICH) Steinheim, Deutschland

Piperazin anhydrous (Diethylenediamine)

INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland

250 bp DNA Ladder, Trizol Reagent®, Agarose Elektrophoresis Grade, Sytox® Green nucleic acid stain

LABGENE SCIENTIFIC SA, Chatel-St-Denis, Schweiz

GRGreen (GRSafe) Nucleic Acid Gel Stain

PEQLAB, Erlangen

peqGOLD TriFast™

ROCHE, Grenzach, Deutschland

Cell Proliferation Reagent WST-1

ROTH, Karlsruhe, Deutschland

Agarose NEEO Ultra Quality Roti®garose, Carbenicillin Dinatriumsalz >90 % für die Biochemie, Kanamycinsulfat, LB Medium (Luria/Miller), Ethanol 99,8 % DAB reinst, Cholesterin >95 %, Trypton/Pepton aus Casein, EDTA Dinatriumsalz

Dihydrat, Glycerin, Guanidinisothiocyanat, Magnesiumsulfat, Kalziumchlorid, Natriumhydroxid Plätzchen, di-Kaliumhydrogenphosphat, Tris HCl, Natriumhypochloridlösung 12 %

TH GEYER, Renningen, Deutschland
Bakto Agar

SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland
Phenol-Chloroform, Ammonium Acetat, β -Mercaptoethanol, Thiazolyl Blue
Tetrazolium Bromide (MTT) 97,5 %

3.1.6 Enzyme

CLONTECH, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
BD Advantage® 2 Polymerase Mix

FERMENTAS, St. Leon-Rot, Deutschland
EcoRI, *PstI*, *NheI*, *SdaI* (*SbfI*), Fast AP Alkalische Phosphatase

INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland
Accu Prime Taq DNA Polymerase System, Accu Prime Taq DNA Polymerase
System High Fidelity, SuperSkript™ III Reverse Transcriptase

3.1.7 Reaktionskits

ANALYTIK JENA, Jena, Deutschland
Lysis tubes für die Speed Mill P12 Typ E

CLONTECH, Heidelberg, Deutschland
BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit

FERMENTAS, St. Leon-Rot, Deutschland
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit

INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland

TOPO TA Cloning Kit for Sequencing PCR ® 4TOPO ® Vektor, PCR ® 2.1.
TOPO® Vektor

MACHEREY&NAGEL, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid QuickPure, Nucleo Spin® RNA XS Kit

PEQLAB, Erlangen, Deutschland
peqGold TriFast™

PROMEGA, Madison, USA
Pure YieIt™ Plasmid Midiprep System

ROCHE, Grenzach, Deutschland
5'/3' RACE Kit, 2nd Generation

3.1.8 Geräte

AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg, Deutschland
Spektralphotometer Ultraspec 2000

ANALYTIK JENA, Jena, Deutschland
Speed Mill P12 Homogenisator

BECKMAN COULTER®, Krefeld, Deutschland
Avanti® J-301 Hochgeschwindigkeitszentrifuge

BIOMETRA, Göttingen, Deutschland
Standard Power Pack P25, Power Pack P25 T

BIORAD, München, Deutschland
Mini-Sub® Cell GT, Wide Mini-Sub® Cell GT, Gießstände, C1000™ Thermal
Cycler, S1000™ Thermal Cycler

BIOTEK, Bad Friedrichshall, Deutschland
Synergy 4, Epoch

COLORA, Berlin, Deutschland

Magnetomix (Magnetrührer)

DPU, Berlin, Deutschland

414 Thermal Printer

EPPENDORF, Hamburg, Deutschland

Centrifuge 5415 R, Centrifuge 5430 R Pipetten: 1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l, 500-5000 μ l, InjektMan NI2, FemtoJet

GFL, Burgwedel, Deutschland

Inkubator Schüttelschrank 3033, Wasserbad 1086

HANNA INSTRUMENTS, Kehl am Rein, Deutschland

pH-Meter HI991000

HERAEUS SEPATECH, Osterode, Deutschland

Biofuge pico, Multifuge 3 S-R, Inkubator Wärmeschrank BT 5042 E

HOEFER, San Francisco, USA

He33 mini horizontal submarine unit (Gelelektrophoresekammer)

IKA LABORTECHNIK, Staufen, Deutschland

Vortex Genius 3, MS1 Minishaker, VF2 Vortexer, Combimag RCT Heizrührer, RET Heizrührer

INTEGRA BIOSCIENCE, Fernwald, Deutschland

Pipetboy accu (Pipetierhilfe)

INTAS, Göttingen, Deutschland

UV-Illuminator TF-M 20x40cm, Photodrucker Science Imaging Instruments

JOUAN, Unterhachingen, Deutschland

Zentrifuge BR4i

KNICK, Berlin, Deutschland

pH-Meter 761 Calimatic

LEICA, Wetzlar, Deutschland

Leica CTR 4000 Lichtquelle, Leica MZ16F Binocular, Leica DMI 4000 B

Mikroskop, Leica DFC 360 Fx Kamera

MEMMERT, Schwabach, Deutschland

Wasserbäder

METTLER-TOLEDO, Giessen, Deutschland

Waage PN 1210

MJ RESEARCH INCORPORATION, Watertown, USA

PTC-200 Peltier Thermal Cyclers

NEOLAB, Heidelberg, Deutschland

Tischzentrifuge

OHAUS CORPORATIONS, Nänikon, Schweiz

Feinwaage Discovery DV215CDM

PANASONIC, Wiesbaden, Deutschland

Genius Mikrowelle

PERKIN ELMER, Wellesley, USA

Gene Amp® PCR System 9700

PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH, Erlangen, Deutschland

Spektralphotometer NanoDrop ND-1000, Agarose-Gelkammer

ROTH, Karlsruhe, Deutschland

Tischzentrifuge AL 22VAC und SD 220 VAC

SARTORIUS LABORATORY, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage LC220 S, Waage Acculab ALC-1100.2

SHARP, Hamburg, Deutschland
Großraummikrowelle

SHP STERILTECHNIK AG, Magdeburg, Deutschland
Laboklav

SONY, Berlin, Deutschland
Digital Graphic Printer UP-D897

SYNGENE, Cambridge, Großbritannien
Geldokumentation G:Box

THERMO SCIENTIFIC, Bonn, Deutschland
Wärmeschüttelschrank MAX Q 6000, Wärmeschüttelschrank MAX Q 4000

TKA WASSERAUFBEREITUNGSSYSTEME, Niederelbert, Deutschland
TKA Gene Pure

VWR, Darmstadt, Deutschland
Tischzentrifuge Galaxy mini, Vortexer lab dancer S40

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

BIOZYM, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
10 µl Pipettenspitzen mit Filter, 100 µl Pipettenspitzen mit Filter, 1000 µl
Pipettenspitzen mit Filter, 0,2 ml PCR-Gefäße, 1,5 ml Reaktionsgefäße, 2 ml
Reaktionsgefäße

EPPENDORF, Hamburg, Deutschland

0,5 ml Sicherheitsverschluss Reaktionsgefäße, Sterile Femtotips[®]I, Sterile Femtotips[®]II, Microloader

GREINER BIO-ONE, Solingen, Deutschland

Petrischalen 94 mm und 60 mm Durchmesser, 48 "well cell culture plate"

ROTH, Karlsruhe, Deutschland

Skalpellklingen, Tissue Boxen, Handschuhe Rotiprotect-Latex, Autoklavierband, Bacillol Tissues, Parafilm

SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland

10 µl Pipettenspitzen, 100 µl Pipettenspitzen, 1000 µl Pipettenspitzen, 10 ml Pipettenspitzen, Petrischalen 94 mm, 15 ml Röhrchen, 50 ml Röhrchen, 0,5 ml Reaktionsgefäße, 1,5 ml Reaktionsgefäße, 2 ml Reaktionsgefäße, Transferpipetten 3,5 ml, Serologische Pipetten 25 ml und 10 ml

ZELTMANN IMPORT-EXPORT GMBH, Loffenau, Deutschland

Insektenpräpariernadeln

3.1.10 Software

BioEdit	(Hall, 1999)
ClustalW2	(Larkin et al., 2007)
Clonemanager professional 9	Scientific & Educational Software, Cary, USA
Corel DRAW Graphic Suites X5	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Mega 4	(Tamura et al., 2007)
NCBI conserved domains	(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blst.cgi)
End Note X4	Thomson Reuters, San Francisco, USA
Search Pfam	(http://pfam.sanger.ac.uk/search?tab=searchSequenzeBlock)

GraphPad Prism 5.03	GraphPat Prism, La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
Sigma Plot	Systat Software, Chicago, USA
Gene Snap 7.09.06	Syngene, Cambridge, UK
TMMOD	(Kahsay et al., 2005)
TopPred 0.01	(von Heijne, 1992; Claros und von Heijne, 1994)
MINNOU	(Cao et al., 2006)
HMMTOP	(Tusnàdy und Simon, 1998; Tusnàdy und Simon, 2001)
TMHMM	(Sonnhammer et al., 1998; Moller et al., 2001; Krogh et al., 2001)
Java Stat Binominal Confidence Intervals	(Clopper und Pearson, 1934; Garwood, 1936)
SignalP 3.0	(Bendtsen et al., 2004)
PhyML 3.0	(Guindon et al., 2010)

3.2 Methoden

3.2.1 *Caenorhabditis elegans* Haltung

Bei *C. elegans* handelt es sich um einen freilebenden Nematoden, der in der Natur in Erde, Kompost oder anderem organischem Material vorkommt. Er ist im Vergleich zu parasitischen Nematoden leicht im Labor zu halten, da seine natürlichen Lebensumstände unkompliziert nachzuahmen sind. Die Haltung von *C. elegans* kann auf zwei Methoden erfolgen und zwar entweder auf NGM-Agarplatten oder in Flüssigkultur.

3.2.1.1 *Caenorhabditis elegans* Haltung auf NGM-Agarplatten

Die Haltung der Nematoden wurde auf NGM-Agarplatten mit 60 mm Durchmesser durchgeführt. Die Nematoden wurden mit Bakterien gefüttert, die in der Mitte der NGM-Agarplatte vorlagen. Dazu wurde ein spezieller Agar, genannt "Nematode Growth Medium" (NGM-Agar), verwendet (Stiernagle, 2006). Die NGM-Agarplatten wurden gegossen und mussten über Nacht bei Raumtemperatur trocknen. Im Anschluß wurden sie mit den Bakterien beimpft und erneut über Nacht bei Raumtemperatur gelagert, damit die Bakterien wachsen konnten. Bei den Bakterien, die als *C. elegans* Nahrung verwendet wurden, handelte es sich um *E. coli* OP50, ein besonders langsam wachsender *E. coli* Stamm der Urazil auxotroph ist und nicht die ganze Agarplatte überwuchert, sondern als große Kolonie in der Mitte des Agars verbleibt. Die Nematoden konnten sich auf dem Agar zur Futterquelle hin bewegen. Wenn die Bakterien auf der NGM-Agarplatte verbraucht waren, wurden die *C. elegans* auf eine weitere NGM-Agarplatte mit neuer Nahrung umgesiedelt. Dazu wurde mit einer Rasierklinge ein Stück aus dem besiedelten Agar der alten NGM-Agarplatte herausgeschnitten und mit der Oberseite nach unten auf eine neue NGM-Agarplatte gelegt. Die Würmer wanderten dann von dem alten Stück auf die neue NGM-Agarplatte und gründeten dort eine neue Population.

Bei dieser Art der Haltung ist es wichtig, dass die NGM-Agarplatten stets mit Parafilm umwickelt werden, da die Würmer andernfalls die Agarplatten verlassen und auf andere Agarplatten hinüberkriechen können. Das ist besonders dann problematisch, wenn mehrere verschiedene Stämme gleichzeitig gehalten werden, da es dann zu unerwünschten Kontaminationen kommen kann. Außerdem ist die

Temperatur von besonderer Relevanz. Es ist eine Temperatur von konstant 20 °C zu bevorzugen, bei niedrigeren Temperaturen verlangsamt sich die Vermehrung der Nematoden, bei Temperaturen über 25 °C sterben sie sehr schnell ab.

Wenn die Nematoden nicht für Experimente in großer Zahl gebraucht werden, sondern nur erhalten werden sollen, reicht es aus, einen Stamm einmal monatlich zu passagieren und er wächst auf der neuen NGM-Agarplatte noch sicher wieder an.

Die NGM-Agarplatten wurden auf Vorrat gegossen, mit *E. coli* OP50 beimpft und konnten dann mit dem Deckel nach unten bei 4 °C für mehrere Wochen gelagert werden. Vor dem Beimpfen mit *C. elegans* war es wichtig, dass die NGM-Agarplatten wieder Raumtemperatur angenommen hatten, dazu wurden sie einige Stunden vor dem Beimpfen mit *C. elegans* aus dem Kühlschrank genommen.

Wurden die Nematoden für Versuche benötigt, konnten entweder einzelne Individuen mit einer Insektenpräpariernadel von den Agarplatten gepickt werden, oder die ganze Population wurde mit Hilfe von 1 ml M9-Puffer pro Agarplatte von den Platten in ein Falcon Röhrchen gespült.

3.2.1.2 *Caenorhabditis elegans* Haltung in Flüssigkultur

Eine weitere Möglichkeit zur Haltung von *C. elegans* ist die Flüssigkultur. Dabei wurden die Nematoden in 500 ml Erlenmeyerkolben gehalten, die 250 ml des in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen S-Mediums als Wachstumsmedium enthielten und *E. coli* OP50 aus einer 100 mL Übernachtskultur als Nahrung. Die Flüssigkultur wurde mit *C. elegans* beimpft, die von 4 großen NGM-Agarplatten (94 mm Durchmesser) in das Medium gespült wurden. In den Kolben wurden die Würmer konstant bei 150 rpm und 20 °C im Schüttelschrank geschwenkt. Pilzbewuchs konnte durch Zugabe von Nystatin verhindert werden (2,5 ml Nystatinlösung 10000 U/ml in 250 ml Medium). Gefüttert wurden die Nematoden durch tägliche Zugabe von *E. coli* OP50 Bakterien. Die Kultur wurde durch abgestorbene Nematoden und Bakterien mit der Zeit immer mehr verunreinigt. Zudem bildeten sich durch den Dichtestress von zu vielen Nematoden auf engem Raum *C. elegans* Dauerlarven aus und es entwickelten sich kaum Adulte. Deshalb wurde für Versuchszwecke immer nur eine Generation in Flüssigmedium angezüchtet und dann für den Versuch verwendet. Es dauerte etwa 4-5 Tage, bis sich die Kultur soweit entwickelt hatte, dass sie geerntet werden konnte. Dazu wurde der

Erlenmeyerkolben für 15 min auf Eis gestellt, damit die Nematoden auf Grund der Kälte starr wurden und zu Boden sanken, dann konnte der Überstand abgenommen werden. Das übrige Medium mit den Nematoden wurde in ein 50 ml Falcon überführt und 2 min bei 1400 × g zentrifugiert. Anschließend wurde erneut der Überstand bis auf einen Rest abgenommen und es blieben die *C. elegans* zurück, welche nun für Versuche verwendet werden konnten.

3.2.2 *Caenorhabditis elegans* Synchronisation

Für den Entwicklungsassay war es wichtig, eine Population von gleich alten *C. elegans* zu erzeugen, da nur erste Larven in den Assay eingesetzt wurden, um ihre Entwicklung zu verfolgen. Um diese Population aus *C. elegans* ersten Larven zu erhalten, wurde die Ausgangspopulation dem Prozess des Synchronisierens unterzogen. Dabei wurden ca. 6 NGM-Agarplatten mit *C. elegans* beimpft wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben. Diese Agarplatten verblieben als Vorkultur für 3 Tage bei 20 °C. Im Anschluß wurden ca. 30-40 NGM-Agarplatten aus diesen 6 Vorkulturplatten beimpft und für 3 weitere Tage bei 20 °C inkubiert. Danach wurden die *C. elegans* von diesen Agarplatten mit je 1 ml M9-Puffer heruntergespült. Der Puffer wurde mit einer 1000 µl Pipette mehrmals über die Agarplatte gespült, und dann in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend wurde die gesammelte Wurmssuspension von allen Agarplatten in dem Falcon für 20 min bei 1400 × g zentrifugiert. Der Puffer wurde abgenommen, die Nematoden verblieben im Falcon. Es ist ebenfalls möglich, die Nematoden wie in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben aus einer Flüssigkultur zu gewinnen.

Bei der Synchronisation der Population wurden nun alle Würmer durch so genanntes Bleichen aufgelöst und nur die widerstandsfähigen Nematodeneier blieben übrig. Dazu wurden die Nematoden mit einer Mischung aus 3 ml 2 M NaOH und 5 ml Natriumhypochlorit (12 % in H₂O) versetzt und für 90 s stark geschüttelt. Diese Phase ist sehr kritisch, da bei nur geringfügig längerer Inkubationszeit mit der Natriumhypochlorit/NaOH Mischung auch die *C. elegans* Eier Schaden nehmen und sich daraus später keine oder nur beschränkt lebensfähige Larven entwickeln. Aus diesem Grund musste sofort nach den 90 s Inkubationszeit das 50 ml Falcon komplett mit M9-Puffer aufgefüllt werden, um die Lösung zu verdünnen. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 1400 × g zentrifugiert. Die Gesamtinkubationszeit mit der Natriumhypochlorit/NaOH

Mischung durfte 10 min nicht überschreiten. Nach der Zentrifugation wurde sofort der Überstand abgenommen und die am Grunde des Gefäßes abgesetzten Eier der Nematoden mit 50 ml M9-Puffer gewaschen. Danach wurde die Suspension erneut 5 min bei 1400 × g zentrifugiert. Insgesamt sollten die Eier der Nematoden mindestens viermal auf diese Weise mit M9-Puffer gewaschen werden, bei besonders sensiblen Stämmen häufiger. Es sollte kein Chlorgeruch mehr von dem Falcon ausgehen. Nach dem letzten Waschvorgang konnten die Eier in 500 µl M9-Puffer resuspendiert und das Ergebnis der Synchronisation unter dem Mikroskop überprüft werden. Es sollten sich bei ideal verlaufener Synchronisation in 1 µl Suspension mindestens 5-10 Eier befinden. Lebende Würmer sollten nicht mehr zu erkennen sein und auch sonst keine Überreste von Bakterien oder Pilzen. Hin und wieder sind noch aufgeplatzte Cuticulae adulter *C. elegans* sichtbar, die jedoch für den weiteren Verlauf nicht störend sind.

Die Eisuspension wurde anschließend in 50 ml M9-Puffer in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und über Nacht bei 20 °C und 150 rpm geschwenkt. Am nächsten Morgen sollten sich aus den Eiern gesunde, gut bewegungsfähige *C. elegans* erste Larven entwickelt haben, was unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Dazu wurde der M9-Puffer mit den Larven aus dem Erlenmeyerkolben in ein 50 mL Falcon überführt und 20 min bei 1400 × g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen bis auf ca. 2 ml, die im Falcon verblieben und in denen die Larven durch sanftes Schwenken resuspendiert wurde. Dann wurde fünfmal 1 µl der Suspension unter dem Mikroskop ausgezählt. Für einen erfolgreichen Einsatz im Entwicklungsassay sollten mindesten 5 Larven pro 1 µl vorhanden sein.

3.2.3 *Caenorhabditis elegans* Entwicklungsassay

Der *C. elegans* Entwicklungsassay dient dazu, die Entwicklungsfähigkeit von ersten Larvenstadien zu Adulten unter Einfluß verschiedener Anthelminthika konzentrationsabhängig zu untersuchen. Außerdem kann dadurch die unterschiedliche Wirkung einzelner anthelminthischer Wirkstoffe auf *C. elegans* Wildtyp und Mutantenstämme verglichen werden.

Für den *C. elegans* Entwicklungsassay wurden erste Larven eingesetzt, die zuvor durch Synchronisation, wie in 3.2.2 beschrieben, gewonnen wurden. Der Entwicklungsassay fand in einer 48-"well"-Zellkulturplatte statt. Pro Ansatz wurden

insgesamt 200 µl Volumen eingesetzt, bestehend aus 20 µl Larvensuspension (ca. 5 Larven pro Mikroliter, also ca. 100 Larven insgesamt pro Ansatz), 20 µl *E. coli* OP50 Bakteriensuspension, 20 µl der Anthelminthikum-Verdünnungsreihe bei wasserlöslichen Wirkstoffen, 2 µl der Anthelminthikum-Verdünnungsreihe bei alkohollöslichen Wirkstoffen. Das Restvolumen wurde mit 140 bzw. 158 µl sS-Medium auf 200 µl aufgefüllt. Statt normalem S-Medium wurde hier sS-Medium verwendet, da das Kalzium und der pH-Wert von 6 im S-Medium die Wirkung von Tribendimidin inhibieren (Hu et al., 2009). Das sS-Medium enthält kein Kalziumchlorid und sein pH-Wert wird mit Hilfe von NaOH auf pH 7,3 eingestellt.

Die 48-"well"-Zellkulturplatte wurde bereits am Tag der Synchronisation der Würmer für den Versuch vorbereitet. Es wurden das sS-Medium und die verschiedenen Anthelminthika in ihren Konzentrationsreihen vorgelegt wie bereits beschrieben, sowie eine Kontrolle mit Ethanol ohne Anthelminthika. Die 48-"well"-Zellkulturplatte wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Sechs Erlenmeyerkolben mit jeweils 100 ml LB-Medium ohne Antibiotika wurden mit jeweils 100 µl *E. coli* OP50 beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde das Medium mit den *E. coli* OP50 in 50 mL Falkons überführt und 20 min bei 3000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und jeweils drei Bakterienpellets in 2 mL sS-Medium gelöst. Von dieser Bakteriensuspension wurden jeweils 20 µl pro Ansatz in die 48-"well"-Zellkulturplatte gegeben. Anschließend folgten die ersten Larven, welche, wie im Kapitel 3.2.2 beschrieben, gewonnen und unter dem Mikroskop ausgezählt wurden. Ihre Konzentration wurde auf ca. 5 Larven pro 1 µl eingestellt und davon jeweils 20 µl pro Ansatz in die 48-"well"-Zellkulturplatte überführt. Nun wurde die 48-"well"-Zellkulturplatte mit Papier umwickelt, so dass die Anthelminthika vor Licht geschützt waren, und bei 20 °C im Schüttelschrank bei 150 rpm für 54-56 h inkubiert. Diese Zeit reicht aus, damit sich in einer Kultur ohne Hemmung durch Anthelminthika die Larven zu Adulten entwickeln können. Diese sind zweifelsfrei an Eiern im Uterus zu erkennen sind. Allerdings werden in dieser Zeit keine oder erst wenige Eier von den Nematoden gelegt und es entwickelt sich noch keine neue Generation von ersten Larven, die das Ergebnis verfälschen könnten.

Nach der Inkubationszeit wurde die 48-"well"-Zellkulturplatte aus dem Schüttelschrank genommen und unter dem Mikroskop ausgezählt. Dazu wurden die Nematoden mit jeweils einem tropfen Lugolscher Lösung pro Ansatz abgetötet.

Es wurde in jedem Ansatz die Anzahl der adulten Nematoden und die Anzahl der Larven ermittelt, somit auch die Gesamtanzahl der Würmer, was später eine prozentuale Erhebung möglich machte. Auf diese Weise konnten Aussagen getroffen werden, in wie weit ein anthelminthischer Wirkstoff konzentrationsabhängig die Entwicklungsfähigkeit der Nematoden von der ersten Larvenphase zum Adulten im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirkstoff hemmte. Außerdem konnte die Wirkung der Anthelminthika auf genetisch veränderte *C. elegans*, die das Zielgen dieses Wirkstoffes nicht exprimieren, überprüft werden.

3.2.4 *Caenorhabditis elegans* Bewegungsassay

Im *C. elegans* Bewegungsassay sollte, die Bewegungsfähigkeit von Wildtyp und genetisch veränderten *C. elegans* Stämmen unter der Wirkung verschiedener Anthelminthika konzentrationsabhängig überprüft werden. Zur Messung der Bewegungsfähigkeit werden die "body bends" gezählt die jeder einzelne Nematode pro Minute durchführt. Bei den "body bends" handelt es sich um die sinusoidale Schlängelbewegung, mit der die Nematoden sich fortbewegen. Ein "body bend" ist eine Bewegung, bei der der Kopf des Wurmes unten ist, eine Welle nach oben macht und wieder unten ankommt.

Zur Durchführung des Assays wurden NGM-Agarplatten hergestellt, welche die zu untersuchenden Anthelminthika in unterschiedlichen Konzentrationen enthielten, sie sind unter Punkt 3.1.2 aufgeführt. Die Agarplatten wurden gegossen, einige Stunden zum Trocknen stehen gelassen und anschließend mit *E. coli* OP50 beimpft. Die Bakterien wuchsen über Nacht auf den Agarplatten an. Am nächsten Tag konnten sie für den Versuch verwendet werden. Zu beachten war, dass die Temperatur des Agars vor dem Gießen genau 42 °C betragen musste, besonders bei Verwendung des Anthelminthikums Emodepsid. Bei wärmeren Temperaturen nahm das Anthelminthikum Schaden, bei geringeren Temperaturen wurde der Agar schon vor dem Gießen wieder fest.

Die fertigen Agarplatten wurden dann mit *C. elegans* besetzt. Dazu wurden von Stammhaltungsplatten jeweils 20 Würmer mit einer Insektenpräpariernadel vorsichtig auf die Testplatte gesetzt. Dabei wurde stets das gleiche Stadium verwendet, da unterschiedliche Entwicklungsstadien unterschiedlich auf Anthelminthika reagieren (Bull et al., 2007). Es wurden nur vierte Larven

transferiert, die an der weißen Blase bzw. Vulvaklappe im hinteren Drittel des Nematodenkörpers zu erkennen sind. Diese vierten Larven entwickelten sich über Nacht zu Adulten, so dass beim Auszählen des Experimentes alle Würmer das adulte Stadium erreicht hatten und somit vergleichbar waren. Wenn sich auf jeder der Anthelminthikumplatten 20 vierte Larven befanden, wurden die Agarplatten mit Parafilm umwickelt und für 24 h bei 20 °C inkubiert .

Nach diesen 24 h sollte die Bewegungsfähigkeit der Nematoden überprüft werden. Dazu wurde jeder Wurm separat von der NGM-Agarplatte gepickt und dann für 1 min auf eine leere NGM-Agarplatte gesetzt, um sich die Bakterien vom Körper zu streifen. Das diente dazu, die Zählplatte frei von Bakterien zu halten, um Irritationen und ablenkende Reize auf die Nematoden zu vermeiden. Dann wurde der Wurm auf eine weitere leere NGM-Agarplatte, die Zählplatte, gesetzt, auf der er für 1 min zum Akklimatisieren belassen wurde. Anschließend wurden seine "body bends" für wiederum 1 min gezählt. Auf diese Weise ließ sich die Bewegungseinschränkung der Nematoden durch verschiedene Anthelminthikakonzentrationen vergleichen und bei Verwendung von *C. elegans* Stämmen mit spezifischen genetischen Veränderungen auch eine Aussage zur Wirkung der Anthelminthika auf diese Stämme treffen.

3.2.5 *Caenorhabditis elegans* Assays mit lebend-tot Farbstoffen

Experimente mit *C. elegans* und speziellen Farbstoffen, die durch Farbumschlag lebende und tote Zellen unterschiedlich anfärben, haben sich bereits in vergangenen Studien als sehr hilfreich erwiesen, um die Auswirkungen von Anthelminthika auf Nematoden zu überprüfen (James und Davey, 2007). Es wurden Assays mit verschiedenen Farbstoffen durchgeführt.

3.2.5.1 MTT-Assay

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) wird nur in lebenden Zellen, welche metabolische Aktivität zeigen, zu Formazan umgesetzt, was einen Farbumschlag von gelb zu braun zur Folge hat. Es ist in der Lage, die Cuticula von *C. elegans* zu durchdringen und färbt lebende Nematoden wesentlich stärker an als tote. Dies ermöglicht, den Prozentsatz noch lebendiger Nematoden nach einer Anthelminthikabehandlung anhand einer Absorptionsmessung abzuschätzen.

Dazu wurden ca. 500 adulte *C. elegans* aus einer synchronisierten Kultur in jeweils 50 µl Flüssigkeit bestehend aus dem zu untersuchenden Anthelminthikum in M9-Puffer, in eine 96-"well"-Zellkulturplatte überführt und 24 h inkubiert. Dann wurden 50 µl MTT gelöst in PBS mit einer Konzentration von 10 mg/ml hinzugegeben und 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die 96-"well"-Zellkulturplatte 10 min bei 800 × g zentrifugiert und soviel Flüssigkeit wie möglich abgenommen. Es wurden 100 µl DMSO auf die am Boden abgesetzten Nematoden gegeben, um die Formazan Produktion zu stoppen und das produzierte Formazan in Lösung zu bringen. Nach einer Stunde wurde die Absorption bei 575 nm gemessen. Der Farbumschlag wurde anhand der Absorption im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Anthelminthikum ermittelt.

3.2.5.2 WST-1 Assay

Das auf Grund einer Änderung in der Formulierung durch den Hersteller für den Versuch offenbar unbrauchbar gewordenen MTT sollte durch einen anderen Farbstoff ersetzt werden. Der MTT-Assay wurde mit dem wasserlöslichen Farbstoff WST-1 wiederholt. Dabei handelt es sich um ein schwach rötliches Tetrazoliumsalz, welches wie MTT durch lebende Zellen metabolisiert wird was zu einem Farbumschlag zu braun führt. Es wurden 10 µl WST-1 Reagenz auf 100 µl Wurmsuspension gegeben. Der Versuch erfolgte wie der bereits beschriebene MTT-Assay. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen.

3.2.5.3 Sytox[®] Green-Assay

Ein dritter Farbstoffversuch wurde mit Sytox[®] Green durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen grün fluoreszierenden Farbstoff, der nur in tote Zellen eindringt und diese anfärbt, da er intakte Zellmembranen nicht passieren kann. Durch perforierte Zellmembranen dringt er ein und bindet an die DNA. Auf diese Weise sollten nur abgestorbene Würmer grün fluoreszieren (Excitation 485 nm, Emission 535 nm). Der Versuch wurde ebenso durchgeführt wie der bereits beschriebene MTT-Assay. Das Sytox[®] Green wurde mit einer Konzentration von 1 µM eingesetzt.

3.2.6 *Caenorhabditis elegans* "rescue" Experiment

Zur Überprüfung der gewonnenen Daten aus dem Bewegungsassay und Entwicklungsassay, die eine geringere Empfindlichkeit von GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämmen gegenüber Emodepsid vermuten ließen, wurde ein "rescue" Experiment durchgeführt. Dabei wurde in *C. elegans* Stämmen denen die B-Untereinheit des Gens *unc-49* fehlte, der entsprechend bei parasitischen Nematoden für dieses Gen kodierende DNA-Abschnitt eingeschleust. Im Bewegungsassay wurde dann überprüft, ob die Empfindlichkeit des Wildtyps gegenüber Emodepsid bei den genetisch veränderten Stämmen wiederhergestellt werden konnte. Für das "rescue" Experiment wurde ein Plasmid konstruiert, welches die gewünschte Untereinheit *unc-49B* enthielt. Dieses wurde mit Hilfe von Mikroinjektion in die Gonaden der genetisch veränderten *C. elegans* eingeschleust, so dass ihre Nachkommenschaft das Gen wieder exprimieren sollte. Überprüft wurde die erfolgreiche Übertragung des Plasmids durch Koinjektion eines GFP-tragenden Plasmids, was dazu führt, dass die transformierten Würmer grün fluoreszieren. Bei dem koinjezierten Plasmid handelte es sich um pPD118.33 (L3790) von Addgene aus dem "Fire lab *C. elegans* Kit". Die Konstruktion der Plasmide und der Ablauf der Mikroinjektion sind im Folgenden ausführlich beschrieben.

3.2.6.1 Plasmidkonstruktion

Zur Konstruktion des Trägerplasmids für die B-Untereinheit des Gens *unc-49* von *T. canis*, welches in die Gonaden der *C. elegans* injiziert werden sollte, wurde das Vektorgerüst des TOPO TA Cloning® Vektors PCR 4 TOPO gewählt. Die gewünschten Produkte wurden an der „Multiple Cloning Site“ zwischen den beiden *EcoRI* Schnittstellen eingebaut.

Das Plasmid sollte die *C. elegans unc-49* Promotorsequenz, die B-Untereinheit des Gens *unc-49* von *T. canis* und die 3' UTR des Gens *unc-54* von *C. elegans* enthalten. Zur Kontrolle wurde auch ein Plasmid ohne die *T. canis unc-49B* cDNA hergestellt. Eine schematische Darstellung des Aufbaus der Plasmidkonstrukte zeigen die Abbildungen 3.1, 3.2, 3.4 und 3.5. Die verwendeten Primer und PCR-Bedingungen zur Identifikation der Einzelkomponenten des Plasmides finden sich im Anhang unter Punkt 10.1.

Für beide Konstrukte wurde zunächst der *C. elegans unc-49* Promotor in den PCR-4 TOPO Vektor eingebracht. Dies ist schematisch in Abbildung 3.1 gezeigt. Es wurden 3000 Basenpaare vor dem *C. elegans unc-49* Startcodon als Promotorsequenz verwendet.

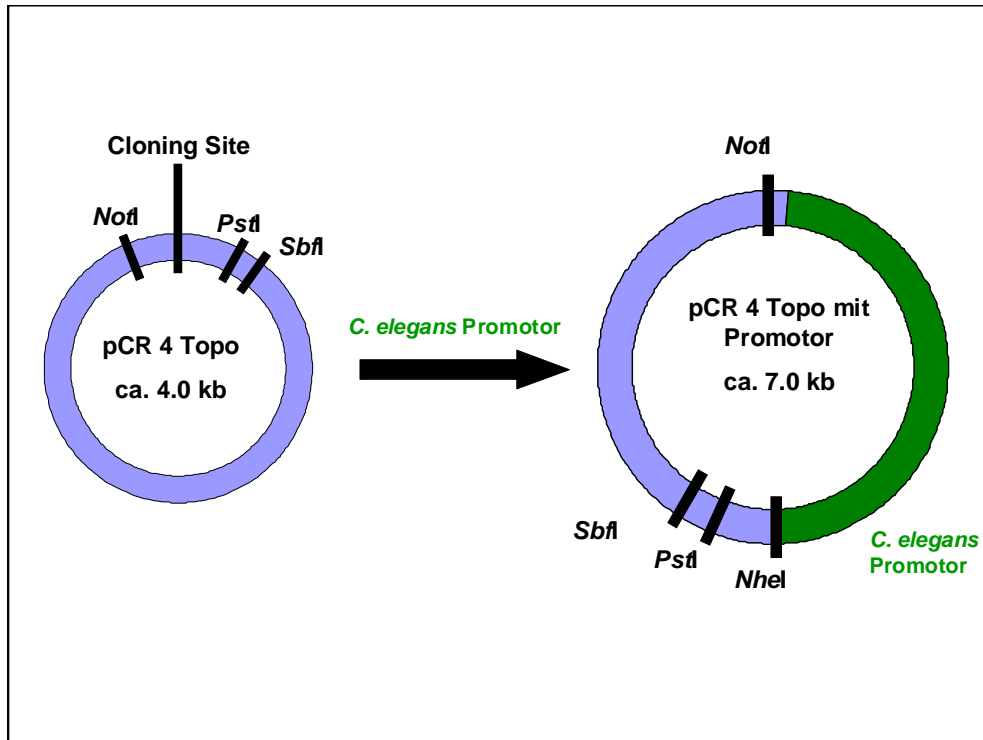


Abb. 3.1: Einfügen des *C. elegans unc-49* Promotors in den PCR 4 Topo Plasmidvektor.

Im Anschluss wurde der Vektor wieder mit den Enzymen *NheI* und *PstI* aufgeschnitten, um eine passende Lücke für die *T. canis unc-49B* cDNA zu schaffen. Der cDNA Sequenz wurde zuvor mit Hilfe von entsprechenden Primern passende Schnittstellen angehängt, so dass sie sich durch Ligation in der richtigen Orientierung hinter dem Promotor anfügen ließ. Den Einbau der *unc-49* cDNA Sequenz in das Plasmid zeigt Abbildung 3.2.

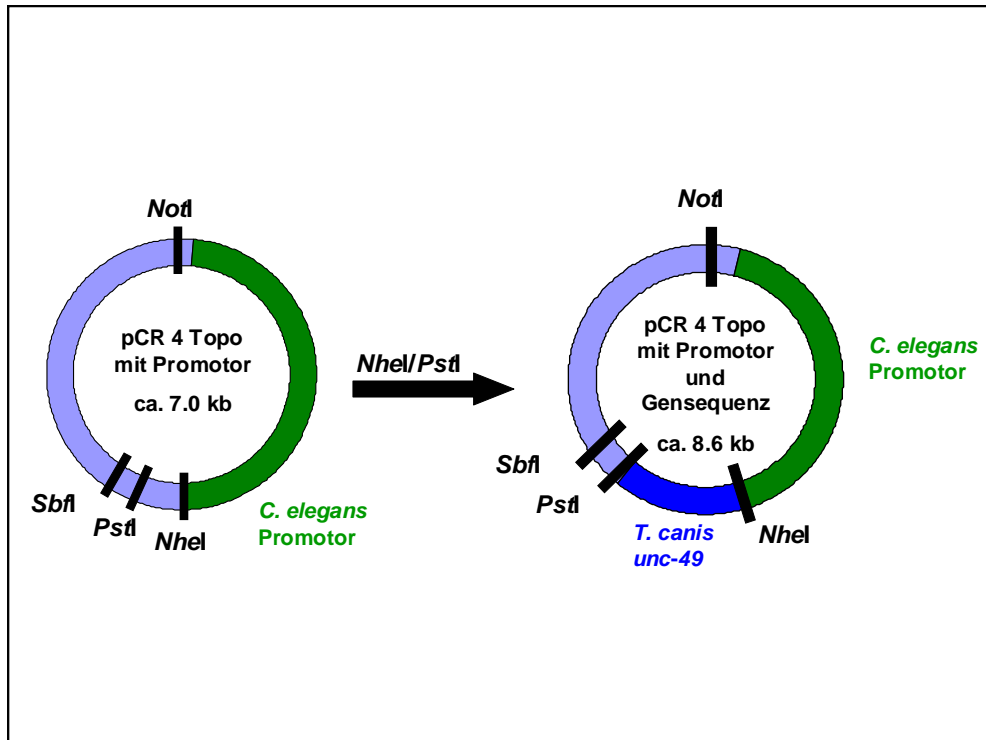


Abb. 3.2: Einfügen der unc-49B cDNA von *T. canis* in den Plasmidvektor.

Der Plasmidvektor wurde zunächst mit dem Enzym *PstI* in Puffer B nach folgendem Schema geschnitten:

80 μ l H₂O

10 μ l 10 x Puffer B (Fermentas)

15 μ g Plasmid-DNA

5 μ l *PstI* (10 U/ μ l) (Fermentas)

Inkubieren bei 37 °C für 2 h.

Im nächsten Schritt konnte der Erfolg des Schneidens durch Gelelektrophorese überprüft werden. Das einmal geschnittene, linearisierte Plasmid zeigt abweichende Laufeigenschaften im Gegensatz zum ungeschnittenen zirkulären Plasmid. Oftmals befinden sich oberhalb des zirkulären Plasmids noch verschmierte Banden, die von "supercoiled" Plasmid-Konkatemeren verursacht werden könnten. Ferner unterscheiden sich die beiden Banden leicht in der Höhe, da die linearisierte DNA langsamer durch die Poren des Gels läuft als die zirkuläre DNA. Der Unterschied ist zu sehen in Abbildung 3.3.

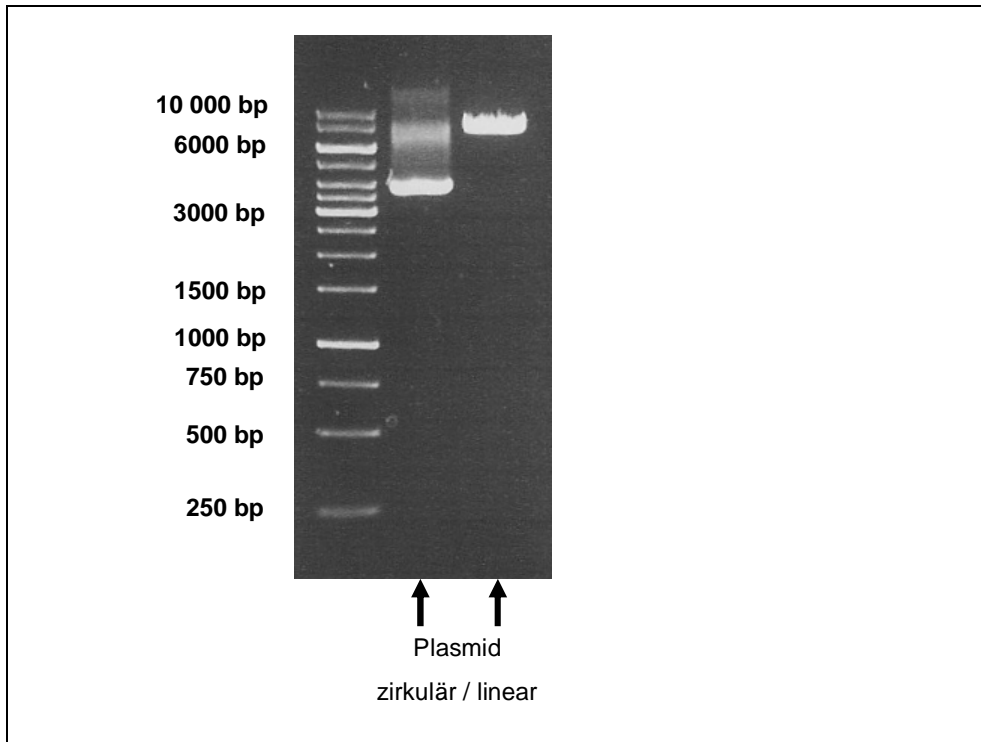


Abb. 3.3: Unterschied der Laufeigenschaften von ungeschnittenem (zirkulärem) Plasmid und geschnittenem (linearisiertem) Plasmid im Agarosegel. Als Größenstandard wurde der Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) verwendet.

Das linearisierte Plasmid wurde dann ein weiteres Mal geschnitten, diesmal mit dem Enzym *NheI* (10 U/ μ l). Zum Ansatz wurden 5 μ l *NheI* und 4 μ l Fast AP alkalische Phosphatase (1U/ μ l) (Fermentas) gegeben. Letzteres Enzym dient dazu, die geschnittenen Enden zu dephosphorylieren und zu verhindern, dass sie sich wieder aneinander lagern. Die Reaktion wurde erneut für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Gleichzeitig wurde auch die B-Untereinheit des *T. canis unc-49* Genes aus dem TOPO TA Cloning® Vektor PCR 4 TOPO geschnitten. Der Restriktionsenzymverdau erfolgte nach folgendem Ansatz:

64 μ l H₂O

8 μ l 10 × Puffer B (Fermentas)

15 μ g Plasmid-DNA

5 μ l *NheI* (10 U/ μ l) (Fermentas)

5 μ l *PstI* (10 U/ μ l) (Fermentas)

Inkubieren bei 37 °C für 2 h.

Der erfolgreiche Restriktionsenzymverdau wurde auch hier durch eine Gelelektrophoreseaufnahme kontrolliert.

Die geschnittene Bande wurde aus dem Gel isoliert wie in Punkt 3.2.21 beschrieben, über Nacht gefällt und dann zusammen mit dem geschnittenen Plasmid, welches schon den Promotor enthielt, in eine Ligation eingesetzt:

Ligation:	Leerwert:
4 µl Vector	4 µl Vector
4 µl Insert	-
1 µl 10 × Ligasepuffer (Fermentas)	1 µl 10 × Ligasepuffer (Fermentas)
1 µl T4 Ligase (30U/µl) (Fermentas)	1 µl T4 Ligase (30U/µl) (Fermentas)

Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 22 °C und anschließend bei 8 °C über Nacht. Die Reaktion wurde bei 65 °C für 10 min abgestoppt. Anschließend wurden 2 µl des Ligationsansatzes in chemisch kompetente *E. coli* One Shot™ Top 10 Zellen eingeschleust, um das Plasmid zu vermehren.

Nachdem das Plasmid, wie in Punkt 3.2.27 beschrieben, wieder aus den Zellen präpariert wurde, folgte das Einfügen der *C. elegans unc-54* 3' UTR. Der Vektor wurde erneut geöffnet, diesmal mit dem Enzym *Pst*I und *Sbf*I, um die 3' UTR einzuschleusen. Dies war durch den vorherigen Anbau passender Verbindungssequenzen an die 3' UTR Sequenz durch geeignete Primer in der PCR möglich. Der Einbau erfolgte wie in Abbildung 3.4 schematisch gezeigt.

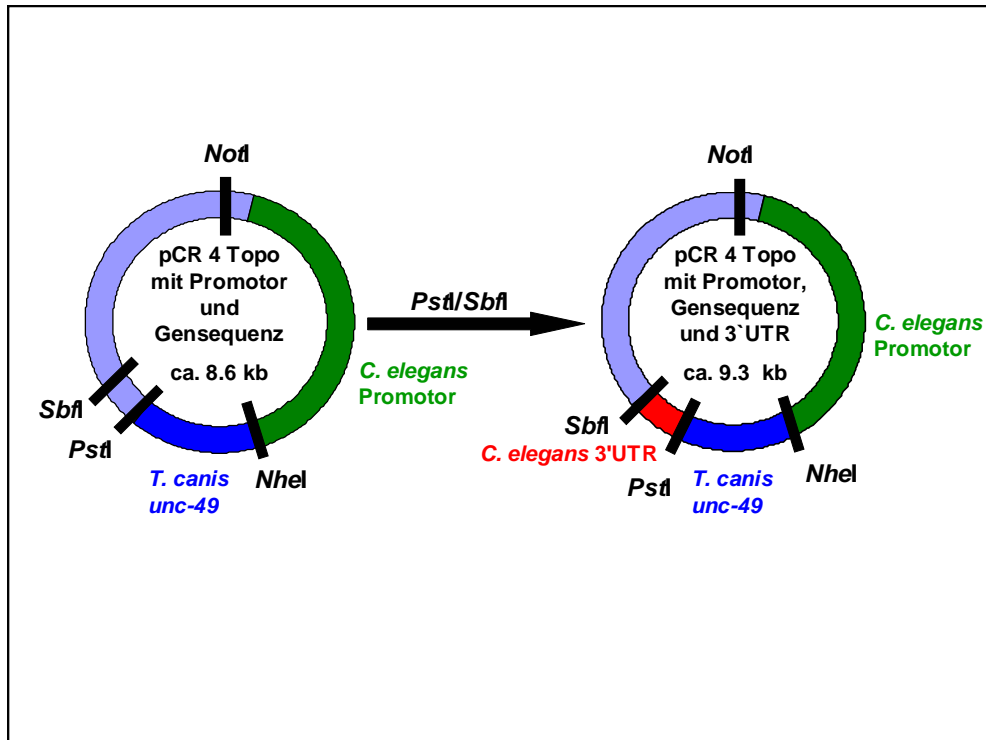


Abb. 3.4: Einbau der *C. elegans* 3' UTR in das Plasmidkonstrukt.

Das Schneiden des Vektors erfolgte nach folgendem Schema:

64 μ l H₂O

8 μ l 2 x Puffer Tango (Fermentas)

15 μ g Plasmid-DNA

5 μ l *Sbf*I (10 U/ μ l) (Fermentas)

5 μ l *Pst*I (10 U/ μ l) (Fermentas)

Inkubieren bei 37 °C für 2 h.

Nach dem gleichen Schema wurde auch die *C. elegans unc-54* 3' UTR aus dem TOPO TA Cloning® Vektor PCR 4 TOPO Vektorgerüst geschnitten und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Die gesuchte Bande wurde ausgeschnitten, aus dem Agarosegel isoliert und anschließend in eine erneute Ligation mit dem geschnittenen Plasmidvektor eingesetzt. Die zweite Ligation erfolgte nach dem gleichen Schema wie die Erste. Es wurden erneut 2 μ l des Ligationsansatzes in chemisch kompetente *E. coli* One Shot™ Top 10 Zellen eingeschleust, um das Plasmid zu vermehren. In den folgenden Schritten wurde das Plasmid isoliert, sequenziert und sein richtiger Aufbau durch einen Restriktionsenzymverdau überprüft. Anschließend stand das Plasmid für die

Injektionsversuche zur Verfügung. Als Negativ-Kontrolle wurde zusätzlich ein Plasmid konstruiert, welches den *C. elegans* Promotor und die *unc-54* 3' UTR enthält, nicht jedoch die *T. canis* unc-49B cDNA. Dieses Plasmid wurde als Kontrolle ebenfalls injiziert. Der Aufbau des Kontrollplasmids ist in Abbildung 3.5 schematisch gezeigt.

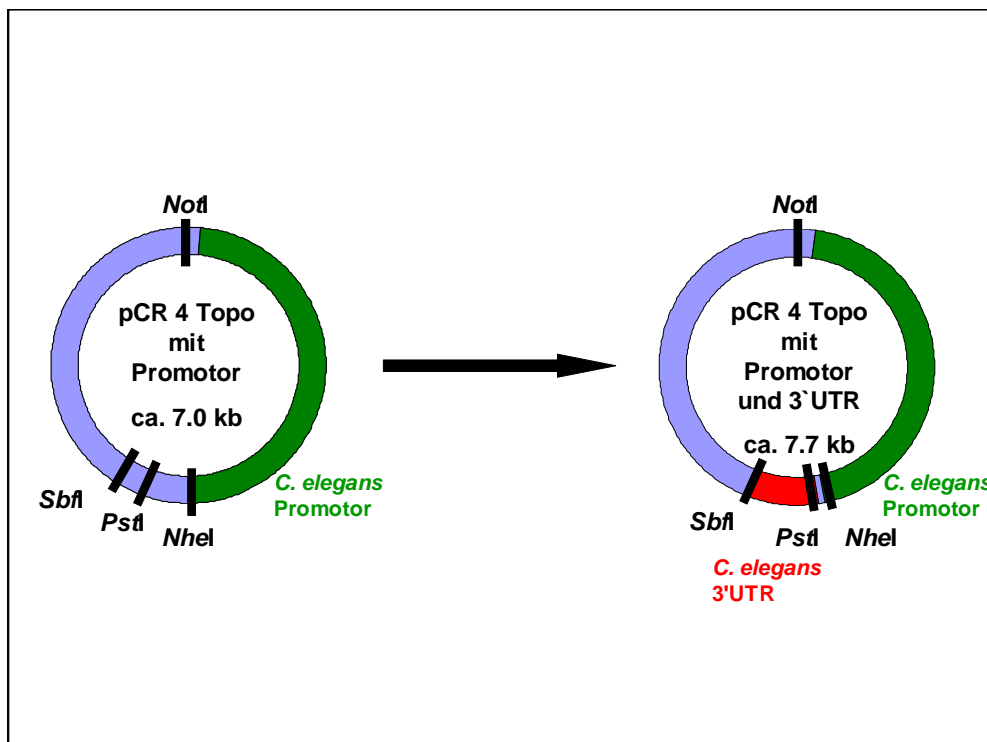


Abb. 3.5: Aufbau des Kontrollplasmids

3.2.6.2 *Caenorhabditis elegans* Injektion

Zur Injektion der gewünschten Plasmide in die Gonaden von *C. elegans* wurden ein Mikroskop der Firma Leica und ein Mikromanipulator der Firma Eppendorf verwendet. Das Plasmid, welches das Zielgen enthielt, wurde in einer Konzentration von 50 ng/μl eingesetzt, das koinjizierte GFP-Plasmid mit einer Konzentration von 25 ng/μl. Für die Injektion wurden Femtotips der Firma Eppendorf mit einem Innendurchmesser von 0,5 μm und einem Außendurchmesser von 1 μm (Femtotips®I) bzw. 0,7 μm (Femtotips®II) verwendet. Mit Hilfe eines "Mikroloaders", bei dem es sich um eine lang ausgezogene Pipettenspitze handelt, die auf eine herkömmliche 10 μl Pipette aufgesetzt werden kann, wurde das Plasmid in die Nadel gefüllt. Dann konnte die Nadel in den Mikromanipulator eingespannt werden. Für die Injektion wurden junge adulte *C. elegans* verwendet. Sie wurden von der Agarplatte gepickt und auf einem

Agarosepad fixiert. Das Agarosepad bestand aus einem Tropfen 2%iger Agarose, der auf einen Objekträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen glatt ausgestrichen wurde. Nach einer Minute des Trocknens konnte das Deckgläschen wieder entfernt werden und das Agarosepad war verwendbar. Die adulten *C. elegans* wurden mit der Insektenpräpariernadel aufgenommen und auf der Oberfläche des Agarosepads festgedrückt, was ihre Bewegungsfähigkeit einschränkte, ohne sie zu verletzen. Die Nematoden wurden mit Öl überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Dann konnte die Mikroinjektion am Mikroskop durchgeführt werden. Die durch den Mikromanipulator sehr fein steuerbare Nadel wurde an den Nematoden herangefahren und in die Gonaden von *C. elegans* gestochen. Im folgenden Schritt wurde das Plasmid injiziert. Anschließend konnte die Nadel zurückgezogen und der Nematode vorsichtig mit einem Tropfen M9-Puffer von dem Agarosepad gelöst werden. Die injizierten *C. elegans* wurden zurück auf eine NGM-Agarplatte gesetzt, um sich zu vermehren. Die Nachkommenschaft der erfolgreich injizierten Nematoden, welche das eingeführte Plasmid exprimierten, waren von den anderen durch das grüne Fluoreszieren des koinjizierten GFP-Plasmids zu unterscheiden.

3.2.7 Gewinnung von adulten *T. canis*

Adulte *Toxocara canis* wurden aus zwei infizierten Beagle Hunden gewonnen. Dazu wurden den Hunden jeweils 4 mg/kg Körpergewicht Arecolin Bromid in Wasser gelöst oral verabreicht. Das pflanzliche Alcaloid Arecolin erhöht die Darmperistaltik durch seine parasymphomimetische Wirkung. Es führt zu blutigem Durchfall und Ablösung der Darmschleimhaut, wodurch auch die paralysierten Würmer ausgetrieben werden. Aufgrund seiner starken Nebenwirkungen wird es heutzutage nicht mehr therapeutisch eingesetzt. In diesem Fall wurde es verwendet, um eine Tötung der Hunde zu vermeiden und dennoch adulte Nematoden zu gewinnen. Die adulten *T. canis* konnten lebend aus dem Kot der Tiere isoliert werden.

Die adulten *T. canis* wurden nach Geschlecht differenziert und in einem 2 ml Eppendorf Gefäß mit dem 3-5-fachen Volumen an GIT-Puffer versetzt und solange stark geschüttelt, bis sie sich komplett aufgelöst hatten. Anschließend wurden sie bei -80 °C eingefroren. Einige der *T. canis* wurden auch für spätere DNA-Isolierungen trocken eingefroren.

3.2.8 RNA-Isolierung aus *T. canis*

Die in GIT-Puffer aufgelösten *T. canis* wurden auf Eis aufgetaut und zur Denaturierung der Proteine mit 1-2 ml Trizol® Reagent (INVITROGEN) versetzt. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 0,2 ml Phenol-Chloroform (SIGMA) versetzt. Dies führte zu einer Trennung der organischen Phase von der wässrigen Phase. Durch vorsichtiges Schütteln des Eppendorfgefäßes löste sich die RNA in der wässrigen Phase. Es wurde 15 min bei 12000 × g und 2 °C - 8 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere klare Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die organische Phase wurde verworfen. Die RNA wurde mit 0,5 ml Isopropylalkohol gefällt, 10 min inkubiert und 10 min bei 12000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Alkohol wurde abpipettiert und die RNA fünfmal mit je 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Alkohol entfernt und verbleibende Reste mittels Glaskapillare abgezogen. Zum Trocknen der RNA wurde das Eppendorfgefäß für 10 min offen stehen gelassen. Die RNA wurde dann in 200 µl bidest. DEPC-Wasser gelöst. Um den RNA-Gehalt in der Probe zu bestimmen wurde die Absorption von 2 µl der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gemessen. Die Menge an RNA ergibt sich aus der Multiplikation der gemessenen optischen Dichte (OD) bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und dem Multiplikationsfaktor, der für RNA bei 40 µg/ml liegt, da 40 µg/ml RNA eine OD von 1 besitzen. Von der OD₂₆₀ wird noch die OD₃₂₀ als Hintergrund abgezogen. Die Berechnung erfolgt demnach anhand folgender Formel:

$$\text{RNA-Konzentration in } \mu\text{g/ml} = ((\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/ml})$$

Zur Bestimmung der Reinheit der isolierten RNA wurde außerdem die Absorption bei 280 nm und 230 nm Wellenlänge gemessen. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt an, wie stark die Probe durch Proteine verunreinigt ist. Eine optimale Reinheit der RNA ist bei einem Quotienten von 2 zu erwarten. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₃₀ gibt an, wie stark die Probe durch Salze verunreinigt ist. Eine optimale Reinheit der RNA ist bei einem Quotienten von mehr als 1,8 zu erwarten. Je niedriger der Quotient, desto höher ist die Verunreinigung durch Salze (Mülhardt, 2006).

3.2.9 RNA-Isolierung aus *C. elegans*

Zur Gewinnung von RNA aus *C. elegans* wurden die Nematoden mit M9-Puffer von ca. 40 besiedelten NGM-Agarplatten heruntergespült und in einem 50 ml Falcon gesammelt. Die Wurm suspension wurde bei 1400 x g für 20 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen. Anschließend wurden die Nematoden ca. fünfmal mit M9-Puffer gewaschen, um Bakterien und Verunreinigungen zu entfernen. Das Waschen wurde solange durchgeführt, bis die Flüssigkeit, in der sich die Nematoden befanden, klar war. Dann wurde erneut bei 1400 x g für 20 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Nematoden in so wenig Flüssigkeit wie möglich in die "Lysis tubes" Typ E für die Speed Mill P12 überführt. Es wurden "Lysis tubes" verwendet, welche 1 mm große Kügelchen enthielten. Das übrige Röhrchenvolumen wurde mit 1ml peqGOLD TriFast™ aufgefüllt. Die Röhrchen wurden in die Speed Mill P12 gesetzt und für 2 min und 30 s bei voller Geschwindigkeit geschüttelt. Dabei wurden die Nematoden von den Kügelchen im Röhrchen homogenisiert. Anschließend konnte die Flüssigkeit aus dem Röhrchen abgesaugt und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt werden, die Kugeln verblieben im Röhrchen. Die RNA-Isolierung erfolgte nach den Angaben im peqGold TriFast™ Protokoll des Herstellers. Einzige Abweichung war, dass die RNA bei der RNA-Präzipitation nicht nur für 5-15 min in Isopropanol gefällt wurde, sondern über Nacht und in Gegenwart von 1 µl Glycogen.

3.2.10 RNA-Isolierung aus kleinen Mengen transgener *C. elegans*

Die transgenen *C. elegans* waren nicht in so großer Anzahl vorhanden wie die normalen Stämme und außerdem mussten sie einzeln auf Expression des Plamides unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Aus diesem Grund wurden nur etwa 50 Adulte Würmer für die RNA-Isolation mit einer Insektenpräpariernadel einzeln von der Agarplatte gepickt und in 50 µl M9-Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß abgesetzt. Das Reaktionsgefäß blieb etwa 10 Minuten lang ruhig stehen, um die Würmer sedimentieren zu lassen. Anschließend wurde ein Großteil der Flüssigkeit abgenommen und die Nematoden wurden mit einer kleinen Menge Restflüssigkeit in ein "Lysis tube" Typ E für die Speed Mill P12 mit 1 mm großen Kügelchen überführt. Es wurden 200 µl Lysis Puffer und 4 µl BisTris(Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl)-methan) (TCEP) aus dem

Nucleo Spin[®] RNA XS Kit von Macherey und Nagel dazu gegeben und die Probe in der Speed Mill P12 für 2 min und 30 s bei voller Geschwindigkeit geschüttelt. Anschließend wurde die Flüssigkeit auf eine dem Kit beiliegende Säule gegeben und weiter nach Anleitung des Nucleo Spin[®] RNA XS Kit verfahren.

3.2.11 cDNA Synthese für Reverse Transkriptase-PCR

Im Anschluß an die RNA-Isolation wurde ein DNase Restriktionsenzymverdau mit der DNaseI von Fermentas nach dem Fermentas Protokoll durchgeführt. Dies ist nötig wenn die cDNA für eine Reverse Transkriptase-PCR genutzt werden soll, da deren Ergebnisse durch übriggebliebene DNA verfälscht werden können. Die cDNA Synthese erfolgte mit den Reagenzien und dem Protokoll der Premium Reversen Transkriptase von Fermentas. Der Ansatz und das Temperaturprofil sind im Folgenden aufgeführt. Besonderheit bei der cDNA Synthese für die Reverse Transkriptase-PCR ist eine sogenannte minus-RT-Kontrolle, bei welcher der unten aufgeführte Ansatz ein weiteres Mal hergestellt wird, jedoch ohne die Reverse Transkriptase. Auf diese Weise kann in der PCR überprüft werden, ob mögliche Banden tatsächlich von isolierter RNA herrühren, also einen Hinweis auf die Expression geben, oder durch DNA-Reste entstanden sind, welche sich noch in der Probe befinden könnten. Die minus-RT-Kontrolle sollte folglich immer durchgeführt werden und keine Banden in der PCR zeigen. Die RT-PCR wird unter Punkt 3.2.18 näher erläutert.

11,5 µl bidest. H₂O

4 µl 5 × RT Puffer (Fermentas)

1 µl dNTPs (10 mM) (Fermentas)

1 µl Oligo-dT-Anker-Primer (0,5µg/µl) (Fermentas)

0,5 µl Ribo Lock RNase Inhibitor (40 U/µl) (Fermentas)

1 µl Premium Reverse Transkriptase (200 U/µl) (Fermentas)

1 µg RNA

Gesamtvolumen 20 µl

Inkubation:

50 °C für 45 min

60 °C für 15 min

85 °C für 5 min

Die cDNA wurde bei -20 °C eingefroren.

3.2.12 cDNA Synthese für RACE-PCR-Anwendungen mit dem BD Smart Race cDNA Amplification Kit®

Die gewonnene mRNA aus den adulten *T. canis* wurde mittels Reverser Transkriptase (BD Power Skript) in cDNA umgeschrieben. Die verwendete Reverse Transkriptase ist eine Variante der Reversen Transkriptase aus dem Retrovirus *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV).

Für das Umschreiben der isolierten RNA in cDNA wurde das BD Smart Race cDNA Amplification Kit® benutzt. Die cDNA Synthese erfolgte nach Herstellerangaben. Bei der Herstellung von cDNA für "Rapid-Amplifikation of cDNA-ends" (RACE) PCR-Anwendungen wurde sowohl 5' als auch 3' cDNA synthetisiert. Für die Nutzung der synthetisierten cDNA als Template für die RACE-PCR erhielten beide Stränge unterschiedliche Erkennungssequenzen an ihren Enden, die später den universellen RACE-Primern als Bindestellen dienen. Der 3'-Strang besitzt als Primererkennungssequenz die Poly-A-Region, an den 5'-Strang wird eine CAP Struktur angehängt ("CAP-binding"), welche als Bindestelle für den Universalprimer dient.

3.2.13 cDNA Synthese für RACE-PCR-Anwendungen mit dem Roche 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation

Mit Hilfe des Roche 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation wurde ebenfalls cDNA für RACE-PCR-Anwendungen synthetisiert. Bei der Synthese der 5' cDNA wurde statt Gesamt-cDNA die cDNA des gesuchten Gens mit spezifischen Primern synthetisiert. Dazu wurden jeweils zwei spezifische Primer in Richtung 5'-Ende der gesuchten Gensequenz verwendet. Diese Primer, sowie ein Oligo-dT-Anker-Primer wurden später auch für die RACE-PCR verwendet. Am 5'-Ende wurde ein Tailing für die spätere Verwendung der cDNA in der RACE-PCR durchgeführt, bei dem eine Erkennungssequenz angehängt wurde, die später dem Oligo-dT-Anker-Primer als Bindestelle dient. Die cDNA Synthese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und schloss auch eine Aufreinigung mit dem High Pure PCR Purification Kit® von Roche mit ein.

3.2.14 cDNA Synthese für RACE-PCR-Anwendungen mit Fermentas Reagenzien und dem Oligo-dT-Anker-Primer von Roche

Außerdem wurde cDNA mit Reagenzien von Fermentas und dem Oligo-dT-Anker-Primer von Roche synthetisiert. Die Synthese erfolgte nach folgendem Schema:

11,5 µl bidest. H₂O

4 µl 5 × RT Puffer (Fermentas)

1 µl dNTPs (10 mM) (Fermentas)

1 µl Oligo-dT-Anker-Primer (0,5 µg/µl) (Roche)

0,5 µl Ribo Lock RNase Inhibitor (40 U/µl) (Fermentas)

1 µl Premium Reverse Transkriptase (200 U/µl) (Fermentas)

1 µg RNA

Gesamtvolumen 20 µl

Inkubation:

50 °C für 45 min

60 °C für 15 min

85 °C für 5 min

Dann wurde die cDNA bei -20 °C eingefroren.

3.2.15 DNA-Isolierung (Phenol-Chloroform-Methode)

Ein etwa 1 cm langes Stück eines männlichen *T. canis* wurde in ein Eppendorfgefäß mit 500 µl GIT-Puffer überführt und 5-10 min bei -20 °C eingefroren. Anschließend wurde Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugegeben und das Wurmstück mit einem Pistill im Eppendorfgefäß homogenisiert. Die Gewebemasse wurde dann für mindestens 30 min bis zu 12 h bei 55 °C geschüttelt. Dieser Prozess dient dem Abbau der Proteine im Zelllysate. Da diese Reaktion nach vollständigem Abbau aller Proteine endet, ist der Zeitraum des Verdauens variabel. Danach wurde 1:1 % (V/V) Phenol-Chloroform (SIGMA) dazu gegeben und 10 min bei 12000 × g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 10 % 3 M Natriumacetat und 300 µl 98 % EtOH vorsichtig dazu gemischt.

Der Ansatz wurde für 1-2 h oder über Nacht bei -20 °C gekühlt, um die DNA zu fällen. Beim anschließenden Zentrifugieren bei 4 °C und 12000 × g für 1 h setzte sich die DNA am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Sie wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und schließlich in 50 µl bidest Wasser resuspendiert. Die in der Probe vorhandene RNA konnte durch einen Enzymverdau mit RNAse entfernt werden. Der DNA-Gehalt der Proben wurde photometrisch bei 260 nm gemessen, wie bereits für RNA beschrieben. Die Menge an DNA ergibt sich aus der Multiplikation der gemessenen optischen Dichte (OD) bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und dem Multiplikationsfaktor, der für DNA bei 50 µg/ml liegt, da 50 µg/ml DNA eine OD von 1 besitzen. Von der OD₂₆₀ wird noch die OD₃₂₀ als Hintergrund abgezogen. Die Berechnung erfolgt demnach anhand folgender Formel:

$$\text{DNA-Konzentration in } \mu\text{g/ml} = ((\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml})$$

Die Reinheit der DNA wird ebenfalls, wie bereits für RNA beschrieben, durch die Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ und OD₂₆₀/OD₂₃₀ bestimmt. Bei Quotienten von 1,8 ist keine Verunreinigung durch Proteine oder Salze zu erwarten (Mülhardt, 2006). Dennoch muss bedacht werden, dass sich bei dieser Art der DNA-Extraktion auch immer noch RNA in der Probe befindet, wenn auch durch die RNAse verdaut. Die genaue DNA-Menge kann deshalb nur über ein Agarosegel abgeschätzt werden. Die Qualität der isolierten DNA wurde durch eine Agarosegelelektrophorese mit einem 1 % Agarosegel bestimmt.

3.2.16 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient dazu DNA-Fragmente zu vervielfältigen. Dazu sind Primer nötig, etwa 20-30 bp lange Oligonukleotidstücke, die an die verwendete DNA binden und so der Polymerase als Ansatzpunkte dienen. Die DNA-Polymerase ist ein Enzym, welches zu einzelsträngiger DNA durch Aneinanderreihung von Nukleinsäuren ausgehend von einem Primer einen komplementären Strang synthetisiert. Dieser Vorgang wird als Replikation bezeichnet und dient zur Vervielfältigung der DNA. In der klassischen PCR wird häufig die so genannte Taq-Polymerase verwendet. Es handelt sich dabei um ein Isolat aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus*, der in heißen

Quellen vorkommt (Innis et al., 1988). Bei einer Standard-PCR werden als Reaktionspartner für die Polymerase ein Vorwärts Primer und ein Rückwärts Primer eingesetzt, die das zu amplifizierende DNA-Stück flankieren. Mit einem festgelegten PCR-Programm in einem Thermocycler kann die Vervielfältigung der DNA durch die Polymerase gesteuert werden. Das Programm sollte zunächst einen Denaturierungsschritt enthalten, indem sich bei 94 °C beide Doppelstränge der DNA voneinander trennen. Dieser Schritt kann zwischen 30 und 120 s dauern. Es folgt ein Anlagerungsschritt, bei dem die Temperatur gesenkt wird, die Primer an die Einzelstrang-DNA hybridisieren und deren Verlängerung bereits beginnt. Je nach Primerspezifität sollte dieser Schritt 10-60 s dauern. Im folgenden Elongationsschritt wird bei etwa 72 °C von den Primern aus der Zweitstrang zu der gewünschten Sequenz synthetisiert, indem die Polymerase Nucleotide anlagert. Dabei werden etwa 1000 Nucleotide pro Minute angelagert, weshalb je nach Länge des gewünschten Produktes die Elongationszeit variiert werden sollte. Auf diese Weise wird jeder Einzelstrang zu einem Doppelstrang. Am Ende eines Zyklus hat sich die DNA-Menge also idealerweise verdoppelt. Durch mehrfaches Wiederholen des Zyklus kommt es so zu einer Vervielfältigung des Produktes. Die hier genannten Zeitprofile sind beispielhaft und können je nach Art der DNA, der Primer und des gewünschten Produktes variieren. Es wurden verschiedene Polymerasen verwendet, die unter Punkt 3.1.6 aufgelistet sind.

3.2.17 Rapid-Amplification of cDNA-ends (RACE)-PCR

Eine Abwandlung der herkömmlichen PCR ist die RACE-PCR. Sie kann angewendet werden, wenn nur ein kleiner Teil einer Gensequenz bekannt ist, um das vollständige Gen zu identifizieren. Bei der RACE-PCR wurden spezifische Primer für das bekannte Fragment gewählt. Diese spezifischen Primer liegen in dem bekannten Stück der Gensequenz und weisen von dort nach außen in Richtung des 3' bzw 5' Endes. Zusätzlich wurden sogenannte Universalprimer verwendet, welche am 3'-Ende an den Poly-A-Schwanz binden und am 5'-Ende an eine universelle Sequenz, die bereits bei der cDNA Synthese dort angelagert wurde. Mit Hilfe dieser Universalprimer an den Enden der Sequenz und den spezifischen Primern in der Mitte der Sequenz konnten die unbekanntes Zwischenbereiche amplifiziert werden. Es wurde je nach cDNA Synthese die RACE-PCR nach den betreffenden Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden

folgenden Kits verwendet: BD Smart Race cDNA Amplification Kit®, Roche 5'/3' RACE Kit 2nd Generation, Fermentas Reagenzien mit dem Oligo-dT-Anker-Primer von Roche. Die PCR-Bedingungen und Primer sind im Anhang unter Punkt 10.1 aufgeführt.

3.2.18 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Die RT-PCR wurde dazu genutzt, die Expression der eingefügten Plasmide in den transgenen *C. elegans* zu überprüfen. Dies ist möglich, indem nur RNA isoliert wird und sämtliche DNA durch einen DNase Enzymverdau entfernt wird. Die aus dieser RNA entstehende cDNA sollte nur die mRNA enthalten, die im Organismus gebildet wurde, also nur exprimierte Gene. Diese können mit den entsprechenden Primern amplifiziert werden. Das PCR-Programm verläuft wie bei einer Standard-PCR, einziger Unterschied ist die bereits erwähnte minus-RT-Kontrolle, die bei jeder PCR mitlaufen muss, um eine Kontamination mit DNA auszuschließen. Die verwendeten Primer und PCR-Bedingungen sind im Anhang unter Punkt 10.1 angegeben.

3.2.19 Herstellung degenerierter Primer

Bei degenerierten oder abgeleiteten Primern handelt sich um ein Gemisch aus Primern, die nahezu die gleiche Sequenz besitzen, jedoch an einigen degenerierten Positionen verschiedene Basen aufweisen. Degenerierte Primer können verwendet werden, wenn das gesuchte Gen bei einer Art noch gänzlich unbekannt ist, jedoch bei anderen nah verwandten Organismen bereits sequenziert wurde.

Es wurde nach Regionen gesucht, in denen besonders große Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen der unc-49B-Untereinheiten verschiedener Nematodenarten bestand. Zu diesen Regionen wurden degenerierte Primer angefertigt, welche die Unterschiede in der Basensequenz zwischen den verglichenen Nematoden berücksichtigten. Die Unterschiede wurden notiert unter Verwendung eines internationalen Buchstabensystems des "IUPAC-Code for Nucleotides", bei dem ein Buchstabe für mehrere unterschiedliche Basen kodiert. Dies ermöglicht die Zusammenstellung eines speziellen Primergemisches. Der Buchstabe W steht beispielsweise stellvertretend für die Basen A oder T. Eine Primersequenz, die einen solchen Code-Buchstaben enthält, wird in ein

Primergemisch umgesetzt, welches dann Primer mit jeder der beiden Basen enthält. Auf diese Weise erhöhen sich die Chancen, dass ein Primer der in dem Primergemisch vorliegt an die noch unbekannte Gensequenz bindet. Verwendete Primer und PCR-Bedingungen sind im Anhang unter Punkt 10.1 zu finden.

3.2.20 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die durch den Ladungspuffer negativ geladenen DNA-Fragmente wandern durch das Agarosegel zur Kathode, wobei kleinere Fragmente schneller wandern als größere. Der Grund dafür ist die sieb- oder gitterartige Struktur der Agarose, deren Poren kleinen DNA-Fragmenten weniger Widerstand bieten als Größeren, wodurch eine Auftrennung erfolgt. Die Größe der aufgetrennten Fragmente ist danach an einem mitgelaufenen Größenstandard abzuschätzen.

Es wurden für die Gelelektrophorese 0,8%ige, 1%ige und 1,5%ige Agarosegele (Agarose Neo Ultra Qualität von ROTH) verwendet. Um diese Gele herzustellen, wurde die Agarose in TAE-Puffer gekocht und zur Anfärbung der DNA mit Gel Star® (0,1 µl/ml) bzw. GRGreen-Farbstoff (0,1 µl/ml, 10000X in DMSO) versetzt. Gel Star® ist ein interkalierendes Reagenz, welches sich zwischen die Stränge der DNA lagert und bei Bestrahlung mit ultraviolettem oder blauem Licht grün fluoresziert. Durch seine Eigenschaft sich in DNA einzubauen, wirkt es karzinogen und darf nur mit bestimmten Sicherheitsvorkehrungen verwendet werden. GRGreen ist ein neuer Farbstoff zur Anfärbung von DNA, welcher laut Herstellerangaben keine karzinogene Wirkung hat und daher keiner besonderen Sicherheitsvorkehrungen bei der Verwendung bedarf. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass GRGreen nicht in lebende Zellen eindringen kann.

Die flüssige Agarose wurde anschließend zum Aushärten in eine Form mit Kamm gefüllt. Das nach etwa 20 min vollständig ausgehärtete Gel wurde dann in eine Gelkammer mit TAE-Puffer gelegt und die vom Kamm geformten Taschen mit den einzelnen Proben und dem Größenstandard befüllt. Jede Probe wurde zuvor mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt und mit 4 µl 6 × Ladungspuffers versetzt (Endkonzentration des Ladungspuffers 1-fach). Durch Anlegen einer Spannung von 85-105 V/cm wurden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten anschließend durch das

fluoreszierende Gel Star® oder GRGreen auf einem UV-Tisch oder unter Blaulicht sichtbar gemacht und photographiert bzw. ausgeschnitten werden.

3.2.21 Extrahierung von DNA aus einem Agarosegel

Unter dem UV-Licht bzw. Blaulicht erscheint eine Anhäufung vieler DNA-Fragmente der gleichen Länge als helle Bande im Gel. Ist die Bande vereinzelt und klar abgesetzt, kann die DNA aus dem Gel wieder extrahiert werden. Die unter dem UV-Licht oder Blaulicht leuchtende DNA-Bande wurde dazu mit einer Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 × g hatte sich Flüssigkeit mit den PCR-Produkten aus dem Gel gelöst und konnte mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden. Außerdem war es möglich, die ausgeschnittene Bande in eine unten abgeschnittene 100 µl Filterspitze zu stecken und diese dann in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß bei 11000 × g zu zentrifugieren. Auf diese Weise wurde ein Großteil der Flüssigkeit von dem Gel getrennt und durch den Filter ins Eppendorfgefäß gedrückt. Der Ertrag war auf diese Weise höher. Eine weitere Konzentration der DNA konnte durch Fällung erreicht werden. Dabei versetzte man die aus dem Agarosegel gewonnene Flüssigkeit mit 1 µl Glycogen, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und dem 3-fachen Volumen an 100%igem Isopropanol. Dann wurde die Probe entweder für 1 h bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 45 min bei 13000 × g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die DNA mit 1 ml 100 % Ethanol gewaschen. Die Probe wurde erneut bei 13000 × g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die DNA getrocknet. In einem letzten Schritt konnte die konzentrierte DNA in 10 µl bidest. H₂O gelöst werden. Die extrahierte DNA stand nunmehr für weitere Verwendungen zur Verfügung.

3.2.22 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Kompetente Bakterienzellen sind in der Lage, Fremd-DNA von außen aufzunehmen. Viele Bakterien besitzen eine natürliche Kompetenz, diese Fähigkeit kann aber auch künstlich hervorgerufen und gesteigert werden. Dazu gibt es verschiedene Techniken, wie etwa die Elektroporation oder die in dieser Arbeit verwendete chemische Methode zur Herstellung der kompetenten Zellen.

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*, wurde zunächst eine Vorkultur aus 50 ml LB-Medium mit 100 µl *E. coli* Top 10 Zellen (Invitrogen) angeimpft. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und mit 200 rpm geschüttelt. Mit je 1 ml dieser Vorkultur wurden dann zwei 250 ml Erlenmeyerkolben mit je 50 ml LB-Medium beimpft und bei 37 °C und 200 rpm solange geschüttelt bis eine OD von 0,5 erreicht wurde. Nach Erreichen dieser OD wurden die Kolben durch Lagerung auf Eis auf 5 °C heruntergekühlt. Alle weiteren Schritte mussten ab diesem Zeitpunkt unter Kühlung verlaufen. Es wurden nur vorgekühlte Gefäße verwendet, da sich die Zellen nicht erwärmen durften. Die Zellsuspension aus den beiden Erlenmeyerkolben wurde in zwei 50 ml Falcon-Tubes überführt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5000 × g wurde der Überstand verworfen und die am Boden abgesetzten Bakterien in eiskalter CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4 °C, 5000 × g) wurden die Bakterien in 25 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert und für 4-8 h auf Eis geschwenkt. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 4 °C, 5000 × g), nach der die Bakterien in 4,3 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (0,1 M) und 700 µl steril-filtrierte absolutem Glycerol resuspendiert wurden. Die Zellsuspension wurde in Portionen von 100 µl auf insgesamt 100 × 2 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt. Die Eppendorfgefäße, sowie der Ständer wurden im Gefrierfach vorgekühlt und auf Eis gelagert. Die fertigen Bakterienportionen wurden dann in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.23 Klonierung (TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing von Invitrogen)

Bei der Klonierung wird ein durch PCR amplifiziertes Genfragment in einen Plasmidvektor ligiert. Dieser Plasmidvektor wird in chemisch kompetente Bakterienzellen eingeschleust, die dann den Plasmidvektor mit dem amplifizierten Genfragment bei der Teilung mitvermehren.

Dazu wurde hier das TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing von Invitrogen mit dem Plasmid TOPO TA Cloning® Vektor PCR 4 TOPO verwendet. Der PCR 4 TOPO Vektor ist ein 3956 bp großes Plasmid und trägt neben der Möglichkeit ein DNA-Fragment einzufügen noch einige andere Gene und Schnittstellen, die vor allem zur Selektion der erfolgreich transformierten Zellen dienen. Unter anderem trägt der PCR 4 TOPO Vektor sowohl ein Resistenzgen für Kanamycin, als auch für Ampicillin, wie in der Vektorkarte in Abbildung 3.6 dargestellt ist. Dadurch ist es

möglich, mittels Zugabe dieser Antibiotika zum Wachstumsmedium der Zellen, das Wachstum nicht-transformierter Zellen zu hemmen. Darüber hinaus verfügt das Plasmid über Schnittstellen für das Enzym *EcoRI* auf beiden Seiten der Region, in die das amplifizierte DNA-Stück eingesetzt wird. Auf diese Weise kann die gesuchte DNA später durch einen Restriktionsenzymverdau mit dem Enzym *EcoRI* wieder aus dem Plasmid gewonnen werden. Die Region, in die die gewünschte DNA eingefügt werden kann, befindet sich hinter dem *lac*-Promotor, wodurch eine möglichst hohe Ableserate der DNA gewährleistet ist.

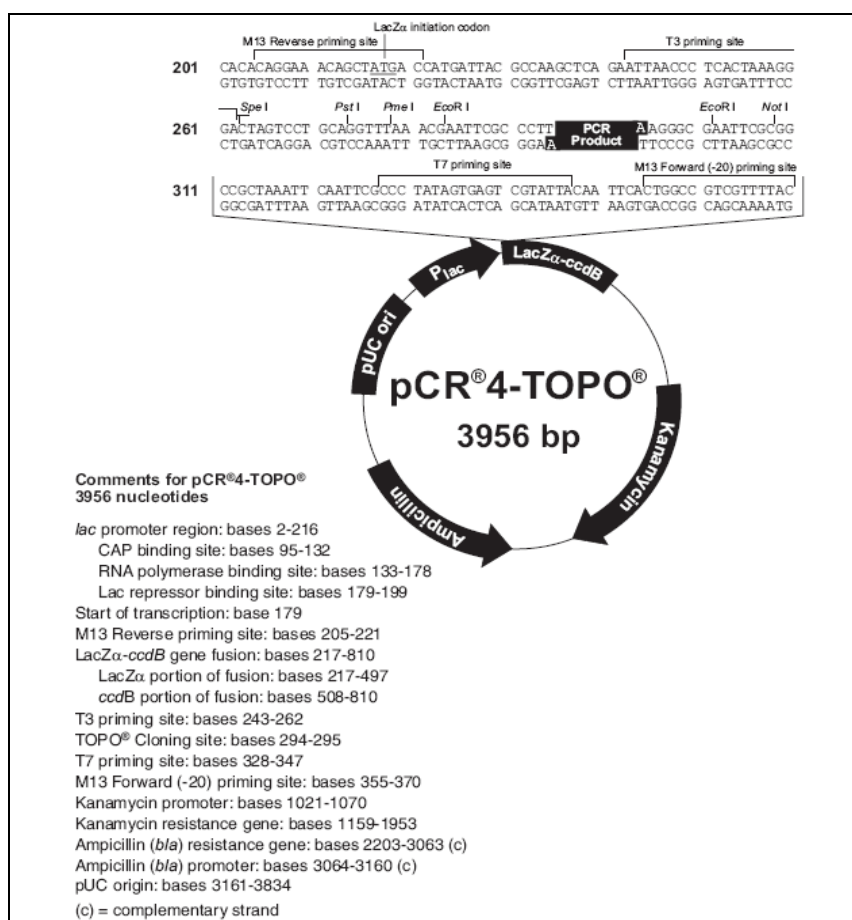


Abb. 3.6: Vektorkarte des TOPO TA Cloning® Vektor PCR 4 TOPO von Invitrogen

Mittels Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte besitzen ein überhänges A am 3'-Ende und bei der Ligation werden diese A-Überhänge an die T-Überhänge des Vektors ligiert. Katalysiert wird die Ligation durch die Topoisomerase, die kovalent an das Plasmid aus dem Kit gebunden ist.

Ansatz zur Ligation des ausgeschnittenen Genfragments in die Plasmide:

- 4 µl des PCR-Fragmentes

- 1 µl Salt Solution (Puffer) (Invitrogen)
- 0,5µl Vektor PCR 4 TOPO (Plasmid) (Invitrogen)
- Inkubation 20 min bei Raumtemperatur

3.2.24 Transformation in chemisch kompetente *E. coli* One Shot™ Top 10 (Invitrogen)

Anschließend wurden die Plasmide in Bakterienzellen transformiert. Dazu wurden 2 µl des Ligationsansatzes mit auf Eis aufgetauten, chemisch kompetenten *E. coli* Zellen vermischt und 30-45 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit bindet die DNA äußerlich an die Zellen. Während des folgenden Hitzeschocks, bei dem die Zellen für 30 s in ein 42 °C Wasserbad gehalten wurden, fand die Aufnahme der Plasmide in die Zellen statt. Danach wurden 200 µl auf 37 °C angewärmtes S.O.C. Medium dazugegeben, und die Zellen eine Stunde lang bei 37 °C im Medium geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten ausplattiert, die Kanamycin (0,1 g/ml) oder Carbenicillin (0,1 g/ml) in einer Konzentration von 0,5 µl/ml enthielten. Damit konnte gewährleistet werden, dass nur die Zellen auf den LB-Agarplatten wuchsen, die auch das Plasmid aufgenommen hatten. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert.

3.2.25 Transformation in chemisch kompetente XL10-Gold "Ultracompetent Cells" (Agilent Technologies)

Die Transformation in XL10-Gold "Ultracompetent cells" verlief nach dem gleichen Protokoll wie die der *E. coli* One Shot™ Top 10 Zellen. Jedoch wurden zu den XL10-Gold "Ultracompetent cells" 2 µl β-Mercaptoethanol hinzu gegeben und sie wurden 10 min auf Eis inkubiert und alle 2 min leicht geschwenkt bevor der Ligationsansatz hinzu kam. Das β-Mercaptoethanol dient der Erhöhung der Transformationseffizienz. Es wurde nur Kanamycin mit den XL10-Gold "Ultracompetent cells" verwendet.

3.2.26 Bakterienkulturen

Von den LB-Agarplatten aus der Klonierung wurden ca. 3-4 Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und einzeln in Röhrcchen mit 5 ml LB-Medium und 2,5 µl Kanamycin (0,1 g/ml) oder Carbenicillin (0,1 g/ml) überführt. Um größere Erträge zu erzielen, konnten auch 50 ml LB Medium mit den Bakterienkolonien

beimpft werden. Die Bakteriensuspensionen wurden über Nacht bei 200 rpm geschüttelt. Aus dem bewachsenen LB-Medium konnte dann das Plasmid durch eine Plasmid-Präparation extrahiert werden.

3.2.27 Plasmid-Präparation (Nucleo Spin von Macherey- Nagel)

Um von den Zellen in dem 5 ml LB-Kulturansatz einen Vorrat für weitere Experimente übrig zu behalten, wurde ein Glycerol-Stock angelegt (500 µl Glycerol + 500 µl Bakteriensuspension) und bei -80 °C eingefroren.

Die übrige Flüssigkeit wurde für 20 min bei 2000 × g zentrifugiert. Die dabei am Grund des Gefäßes abgesetzten Bakterien wurden vom Überstand getrennt und dann nach den Angaben des Herstellers in der Plasmid-Präparation weiterverarbeitet, um die Plasmide aus den Bakterienzellen zu isolieren. Einzige Abweichung vom Herstellerprotokoll war die Elution der Plasmid-DNA mit bidest. H₂O, statt des im Kit mitgelieferten Elutions-Puffers.

3.2.28 MIDI Preparation mit dem Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega)

Zur Präparation von Plamid aus größeren Volumina wurde das Pure Yield™ Plasmid Midiprep System verwendet. Von den über Nacht geschüttelten 50 ml Bakterienkulturen wurden ebenfalls Glycerol Stocks angelegt. Im nächsten Schritt wurden sie in 50 ml Röhrchen überführt und bei 2000 × g für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Plasmid-Präparation nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.29 Überprüfung der Ausbeute aus der Plasmid-Präparation

Es erfolgte eine photometrische Messung zur Bestimmung der erhaltenen DNA-Menge aus der Plasmid-Präparation. Um zu überprüfen, ob die gewonnene DNA auch das Plasmid mit dem gewünschten Fragment enthielt, wurde anschließend ein Restriktionsenzymverdau mit dem Enzym *EcoRI* durchgeführt.

In dem Plasmidvektor, in den das Produkt kloniert wurde, befinden sich links und rechts von dem Produkt Schnittstellen für das Enzym *EcoRI*. An diesen Punkten kann das Enzym *EcoRI* die Zielsequenz ausschneiden. Bei einer anschließenden Gelelektrophorese sollte daher die Zielsequenz als Einzelbande

neben der Bande für das Plasmid erkennbar sein. Es können auch mehrere Banden auftreten, falls die Zielsequenz interne *EcoRI* Schnittstellen besitzt.

Ansatz *EcoRI* Restriktionsenzymverdau:

- 16,5 µl Wasser
- 2,5 µl 10×Puffer (Fermentas)
- 0,5 µl *EcoRI* (10 U/µl) (Fermentas)
- 1 µl DNA
- Eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

3.2.30 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde extern durchgeführt. Die gewonnenen DNA-Produkte wurden an SeqLab Laboratories in Göttingen bzw. GATC in Konstanz versandt. Dort wurden bis zu 900 bp lange DNA-Fragmente in einem Stück sequenziert. Längere Stücke mussten mit Hilfe von Sequenzierprimern in Einzelfragmenten sequenziert werden. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms "Clone Manager Professional 9" und der NCBI Datenbank bearbeitet, ausgewertet und untersucht.

3.2.31 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten aus den Farbstoffassays, dem Bewegungsassay und dem Entwicklungsassay erfolgten mit den Programmen Sigma Plot (Systat Software) und GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Prism). Mit dem Programm Sigma Plot wurden Standardabweichungen und signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten unter Verwendung der "One Way Analysis of Variance" (ANOVA) berechnet. Das Programm GraphPad Prism 5.03 wurde hauptsächlich für den Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher *C. elegans* Stämme genutzt, sowie zur Berechnung von Signifikanzen, EC_{50} , EC_{95} , Pearson Korrelationskoeffizient R^2 , Konfidenzintervallen und Standardabweichungen oder Standardfehlern, der Dosis-Wirkungskurven. Die Daten wurden transformiert, indem die Konzentrationen dekadisch logarithmiert wurden. Anschließend wurde eine nicht-lineare Regression mit einem logistischen vier Parameter-Model berechnet. Die Darstellungen der Ergebnisse als Graphiken wurden entweder mit dem Programm GraphPad Prism 5.03 durchgeführt oder mit dem Programm Excel.

Für den Test auf statistische Unterschiede zwischen Datensätzen wie z.B. den Mittelwerten einer Meßgröße oder den EC_{50} Werten von Dosis-Wirkungskurven verschiedener *C. elegans* Stämme bei Anthelminthikabehandlung wurde der p-Wert berechnet, um die verschiedenen Populationen zu vergleichen. Dabei geht die Hypothese H_0 davon aus, dass es keinen Unterschied zwischen den zu vergleichenden Datensätzen gibt. Diese Hypothese wird dann verworfen, dabei ist der p-Wert die Irrtumswahrscheinlichkeit, welche angibt wie wahrscheinlich es ist, dass H_0 doch zutreffen könnte. Der p-Wert gibt eine Wahrscheinlichkeit an mit einem Wert der zwischen 0 und 1 variiert. Wenn der p-Wert klein genug ist, kann ein signifikanter Unterschied zwischen den Populationen festgestellt werden, weil dann der Unterschied zwischen den Populationen größer ist als es durch reinen Zufall der Fall sein könnte. Der Grenzwert für Signifikanz wurde in den verwendeten Programmen auf 0,05 eingestellt, dies ist ein weit verbreiteter Grenzwert für Signifikanz.

Das Programm GraphPad Prism 5.03 definiert die Bedeutung der verschiedenen p-Werte wie folgt:

p-Wert	Wertung
<0,001	höchst signifikant
≥0,001-0,01	hoch signifikant
≥0,01-0,05	signifikant
>0,05	nicht signifikant

Nach diesem System werden die p-Werte auch in dieser Arbeit bewertet.

3.2.32 Bioinformatische und phylogenetische Auswertungen

Für die phylogenetische Analyse wurde ein Sequenzvergleich der unc-49B cDNA Sequenzen verschiedener Helminthen mit ClustalW2 (Larkin et al., 2007) durchgeführt. Der Stammbaum wurde mit Hilfe dieses Sequenzvergleiches in dem Programm PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) berechnet mit Hilfe der "maximum likelihood estimation" und des JTT Models (Jones et al., 1992) für Aminosäureaustausche. Die Substitutionsraten sind gamma-verteilt und es wird mit vier verschiedenen Substitutionsraten gerechnet. Der BIONJ Algorithmus

wurde benutzt, um den ersten Baum zu bilden, der dann mit dem Programm MEGA4 (Tamura et al., 2007) dargestellt wurde.

Für die Untersuchungen der Proteinstruktur des *T. canis* UNC-49B Proteins auf Transmembranregionen, Signalpeptide und konservierte Domänen wurden folgenden Programme verwendet: TMMOD (Kahsay et al., 2005), TopPred 0.01 (von Heijne, 1992; Claros und von Heijne, 1994), MINNOU (Cao et al., 2006), HMMTOP (Tusnàdy und Simon, 1998; Tusnàdy und Simon, 2001), TMHMM (Sonnhammer et al., 1998; Moller et al., 2001; Krogh et al., 2001), SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004) und NCBI conserved domains BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blst.cgi).

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die cDNA Sequenz der B-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors *unc-49* von *T. canis* vollständig identifiziert und für "rescue" Experimente in *C. elegans* genutzt werden. Es wurde die Empfindlichkeit von *C. elegans unc-49* "loss of function" Stämmen gegenüber dem Anthelminthikum Emodepsid mit der Empfindlichkeit des *C. elegans* N2-Wildtyps verglichen. Die unterschiedlichen Reaktionen der im GABA_A-Rezeptor genetisch veränderten *C. elegans* Stämme und des Wildtyps gegenüber Emodepsid wurden in verschiedenen Assays untersucht. Abschließend sollten die Beobachtungen aus den Assays in einem "rescue" Experiment verifiziert werden. Dazu wurde ein Plasmid konstruiert, welches neben einem *C. elegans* Promotor und einer *C. elegans* 3' UTR die B-Untereinheit des *T. canis unc-49* Genes enthielt. Im "rescue" Experiment sollte durch Injektion dieses Plasmidkonstruktes in die Gonaden der *C. elegans* Stämme, welchen die B-Untereinheit des Genes *unc-49* fehlte, der ursprüngliche Emodepsid-empfindliche Phänotyp wieder hergestellt werden.

Des Weiteren wurden im *C. elegans* Entwicklungsassay das Anthelminthikum Tribendimidin und sein Derivat HLR-9291 auf ihre unterschiedliche Wirkung gegenüber N2-Wildtyp *C. elegans* und GABA_A-Rezeptor bzw. Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämmen, getestet. Darüber hinaus wurde ein möglicher Synergismus zwischen Emodepsid und Tribendimidin bzw. HLR-9291 überprüft.

Im Folgenden sollen nun zunächst die Ergebnisse der Farbstoff-, Bewegungs- und Entwicklungsassays zur Emodepsidempfindlichkeit von *C. elegans unc-49* "loss-of-function" Stämmen vorgestellt werden. Anschließend folgen die Ergebnisse zur Wirkung von Tribendimidin, HLR-9291 und weiterer getesteter Substanzen, wie Piperazin, auf verschiedene genetisch veränderte *C. elegans* Stämme, sowie die Daten zum Verhalten der Anthelminthika unter dem Aspekt von Wechselwirkungen wie z. B. Synergismus. Schließlich wird die identifizierte *unc-49B* Sequenz von *T. canis* vorgestellt und ihre Verwendung im "rescue" Experiment dokumentiert.

4.1 *Caenorhabditis elegans* Assays mit lebend-tot Farbstoffen

C. elegans Assays mit Farbstoffen, welche lebende und tote Zellen unterschiedlich anfärben, sollten etabliert werden, um eine hohe Anzahl von *C. elegans* gleichzeitig testen zu können und so eine quantitative Aussage darüber zu ermöglichen, wie sich die Reaktion des Wildtyps auf Emodepsid von der der GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme unterscheidet.

4.1.1 MTT-Assay

MTT wird in lebenden Zellen zu Formazan umgesetzt, was mit einem Farbumschlag von gelb zu braun einhergeht. Anhand einer OD Messung bei 575 nm sollte dann der Formazananteil bestimmt werden und somit der Prozentsatz an lebenden Nematoden. Zur Überprüfung der Methode wurde der Versuch zunächst mit *E. coli* OP50 aus einer Übernachtskultur durchgeführt. Die Messergebnisse sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Es wird deutlich, dass der Versuch mit den Bakterien erfolgreich verlief. Es ist ein deutlicher Unterschied in der Formazanproduktion zwischen der Kontrolle ohne Bakterienzellen, toten Bakterienzellen und den lebenden Bakterien der Bakteriensuspension zu erkennen. Die OD₅₇₅ Werte in der Bakteriensuspension liegen bis zu dreizehnmal höher als in der Kontrolle ohne Bakterien und bei toten Zellen. Weiterhin war ein deutlicher Farbumschlag von gelb zu braun in den Ansätzen mit der Bakteriensuspension zu erkennen. Auch sind die Ergebnisse aus den Doppelansätzen der Bakterienkultur alle sehr ähnlich, was auf gute Reproduzierbarkeit und geringe Schwankungen hindeutet.

	OD ₅₇₅	OD ₅₇₅ abzüglich Leerwert	Standardabweichung
Kontrolle ohne Bakterien	0,1285	0	0,005
abgetötete Bakterien	0,133	0,0015	0,009
Bakteriensuspension 1	1,692	1,564	0,1
Bakteriensuspension 2	1,678	1,55	0,01

Tab. 4.1: OD₅₇₅ Messungen einer *E. coli* OP50 Übernachtskultur im MTT-Assay, Mittelwerte aus 2-fach-Ansatz. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt (Bakteriensuspension 1 und 2).

Anschließend wurde der Versuch mit *C. elegans* N2-Wildtyp-Nematoden und dem *C. elegans unc-49* "loss of function" Stamm CB 382 (im Folgenden bezeichnet als: *unc-49* 382) wiederholt. Eine unsynchronisierte Kultur wurde durch Waschen von ihrer Bakteriennahrung getrennt und in den Assay eingesetzt. In Abbildung 4.1 ist ein Bild der N2-Wildtyp *C. elegans* nach der Inkubation mit MTT zu sehen. Es sind

deutlich die braunen Nematoden, in welchen MTT zu Formazan umgesetzt wurde, von den weißen Nematoden zu unterscheiden, in denen kein Umsatz zu Formazan stattfand.

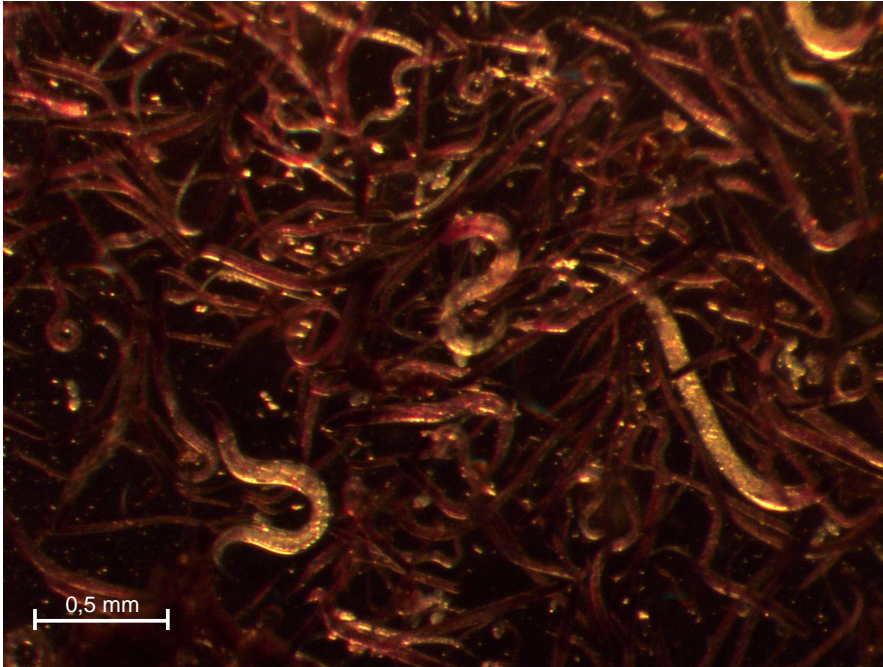


Abb. 4.1: *C. elegans* N2-Wildtyp nach 24 h Inkubation mit MTT. In den Zellen lebendiger Würmer wurde MTT in das braune Formazan umgesetzt, die Nematoden erscheinen braun bis rötlich, tote Würmer oder leere Hüllen blieben weiß.

In Abbildung 4.2 und Tabelle 4.2 sind die Messergebnisse aus dem MTT-Assay mit Nematoden gezeigt. Es wird deutlich, dass die OD_{575} Werte wesentlich niedriger liegen als beim Versuch mit den Bakterien. Außerdem können keine ähnlich hohen OD_{575} Werte gemessen werden wie sie in einer anderen Studie für *C. elegans* beschrieben sind. Bei James und Davey (2007) ist für nur 100 *C. elegans* erste Larven ein OD_{575} Wert im MTT-Assay von 0,6 beschrieben. Dies konnte hier nicht erreicht werden. Bei 50 eingesetzten N2-Wildtyp *C. elegans* ist kaum ein Unterschied zur Kontrolle ohne Nematoden auszumachen. Nach Abzug des OD_{575} Wertes der Kontrolle ohne Nematoden bleibt nur ein OD_{575} Wert von 0,065 für 50 N2-Wildtyp *C. elegans* und 0,044 für den Stamm *unc-49 382*. Der Unterschied zur Kontrolle ohne Nematoden ist nicht signifikant ($p < 0,24$ bzw. $p < 0,287$). Beim Einsatz von 250 N2-Wildtyp *C. elegans* sind die OD_{575} Messwerte immer noch wesentlich geringer als von James und Davey (2007) publiziert. Nach Abzug des OD_{575} Wertes der Kontrolle ohne Nematoden bleibt beim N2-Wildtyp

noch ein OD_{575} Wert von 0,111 übrig. Der Unterschied zur Kontrolle ohne Nematoden ist für 250 eingesetzte *C. elegans* N2-Wildtyp allerdings signifikant ($p < 0,048$). Dies trifft jedoch nicht auf den *C. elegans* Stamm *unc-49 382* zu. Der OD_{575} Wert nach Abzug des Wertes für die Kontrolle ohne Nematoden liegt für den Stamm *unc-49 382* bei 0,115 und ist nicht signifikant unterschiedlich zum OD_{575} Wert der Kontrolle ohne Nematoden ($p < 0,086$). Erst ab 500 Individuen kann eine OD_{575} von 0,277 für den N2-Wildtyp und 0,232 für den *C. elegans* Stamm *unc-49 382* nach Abzug des OD_{575} Wertes der Kontrolle ohne Nematoden erreicht werden. Also etwa die Hälfte des OD_{575} Wertes der von James und Davey (2007) mit nur 100 Nematoden publiziert wurde. Der Unterschied zur Kontrolle ist bei 500 eingesetzten Nematoden für den Stamm *unc-49 382* signifikant ($p < 0,03$) und für den N2-Wildtyp Stamm höchst signifikant ($p < 0,001$). Selbst bei 1000 eingesetzten Nematoden erreichen die OD_{575} Werte mit 0,481 für den N2-Wildtyp und 0,375 für den Stamm *unc-49 382* nicht das angestrebte Niveau. In früheren Studien anderer Arbeitsgruppen wurden mit dem MTT-Assay durch deutlich weniger Individuen höhere OD Werte hervorgebracht. Dies konnte in unserem Fall nicht einmal mit zehnmal so vielen eingesetzten Nematoden erreicht werden.

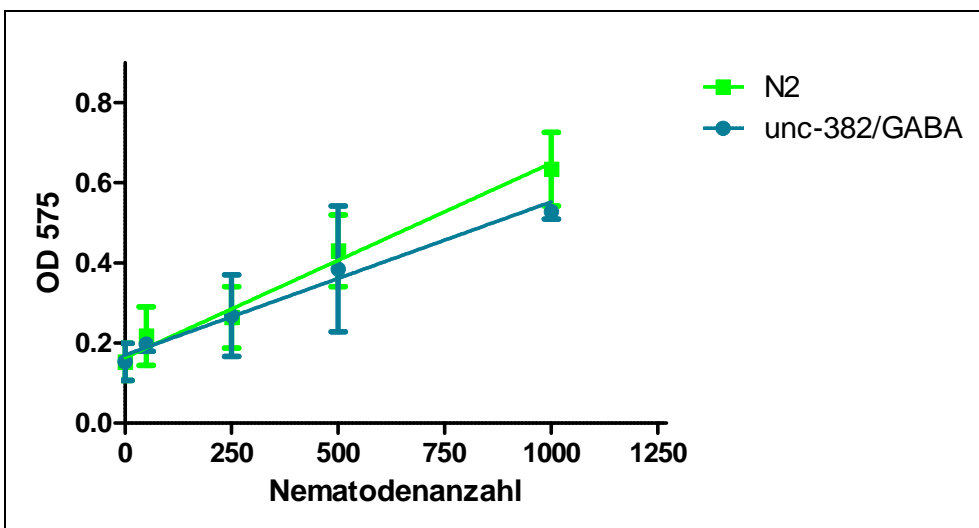


Abb. 4.2: Lineare Regression der eingesetzten Nematodenanzahl und der gemessenen OD_{575} aus dem MTT-Assay. Die Standardabweichung (SD) ist für die einzelnen Mittelwerte eingezeichnet. Die Werte stammen aus zwei Versuchswiederholungen.

	OD ₅₇₅	OD ₅₇₅ abzüglich Leerwert	p-Werte bei Vergleich mit Kontrolle	Standardabweichung	Pearson Korrelationskoeffizient R ²
Kontrolle ohne Nematoden	0,153	0		0,046	
50 N2	0,218	0,065	p<0,24	0,0461	0,8488
250 N2	0,264	0,111	p<0,048	0,0767	
500 N2	0,430	0,277	p<0,001	0,0893	
1000 N2	0,634	0,481	p<0,001	0,0919	
50 <i>unc-49 382</i>	0,197	0,044	p<0,287	0,0177	0,6706
250 <i>unc-49 382</i>	0,268	0,115	p<0,086	0,102	
500 <i>unc-49 382</i>	0,385	0,232	p<0,03	0,157	
1000 <i>unc-49 382</i>	0,528	0,375	p<0,001	0,0177	

Tab. 4.2: OD₅₇₅ Messwerte von 50-1000 *C. elegans* Wildtyp (N2) und 50-1000 GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* im MTT-Assay. Angegeben sind Standardabweichungen, p-Werte und der Pearson Korrelationskoeffizient R², der sich aus Abbildung 4.2 ergibt.

Es wurde daraufhin ein Fehler im Versuchsansatz vermutet. Nach Rücksprache mit der Arbeitsgruppe, welche den Assay publiziert hatte und bei der der Assay ebenfalls nicht mehr funktionierte, wurde eine Änderung in der MTT-Zusammensetzung seitens der Produktionsfirma als Ursache angenommen (James und Davey, 2009, mündl.). Die hohen benötigten Wurmanzahlen machten den Test unpraktikabel und nicht mehr durchführbar für große Versuchsansätze mit vielen zu untersuchenden Stoffen. Da ein höchst signifikanter Unterschied zur Kontrolle ohne Nematoden für beide Stämme erst ab 500-1000 Nematoden pro Ansatz gefunden werden konnte, wären mehrere 10000 Nematoden pro Experiment benötigt worden. Außerdem zeigten sich wie in Abbildung 4.2 zu sehen teilweise relativ hohe Standardabweichungen was auch dafür spricht, dass die Ergebnisse des Tests sehr schwankend sind. Der Assay ist aus diesem Grund mit MTT als Farbstoff nicht mehr durchführbar. Nachdem auch andere getestete Farbstoffe (WST-1 und Sytox[®] Green) sich nicht als praktikabel in der Anwendung mit Nematoden erwiesen, wurde stattdessen ein *C. elegans* Bewegungsassay etabliert.

4.2 Bewegungsassay

Mit Hilfe des Bewegungsassays sollte eine mögliche Beteiligung des GABA_A-Rezeptors *unc-49* im Emodepsidwirkmechanismus überprüft werden. Dazu wurde die Wirkung des Anthelminthikums Emodepsid auf den *C. elegans*

N2-Wildtyp Stamm und *C. elegans* Stämme, welchen die B-Untereinheit des Genes *unc-49* fehlte, verglichen.

Zunächst wurde das Versuchssystem überprüft, indem der Wildtyp und die im GABA_A-Rezeptor veränderten Stämme im Bewegungsassay mit dem Neurotransmitter GABA und seinem Agonisten Muscimol in Kontakt gebracht wurden. Ergänzend folgte ein Bewegungsassay mit dem Anthelminthikum Piperazin, welches als schwacher GABA-Agonist gilt (Martin, 1985; Martin, 1997). Nach diesen Vorversuchen zur Etablierung des Bewegungsassays folgten schließlich die Versuche mit dem Anthelminthikum Emodepsid.

4.2.1 Etablierung des Bewegungsassays mit dem Neurotransmitter GABA

Der Neurotransmitter GABA bindet im Nervensystem der Nematoden an der neuromuskulären Synapse an den GABA_A-Rezeptor UNC-49 und bewirkt so eine erhöhte Leitfähigkeit für Chloridionen. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Membran und einer postsynaptischen Hemmung, die das Erschlaffen des Muskels bedingt. Auf diese Weise ist GABA für die schlängelnde Fortbewegung der Nematoden mit verantwortlich, da die Muskeln auf beiden Seiten des Körpers abwechselnd angespannt und relaxiert werden müssen. In einer Umgebung, die sehr viel GABA enthält, war also zu erwarten, dass die Nematoden in eine schlaaffe Paralyse fallen, da ihre GABA_A-Rezeptoren permanent durch GABA aktiviert sind. Durch die Zugabe von GABA in den Bewegungsassay sollte überprüft werden, ob der Wildtyp *C. elegans* Stamm anders auf GABA reagiert als die *C. elegans* *unc-49B* "loss of function" Stämme, deren GABA_A-Rezeptor nicht mehr funktionsfähig ist und daher auch nicht von GABA aktiviert werden kann. Es wurde der N2-Wildtyp mit dem *unc-49B* "loss of function" Stamm *unc-49 382* unter GABA Einwirkung verglichen, wie Abbildung 4.3 zeigt.

GABA erwies sich für den Einsatz im Bewegungsassay als ungeeignet. Es konnten nur bei sehr hohen GABA-Konzentrationen zwischen 100 mM und 500 mM überhaupt Hemmungen in der Bewegungsfähigkeit der Nematoden beobachtet werden. Der N2-Wildtyp wird zwar wie erwartet stärker gehemmt als der Stamm *unc-49 382* ohne funktionsfähigen GABA_A-Rezeptor, jedoch war dieser Unterschied aufgrund der hohen Schwankungsbreite der Daten statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Außerdem traten bei den höchsten Konzentrationen auch bei den *C. elegans* aus dem Stamm *unc-49 382* ohne funktionsfähigen GABA_A-

Rezeptor leichte Bewegungshemmungen auf. Es war nicht mit Sicherheit zu bestätigen, ob diese Bewegungshemmungen bei den hohen GABA-Konzentrationen tatsächlich durch die Wirkung des Neurotransmitters verursacht wurden. Alternativ könnte hier schon eine Hemmung durch die hohe Stoffkonzentration im Agar und eine damit verbundene osmotische Belastung vorgelegen haben. Aus diesem Grund wurde der Test zur Etablierung des Assays mit dem potentiellen GABA-Agonisten Piperazin wiederholt (Martin, 1985).

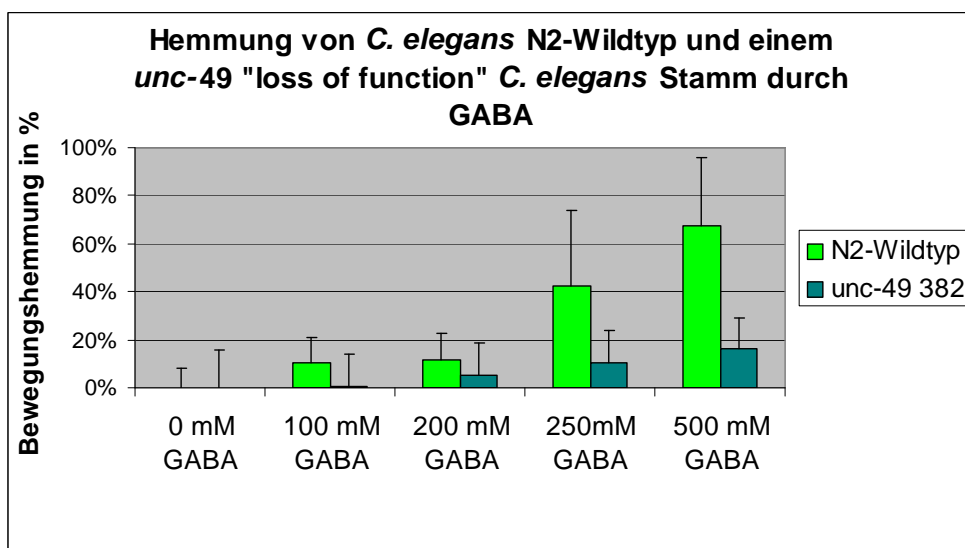


Abb. 4.3: Bewegungshemmung von *C. elegans* Wildtyp (N2-Wildtyp in hellgrün) und einem *C. elegans* *unc-49B* "loss of function" Stamm (*unc-49 382* in dunkelgrün) durch den Neurotransmitter GABA in Prozent. Die Säulen zeigen den Mittelwert für n=10 gezählte Nematoden mit der Standardabweichung (SD) als schwarzem Balken darüber. Der Unterschied zwischen den beiden untersuchten *C. elegans* Stämmen war aufgrund der großen Schwankungsbreite statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.2.2 Etablierung des Bewegungsassays mit dem GABA-agonistischen Anthelminthikum Piperazin

Das Anthelminthikum Piperazin soll als GABA-Agonist auf den GABA_A-Rezeptor wirken und dort ebenfalls wie der Neurotransmitter GABA zu einer schlaffen Paralyse führen. Die Wirkung von Piperazin wird dabei als deutlich schwächer eingestuft, als die von GABA (Martin, 1985). Jedoch konnte das in diesem Versuch nicht bestätigt werden.

Der Bewegungsassay wurde mit dem N2-Wildtyp sowie den beiden GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämmen *unc-49 382* und CB407 (im Folgenden als *unc-49 407* bezeichnet) durchgeführt.

Piperazin zeigte im Gegensatz zu GABA bereits bei 50 mM Konzentration eine starke Wirkung und bei einer Konzentration von 100 mM eine nahezu 100%ige Bewegungshemmung, wie Abbildung 4.4 illustriert. Tatsächlich waren von dieser Bewegungshemmung durch Piperazin sowohl die N2-Wildtyp *C. elegans* als auch die GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme gleichermaßen betroffen, was darauf schließen lässt, dass Piperazin entweder gar nicht oder nur sehr gering auf den GABA_A-Rezeptor wirkt und statt dessen einen anderen Wirkmechanismus besitzt.

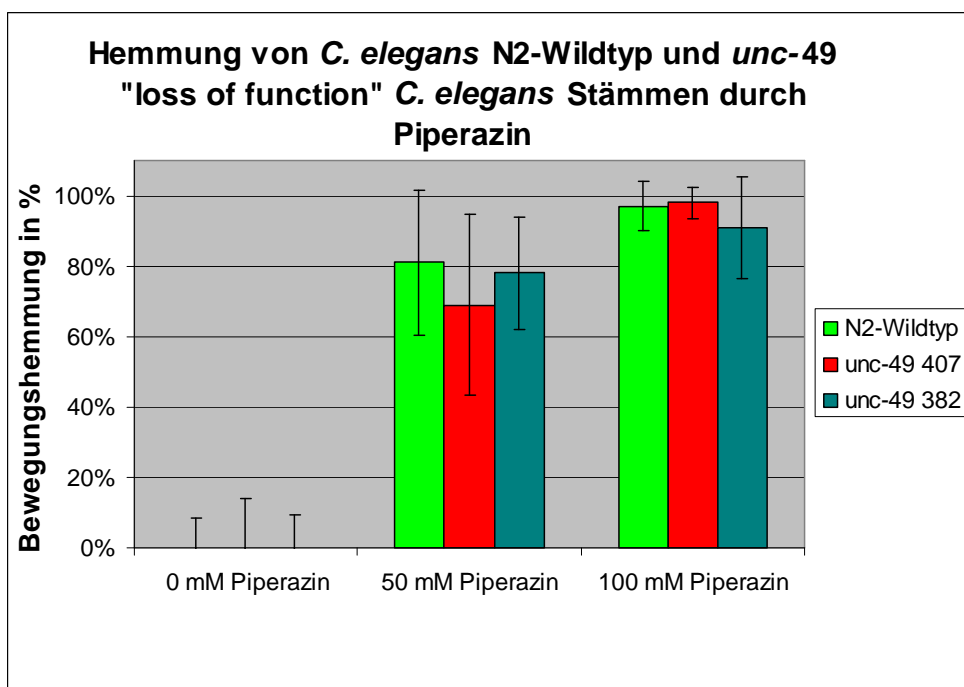


Abb. 4.4: Bewegungshemmung von *C. elegans* Wildtyp (N2-Wildtyp in hellgrün) und *C. elegans* *unc-49B* "loss of function" Stämmen (*unc-49 382* in dunkelgrün, *unc-49 407* in rot) durch das Anthelminthikum Piperazin in Prozent. Die Säulen zeigen den Mittelwert für n=10 gezählte Nematoden mit der Standardabweichung (SD) als schwarzem Balken darüber.

4.2.3 Etablierung des Bewegungsassays mit dem GABA_A-Agonist Muscimol

Der Versuch zur Etablierung des Bewegungsassays wurde daraufhin mit der GABA_A-agonistisch wirkenden Substanz Muscimol wiederholt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.5 und 4.6 dargestellt. Es gibt einen deutlichen Unterschied in der Wirkung von Muscimol auf den *C. elegans* N2-Wildtyp und die GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme. Dies zeigt sich bei einem direkten Vergleich der "body bends" zwischen den Stämmen in Abbildung 4.5. Die ohnehin etwas langsameren *unc-49* Mutanten blieben konstant bei ca. 20 "body

bends" pro Minute über alle Muscimolkonzentrationen hinweg. Die Aktivität der N2-Wildtyp *C. elegans* dagegen, welche unbehandelt ca. 30 "body bends" pro Minute ausführen, sank mit zunehmender Muscimolkonzentration auf nur noch etwa 12 "body bends" pro Minute ab. Auf Grund der unterschiedlichen Ausgangslage der verschiedenen Stämme was ihre Geschwindigkeit betrifft, kann die statistische Signifikanz der Unterschiede in der Reaktion der *C. elegans* auf die Muscimolbehandlung besser in einem Vergleich ihrer prozentualen Bewegungshemmung in Abbildung 4.6 gezeigt werden.

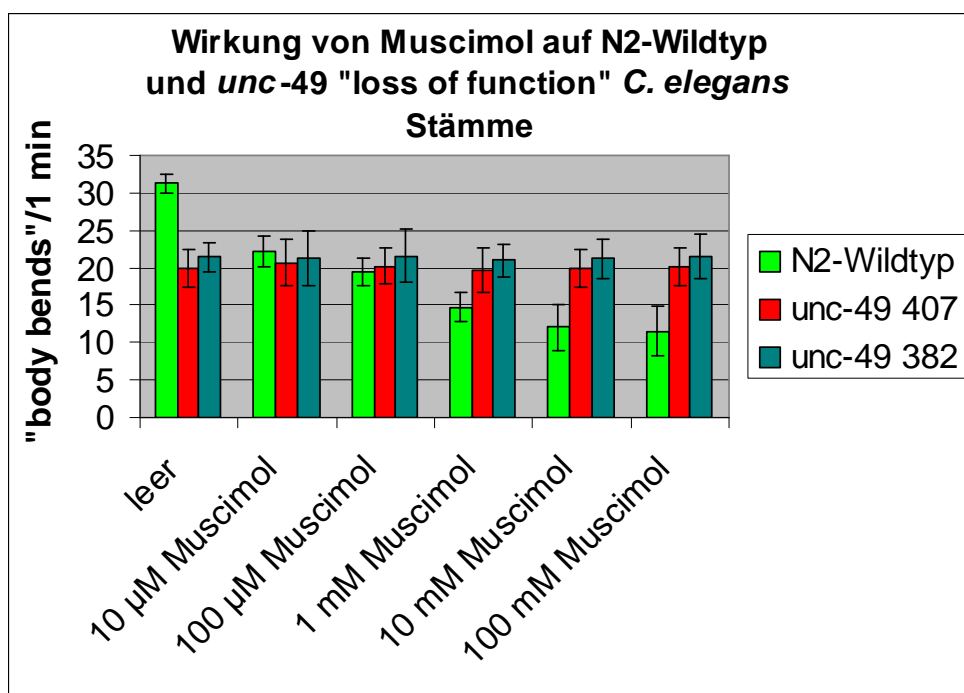


Abb. 4.5: Bewegungshemmung von *C. elegans* Wildtyp (N2-Wildtyp in hellgrün) und *C. elegans* unc-49B "loss of function" Stämmen (*unc-49 382* in dunkelgrün, *unc-49 407* in rot) durch den GABA_A-Agonisten Muscimol in "body bends"/1 min. Die Säulen zeigen den Mittelwert der "body bends"/1 min für n=20 gezählte Nematoden mit der Standardabweichung als schwarzem Balken.

Abbildung 4.6 zeigt die Dosis-Wirkungskurve von Muscimol auf den Wildtyp. Die EC₅₀ liegt für den Wildtypstamm bei 31,23 µM und ist in Tabelle 4.3 aufgeführt. Für die beiden GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme ist durch die fehlende Hemmung keine Dosis-Wirkungskurve und keine EC₅₀ zu berechnen ihre Messpunkte liegen in Abbildung 4.6 in der Nähe des Nullpunktes vor.

Während die Bewegungsfähigkeit des *C. elegans* N2-Wildtyps schon bei niedrigen Konzentrationen von nur 10 µM Muscimol um ca. 30 % vermindert wird, zeigen die Stämme mit fehlendem GABA_A-Rezeptor keine Beeinträchtigung durch Muscimol,

wie in Abbildung 4.6 deutlich zu sehen ist. Bei höheren Muscimolkonzentrationen verringert sich die Bewegungsfähigkeit der Wildtyp-Nematoden um bis zu 63 %, die Stämme mit fehlendem GABA_A-Rezeptor bleiben weiterhin unbeeinflusst. Der Unterschied zwischen N2-Wildtyp und den GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämmen ist an jedem Punkt mit Muscimolbehandlung statistisch hoch signifikant: $p < 0,001$, korrigiert nach Bonferoni: $p < 0,002$.

Mit diesem Ergebnis konnte die Funktionsfähigkeit und erfolgreiche Etablierung des Bewegungsassays gezeigt werden. Der Assay eignet sich zum Vergleich der Wirkung von GABA-ergen Substanzen oder Anthelminthika auf *C. elegans* Stämme mit unterschiedlichen Mutationen und gleichem genetischen Hintergrund und kann deshalb für die Untersuchungen zur Beteiligung des GABA_A-Rezeptors am Emodepsidwirkmechanismus verwendet werden.

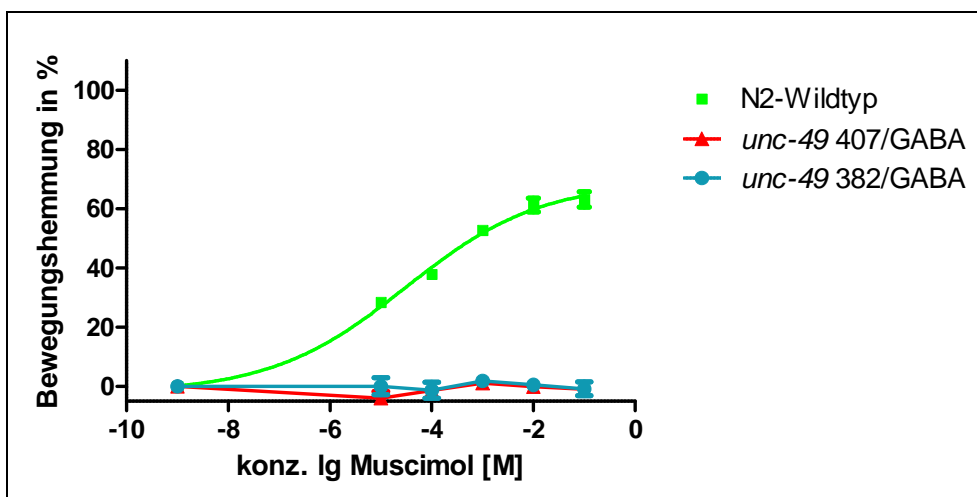


Abb. 4.6: Dosis-Wirkungskurve von Muscimol im Bewegungsassay mit dem N2-Wildtyp Stamm für $n=20$ gezählte Nematoden. Die EC_{50} liegt bei $31,23 \mu\text{M}$. Das Minimum wurde auf 0 % festgesetzt. Das 95 % Konfidenzintervall ist in Tabelle 4.3 angegeben. Der Standardfehler (SEM) ist an der Kurve angegeben. Zusätzlich sind die beiden Stämme *unc-49 407* und *unc-49 382* gezeigt, die nicht durch Muscimol beeinträchtigt werden und daher keine Dosis-Wirkungskurve bilden, sondern als Gerade bei Null vorliegen. Der Standardfehler (SEM) ist an den Punkten angegeben. Der Unterschied zwischen N2-Wildtyp und den GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämmen ist an jedem Punkt mit Muscimolbehandlung statistisch hoch signifikant: $p < 0,001$, korrigiert nach Bonferoni: $p < 0,002$.

	EC_{50}	R^2
N2-Wildtyp	$31,23 \mu\text{M}$ (95 % KI: $14,56-66,96 \mu\text{M}$)	0,9043

Tab. 4.3: EC_{50} Wert des *C. elegans* Wildtyp bei Muscimolbehandlung im Bewegungsassay aus Abbildung 4.6.

4.2.4 Emodepsid im Bewegungsassay mit *C. elegans* Wildtyp und GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans*

Die Ergebnisse aus dem Bewegungsassay mit *C. elegans* Wildtyp und den GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämmen unter Emodepsideinwirkung in absoluten Zahlen sind in Abbildung 4.7 gezeigt. Es ist zu bedenken, dass der Wildtyp schon in der Kontrolle ohne Behandlung etwa um ein Drittel mehr "body bends" pro Minute ausführt. Davon ausgehend sinkt seine Bewegungsfähigkeit unter Emodepsid Einfluß sehr viel stärker ab als die der GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme. Während der Wildtyp von etwa 30 "body bends" pro Minute auf nur noch etwa 2 "body bends" pro Minute unter Einwirkung der höchsten Emodepsidkonzentration von 100 µM abfällt, verringert sich die Bewegungsfähigkeit der GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme nur von ca. 20 "body bends" pro Minute auf ca. 5 "body bends" pro Minute unter Einwirkung der höchsten Emodepsidkonzentration von 100 µM. Der Wildtyp wird durch Emodepsid in seiner Bewegung also stärker beeinträchtigt als die GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme.

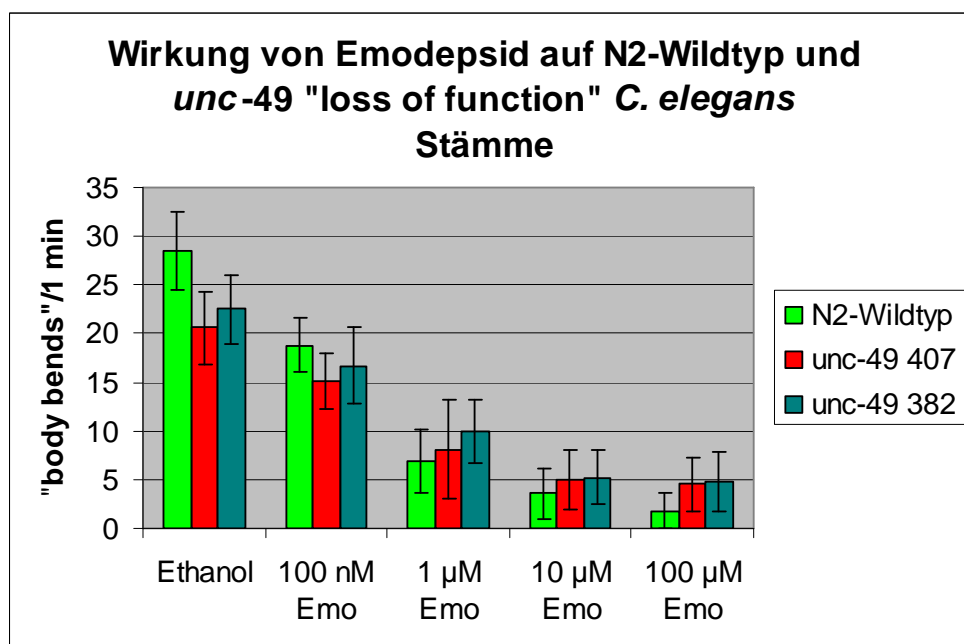


Abb. 4.7: Bewegungshemmung von *C. elegans* Wildtyp (N2-Wildtyp in hellgrün) und *C. elegans* unc-49B "loss of function" Stämme (*unc-49* 382 in dunkelgrün, *unc-49* 407 in rot) durch das Anthelminthikum Emodepsid in "body bends"/1 min, aus fünf Versuchswiederholungen mit jeweils 20 Nematoden pro Stamm. Standardabweichungen sind als schwarze Balken dargestellt.

Beim Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der *C. elegans* Wildtyp und der GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme unter Emodepsid einwirkung in Abbildung 4.8 wird deutlich, dass ein Unterschied zwischen der Wirkung von Emodepsid auf den *C. elegans* N2-Wildtyp und die GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme besteht. Die im GABA_A-Rezeptor *unc-49* veränderten Stämme reagieren eindeutig weniger empfindlich auf Emodepsid als der Wildtyp. Sie sind nicht vollkommen resistent, aber zumindest weniger Emodepsid sensibel als der Wildtyp. Ihre Kurven sind in Abbildung 4.8 deutlich nach rechts verschoben. Dieses Ergebnis kann durch einen Vergleich der EC₅₀ bzw. EC₉₅ Werte in den Tabellen 4.4 und 4.5 bestätigt werden. Der EC₅₀ Wert des Stammes *unc-49 407* liegt ca. 2,5-mal so hoch, der EC₅₀ Wert des Stammes *unc-49 382* sogar mehr als dreimal so hoch wie der EC₅₀ Wert des Wildtyps. Diese Unterschiede sind hoch signifikant ($p < 0,002$ bzw. $p < 0,0016$). Beim Vergleich der EC₉₅ Werte wird der Unterschied noch deutlicher. Der EC₉₅ Wert des Stammes *unc-49 407* liegt etwa fünfzigmal höher als der EC₉₅ Wert des Stammes *unc-49 382* und sogar mehr als hundertmal höher als der EC₉₅ Wert des Wildtyps. Diese Unterschiede sind ebenfalls höchst signifikant ($P < 0,0002$).

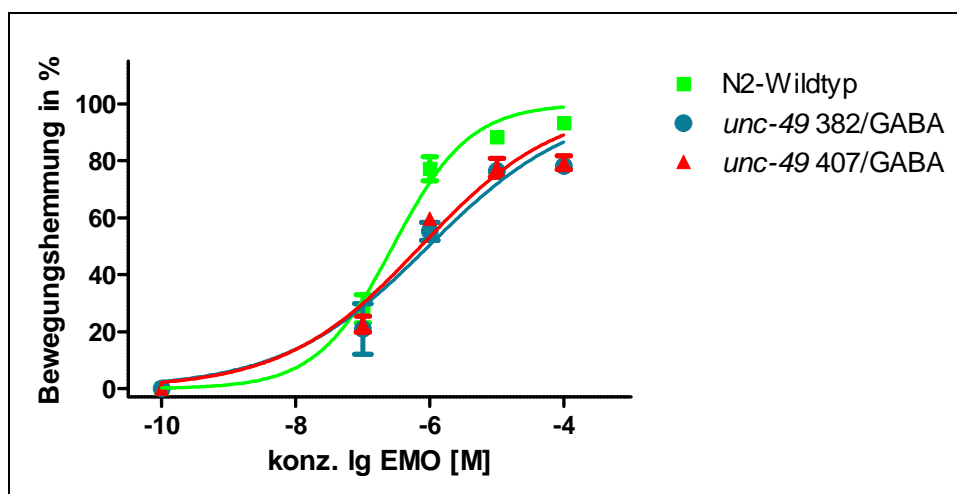


Abb. 4.8: Dosis-Wirkungskurve der Bewegungshemmung von *C. elegans* N2-Wildtyp und *C. elegans* *unc-49B* "loss of function" Stämmen durch das Anthelminthikum Emodepsid in Prozent aus fünf Versuchswiederholungen mit jeweils 20 Nematoden pro Stamm. Das Minimum wurde auf 0 % festgesetzt, das Maximum auf 100 %. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehlern (SEM).

Ergebnisse

	EC ₅₀	p-Werte bei Vergleich mit N2	p-Werte nach Bonferoni Korrektur	R ²	Resistenz Faktor EC ₅₀
N2-Wildtyp	0,283 µM (95 % KI: 0,202-0,397 µM)			0,9729	
<i>unc-49 407</i>	0,738 µM (95 % KI: 0,442-1,232 µM)	p< 0,002	p<0,002	0,9515	2,6
<i>unc-49 382</i>	0,964 µM (95 % KI: 0,515-1,800 µM)	p< 0,0008	p<0,0016	0,9513	3,4

Tab. 4.4: Vergleich der EC₅₀ Werte für die Behandlung von *C. elegans* Wildtyp und *C. elegans* *unc-49B* "loss of function" Stämme *unc-49 382* und *unc-49 407* mit Emodepsid im Bewegungsassay aus der Kurve in Abbildung 4.8. Ein Resistenz Faktor deutlich >1 lässt auf verminderte Wirksamkeit schließen, ein Resistenz Faktor deutlich <1 lässt auf erhöhte Empfindlichkeit schließen.

	EC ₉₅	p-Werte bei Vergleich mit N2	p-Werte nach Bonferoni Korrektur	R ²	Resistenz Faktor EC ₉₅
N2-Wildtyp	13,5 µM (95 % KI: 5,55-32,8 µM)			0,9729	
<i>unc-49 407</i>	719,6 µM (95 % KI: 156-3316 µM)	p< 0,0001	p< 0,0002	0,9515	53,3
<i>unc-49 382</i>	1480 µM (95 % KI: 239-9170 µM)	p< 0,0001	p< 0,0002	0,9513	109,6

Tab. 4.5: Vergleich der EC₉₅ Werte für die Behandlung von *C. elegans* Wildtyp und *C. elegans* *unc-49B* "loss of function" Stämme *unc-49 382* und *unc-49 407* mit Emodepsid im Bewegungsassay aus der Kurve in Abbildung 4.8.

Während für den Vergleich der EC₅₀ Werte bei der Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 4.8 das Minimum (bei 0 %) und Maximum (bei 100 %) festgelegt wurden, wurde eine weitere Dosis-Wirkungskurve angefertigt bei der nur das Minimum (bei 0 %) festgelegt wurde, um Unterschiede im Maximum vergleichen zu können. Diese Kurve ist in Abbildung 4.9 gezeigt. Während durch diese alternative Kurvenberechnung die Unterschiede in der EC₅₀ etwas geringer ausfallen, wie Tabelle 4.6 zeigt, wird dafür R² bei dieser Kurve deutlich besser. Das heißt die Kurve entspricht eher den Rohdaten als in der ersten Kurvenberechnung. Außerdem zeigen sich hier die gravierenden Unterschiede im Maximum der Kurve deutlicher. Die Wildtyp *C. elegans* zeigen im Bereich der höchsten Konzentrationen eine deutlich stärkere Hemmung, als sie für die GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme verzeichnet werden kann. Wie Tabelle 4.7 zeigt, ist der Unterschied im Höhepunkt statistisch hoch signifikant (p<0,0016 bzw. p<0,0022). Betrachtet man beide hier verglichenen Kurvenparameter, nämlich die EC₅₀ und das Kurvenmaximum gemeinsam, so ist der Unterschied wie Tabelle 4.7 zeigt sogar statistisch höchst signifikant (p<0,0002).

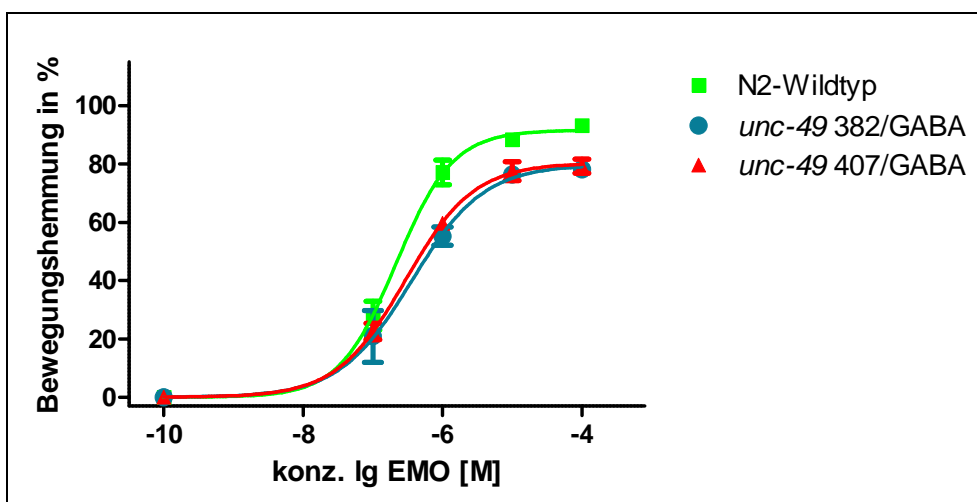


Abb. 4.9: Dosis-Wirkungskurve der Bewegungshemmung von *C. elegans* Wildtyp und *C. elegans* *unc-49*B "loss of function" Stämme durch das Anthelminthikum Emodepsid in Prozent aus fünf Versuchswiederholungen mit jeweils 20 Nematoden pro Stamm. Das Minimum wurde auf 0 % festgesetzt, das Maximum wurde nicht festgelegt. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehlern (SEM).

	EC ₅₀	p-Werte bei Vergleich mit N2	p-Werte nach Bonferoni Korrektur	R ²	Resistenz Faktor EC ₅₀
N2-Wildtyp	0,215 µM (95 % KI: 0,163-0,284 µM)			0,9847	
<i>unc-49 407</i>	0,294 µM (95 % KI: 0,217-0,397 µM)	p< 0,0868	p<0,0868	0,9847	1,4
<i>unc-49 382</i>	0,360 µM (95 % KI: 0,243-0,532 µM)	p< 0,1273	p<0,2546	0,9829	1,7

Tab. 4.6: Vergleich der EC₅₀ Werte für die Behandlung von *C. elegans* Wildtyp und *C. elegans* *unc-49*B "loss of function" Stämme *unc-49 382* und *unc-49 407* mit Emodepsid im Bewegungsassay, aus der Kurve in Abbildung 4.9.

	Maximale Hemmung	p-Werte bei Vergleich mit N2	p-Werte nach Bonferoni Korrektur	R ²	p-Werte bei Vergleich mit N2 in EC ₅₀ und Höhepunkt	p-Werte nach Bonferoni Korrektur
N2-Wildtyp	91 % (95 % KI: 87,4 %-95,8 %)			0,9847		
<i>unc-49 407</i>	80 % (95 % KI: 76,3 %-84,5 %)	p<0,0008	p<0,0016	0,9847	p<0,0001	p<0,0002
<i>unc-49 382</i>	79 % (95 % KI: 74,8 %-84,8 %)	p<0,0022	p<0,0022	0,9829	p<0,0001	p<0,0002

Tab. 4.7: Vergleich der maximalen Hemmung bei der Behandlung von *C. elegans* Wildtyp und *C. elegans* *unc-49*B "loss of function" Stämme *unc-49 382* und *unc-49 407* mit Emodepsid im Bewegungsassay aus der Kurve in Abbildung 4.9.

Noch deutlicher wird der Unterschied bei der Betrachtung von Abbildung 4.10. Dort ist die Überlebensrate des Wildtyps im Vergleich mit dem Stamm *unc-49 407* unter Einwirkung von 100 μ M Emodepsid über 24 h aufgetragen. Tote Nematoden sind von Lebenden dadurch zu unterscheiden, dass sie aufgeplatzt sind, unbeweglich sind oder sich bereits zersetzen (Autolyse). Noch lebende Würmer zeigen eine Reaktion, wie etwa ein Zucken oder leichtes Schlängeln bei Berührung mit einer Präpariernadel.

Es ist deutlich zu sehen, dass bei dieser hohen Emodepsidkonzentration noch wesentlich mehr GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* als Wildtyp *C. elegans* leben. Während die GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* zu 100 % bei dieser Konzentration überleben, ist die Hälfte der Wildtyp-Nematoden abgestorben. Der Unterschied zwischen den beiden Stämmen ist statistisch höchst signifikant ($p < 0,001$). Man kann also von einer deutlichen Reduktion der Emodepsidempfindlichkeit der GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme gegenüber dem Wildtyp sprechen.

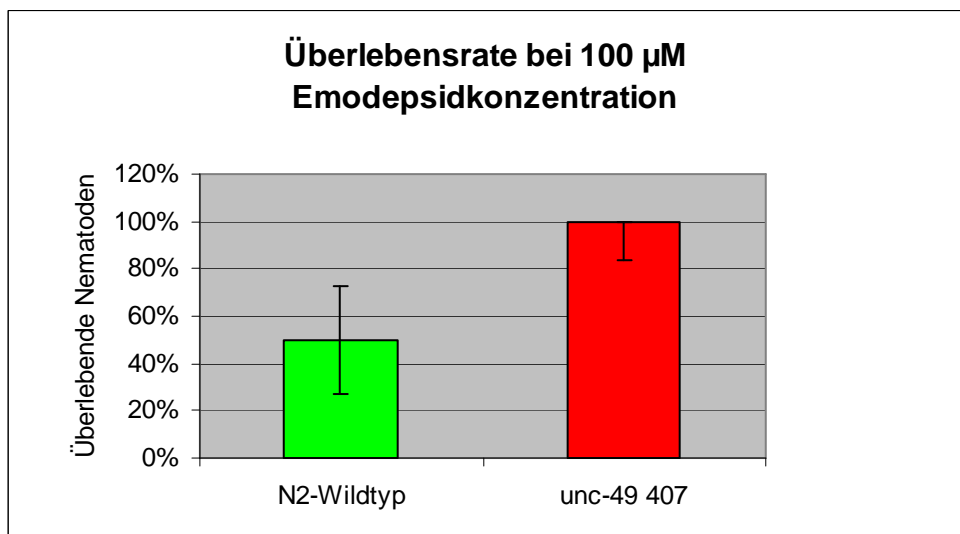


Abb. 4.10: Überlebensrate von *C. elegans* Wildtyp (N2-Wildtyp in hellgrün) und *C. elegans unc-49B* "loss of function" Stamm (*unc-49 407* in rot) unter Einfluss von 100 μ M Emodepsidkonzentration über 24 h mit $n=20$ Nematoden pro Stamm. Als schwarze Balken angegeben ist das 95 % Konfidenzintervall (95 % KI: N2: 27,2 %-72,8 %, *unc-49 407*: 83,2 %-100 %). Die Unterschiede in der Überlebensrate wurden mit Hilfe der "Kruskel-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks" in Verbindung mit dem "Dunn's multiple comparison" Test als hoch signifikant zwischen dem Wildtyp und den GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämmen berechnet, ($p < 0,001$).

4.3 *Caenorhabditis elegans* Entwicklungsassay

Im Entwicklungsassay wurde die Entwicklung von der ersten Larve zum Adulten unter der Einwirkung verschiedener Anthelminthika konzentrationsabhängig an *C. elegans* untersucht. Es wurden die bereits im Bewegungsassay verwendeten Substanzen Piperazin, Muscimol und Emodepsid getestet, sowie zwei zusätzliche Anthelminthika, Tribendimidin und sein Derivat HLR-9291. Diese sollten auch auf einen möglichen Synergismus mit Emodepsid untersucht werden. Der Entwicklungsassay wurde mit dem bereits im Bewegungsassay verwendeten Wildtyp *C. elegans* Stamm N2, sowie den *unc-49* GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämmen durchgeführt. Zusätzlich wurden noch weitere Stämme mit Mutationen getestet: der vollständig Emodepsid-resistente *slo-1*-defekte Stamm *slo-1 js379*, sowie vier Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" Stämme, *unc-38*, *unc-63*, *lev-8* und *lev-1*, welche resistent gegen Tribendimidin und HLR-9291 sind. Es sollte noch ein fünfter Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" Stamm mitgetestet werden, *unc-29*, jedoch gelang es nicht, diesen reproduzierbar zu synchronisieren. Die Larven überlebten das Synchronisieren entweder gar nicht, oder sie starben während des Experimentes auch in den unbehandelten Kontrollen. Deshalb war dieser *C. elegans* Stamm für den Entwicklungsassay ungeeignet und wurde aus dem Versuch ausgeschlossen.

Neben der Reaktion der einzelnen *C. elegans* Stämme auf die anthelminthischen Wirkstoffe konnten auch interessante Wechselwirkungen zwischen den Substanzen und den *C. elegans* Stämmen identifiziert werden, wie z. B. Anzeichen für "negative cross resistance".

4.3.1 Wirkung von Piperazin im Entwicklungsassay

Piperazin zeigte im Entwicklungsassay bei fast allen untersuchten *C. elegans* Stämmen über einen weiten Konzentrationsbereich (100 µM, 1 mM, 10 mM Piperazinkonzentration) keine oder nur geringe Wirkung. Erst bei der höchsten Konzentration von 100 mM konnte eine Wirkung erzielt werden, allerdings starben alle untersuchten *C. elegans* Stämme bei dieser Konzentration sofort vollständig ab. Dies ist auch im Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 4.11 zu erkennen.

Der einzige Stamm, welcher sich anders verhielt, war die *slo-1* Mutante *slo-1 js379*. Sie ist in Abbildung 4.11 blau markiert. Dieser Stamm wurde schon früher

als die anderen Stämme durch Piperazin gehemmt. Er zeigte bereits deutliche Entwicklungshemmung bei einer Piperazinkonzentration von 10 mM.

Ein Ergebnis aus dem Bewegungsassay konnte bestätigt werden: Obwohl Piperazin auf den GABA_A-Rezeptor wirken soll, konnte kein Unterschied in der Reaktion des Wildtyps und der GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme auf Piperazin festgestellt werden. Wie im Bewegungsassay, wurden sowohl Wildtyp als auch GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme bei einer Konzentration von 100 mM Piperazin vollständig gehemmt. Da, wie auch Abbildung 4.11 verdeutlicht, kein Unterschied in der Reaktion des Wildtyps und aller anderen getesteten Stämme auf Piperazin bestand, mit Ausnahme der *slo-1* Mutante *slo-1 js379*, sind die EC₅₀ und p-Werte nur für den Wildtyp und die *slo-1* Mutante *slo-1 js379* in Tabelle 4.8 gezeigt.

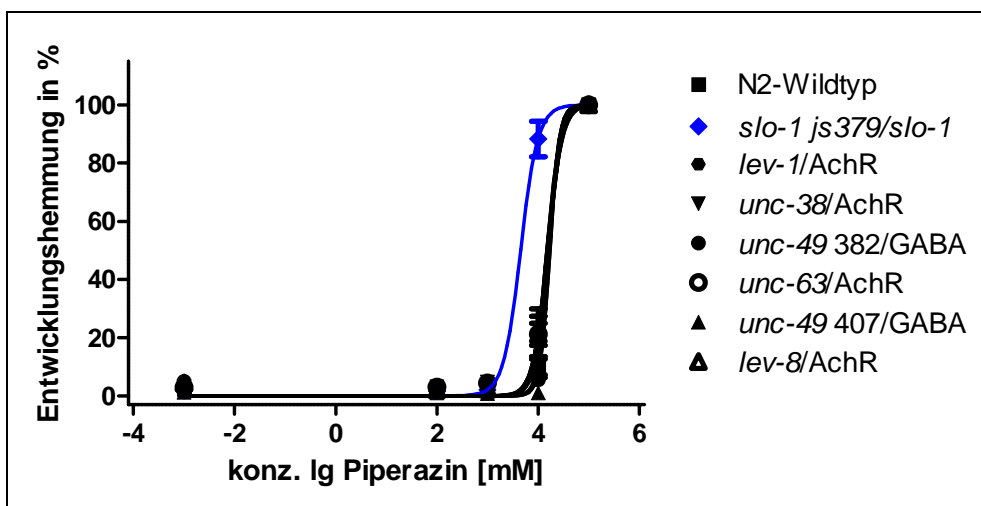


Abb. 4.11: Dosis-Wirkungskurve von Piperazin im Entwicklungsassay mit allen getesteten *C. elegans* Stämmen. In blau hervorgehoben ist der Stamm *slo-1 js379*. Werte aus 9 Versuchswiederholungen mit jeweils ca. 100 Nematoden pro Stamm. Das Minimum wurde auf 0 % festgesetzt, das Maximum wurde auf 100 % festgelegt. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehlern (SEM).

Der starke Unterschied in der Piperazinwirkung auf den Wildtyp und den Emodepsid-resistenten Stamm *slo-1 js379* könnte auf dem Auftreten einer "negative cross resistance" beruhen. Wie Abbildung 4.12 als eine Auswahl aus Abbildung 4.11 noch einmal herausstellt, ist eine deutliche Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve des Stammes *slo-1 js379* im Vergleich zum Wildtyp erkennbar. Der Stamm *slo-1 js379* ist also deutlich empfindlicher gegenüber Piperazin als der Wildtyp. Dies spiegelt auch der Vergleich der EC₅₀ und der Hill-

Steigung in Tabelle 4.8 wieder. Der EC_{50} Wert des Wildtyps liegt mehr als dreimal höher als der EC_{50} Wert für *slo-1 js379*. Allerdings konnte der Wert für die EC_{50} des Wildtyps nicht exakt berechnet werden, da es keine Zwischenwerte in der Kurve gibt, die den Kurvenverlauf zwischen geringer Hemmung und vollständiger Hemmung absichern. Aus diesem Grund ist auch das 95 % Konfidenzintervall für den Wildtyp sehr breit. Trotzdem ist in Kombination mit der Hill-Steigung der Unterschied zwischen Wildtyp und *slo-1 js379* statistisch höchst signifikant ($p < 0,0001$).

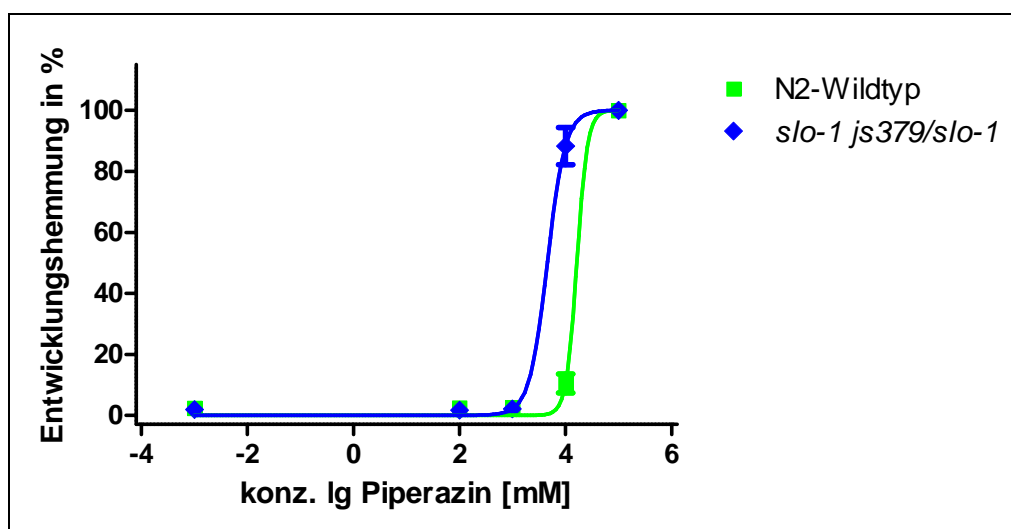


Abb.4.12: Dosis-Wirkungskurve von Piperazin im Entwicklungsassay mit dem Wildtyp Stamm N2 in grün und dem Stamm *slo-1 js379* hervorgehoben in blau. Auswahl aus Abbildung 4.11. Das Minimum wurde auf 0 % festgesetzt, das Maximum wurde auf 100 % festgelegt. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehler (SEM).

	EC_{50}	Hill-Steigung	p-Wert bei Vergleich mit N2 im Kurvenanstieg und EC_{50}	R^2
N2-Wildtyp	16323 μ M (16,323 mM) (95 % KI: 203-1311000 μ M)	4,391 (95 % KI: -34,91-43,69)		0,9858
<i>slo-1 js379</i>	4526 μ M (4,526 mM) (95 % KI: 3074-6662 μ M)	2,551 (95 % KI: 3,738-1,364)	$p < 0,0001$	0,9702

Tab. 4.8: Vergleich der EC_{50} Werte und des Kurvenverlaufs für die Behandlung von *C. elegans* Wildtyp und *C. elegans slo-1 js379* Mutanten mit Piperazin im Entwicklungsassay aus Abbildung 4.12.

4.3.2 Wirkung von Muscimol im Entwicklungsassay

Im Gegensatz zu Piperazin zeigte Muscimol im Entwicklungsassay nicht die gleiche Wirkung wie im Bewegungsassay. Es wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 100 μ M, 1 mM, 10 mM, 100 mM. Die höchste Muscimolkonzentration von 100 mM, welche im Bewegungsassay eine Hemmung von über 60 % beim Wildtyp zur Folge hatte, ließ im Entwicklungsassay die Anzahl an vollständig entwickelten *C. elegans* Wildtyp-Nematoden nur um ca. 50 % absinken. Dies zeigt Abbildung 4.13. Bei niedrigeren Konzentrationen trat nahezu gar keine Wirkung auf. Die Wirkung von Muscimol auf die Entwicklung scheint also geringer zu sein, als die Wirkung auf die Beweglichkeit der Nematoden. Noch deutlicher wird der Unterschied beim Vergleich der EC_{50} Werte. Wie in Tabelle 4.9 zu sehen ist, liegt der Wert für die EC_{50} des Wildtyps im Entwicklungsassay bei 92,911 mM Muscimol. Im Vergleich dazu war im Bewegungsassay nur eine Muscimolkonzentration von 31,23 μ M nötig, um eine 50%ige Bewegungshemmung zu erreichen. Das ist nur etwa ein Tausendstel der EC_{50} aus dem Entwicklungsassay.

Hinzu kommt, dass sich auch die beiden *unc-49* GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme im Entwicklungsassay geringfügig anders verhielten als im Bewegungsassay. Während sie im Bewegungsassay selbst bei den höchsten Konzentrationen vollständig unbeeinflusst von Muscimol reagierten, ist hier eine leichte Beeinträchtigung bei der höchsten Muscimolkonzentration von 100 mM zu beobachten. Dennoch ist die Reaktion weitaus geringfügiger als beim Wildtyp, wie die Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 4.13 zeigt. Der Unterschied in der Reaktion der Stämme auf die höchste Muscimolkonzentration ist zwischen dem N2-Wildtyp und den *unc-49* GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämmen höchst signifikant ($p < 0,001$).

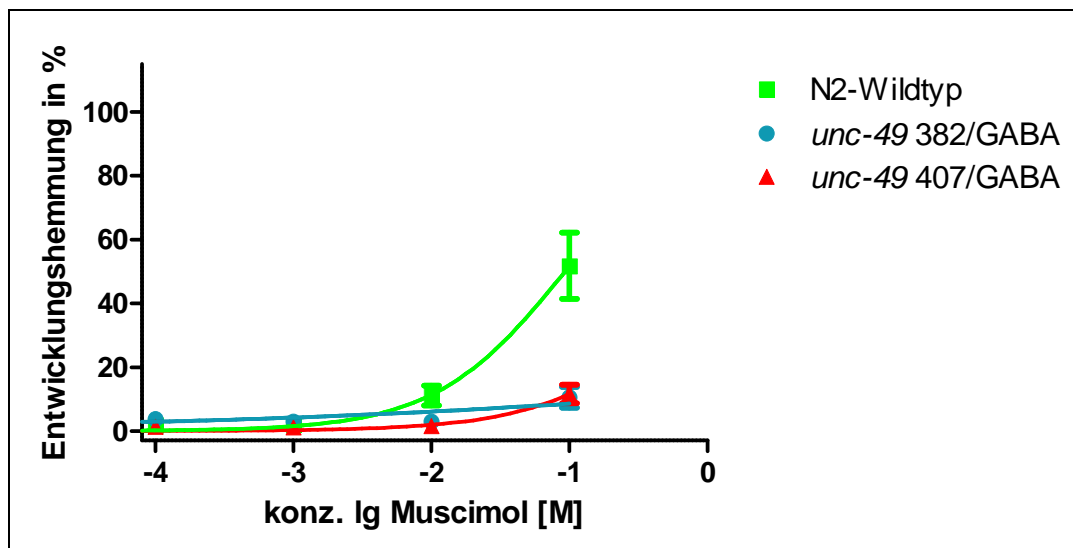


Abb. 4.13: Dosis-Wirkungskurve von Muscimol im Entwicklungsassay mit den *C. elegans* Stämmen N2-Wildtyp, *unc-49 407* und *unc-49 382*. Werte aus 9 Versuchswiederholungen mit jeweils ca. 100 Nematoden pro Stamm. Das Minimum der Kurve wurde auf 0 % festgesetzt, das Maximum der Kurve wurde auf 100 % festgelegt. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehlern (SEM). Die Unterschiede in der Entwicklungshemmung bei der höchsten Konzentration wurden mit Hilfe der "Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks" in Verbindung mit dem "Dunn's multiple comparison" Test als höchst signifikant zwischen dem Wildtyp und den GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämmen berechnet ($p < 0,001$).

	EC ₅₀	R ²
N2-Wildtyp	92911 µM (92,911 mM) (95 % KI: 62160-138874 µM)	0,6585

Tab.4.9: EC₅₀ Wert für die Behandlung von *C. elegans* Wildtyp mit Muscimol im Entwicklungsassay aus Abbildung 4.13.

4.3.3 Wirkung von Emodepsid im Entwicklungsassay

Die Ergebnisse aus dem Bewegungsassay konnten im Entwicklungsassay für Emodepsid bestätigt werden. Wie die Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 4.14 und die Daten in Tabelle 4.10 zeigen, wird der N2-Wildtyp signifikant stärker durch Emodepsid in seiner Entwicklung gehemmt als die beiden *unc-49* GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme *unc-49 382* und *unc-49 407*. Ihre EC₅₀ Werte liegen etwa zwei bzw. dreimal höher als der EC₅₀ Wert des Wildtyps. Dieser Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,0006 höchst signifikant. Es bestätigt sich also, dass die *unc-49* GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Emodepsid zeigen als der Wildtyp, was wiederum eine Beteiligung des GABA_A-Rezeptors im Emodepsidwirkmechanismus nahelegt.

Es ist anzunehmen, dass diese Beteiligung im Vergleich zum SLO-1-Rezeptor vermutlich eher von untergeordneter Bedeutung ist. Wie man in Abbildung 4.14 ebenfalls sieht, zeigt die SLO-1 "loss of function" Mutante *slo-1 js379* eine vollständige Resistenz gegenüber Emodepsid, während die *unc-49* GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme nur eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Emodepsid aufweisen.

Weiterhin fällt auf, dass auch von den Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" Stämmen zwei eine signifikant niedrigere Empfindlichkeit gegenüber Emodepsid aufweisen. Ihr Kurvenverlauf ist in Abbildung 4.15 gezeigt. Beim Stamm *unc-38* ist der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve deutlich nach rechts verschoben im Vergleich zum Wildtyp, die EC₅₀ liegt ebenfalls etwa dreimal höher als beim Wildtyp und der Unterschied ist hoch signifikant ($p < 0,0015$). Ähnliches gilt für den Stamm *lev-1*, der ebenfalls eine Acetylcholin-Rezeptor Mutation aufweist. Auch die Dosis-Wirkungskurve von *lev-1* ist im Vergleich zum Wildtyp stark nach rechts verschoben, der Unterschied der EC₅₀ zum Wildtyp ist sogar höchst signifikant ($p < 0,0006$). Ein weiteres Anzeichen für eine verminderte Wirksamkeit gibt auch der Resistenz Faktor aus Tabelle 4.10, der für *unc-49 382*, *unc-49 407*, *unc-38* und *lev-1* deutlich über 1 liegt.

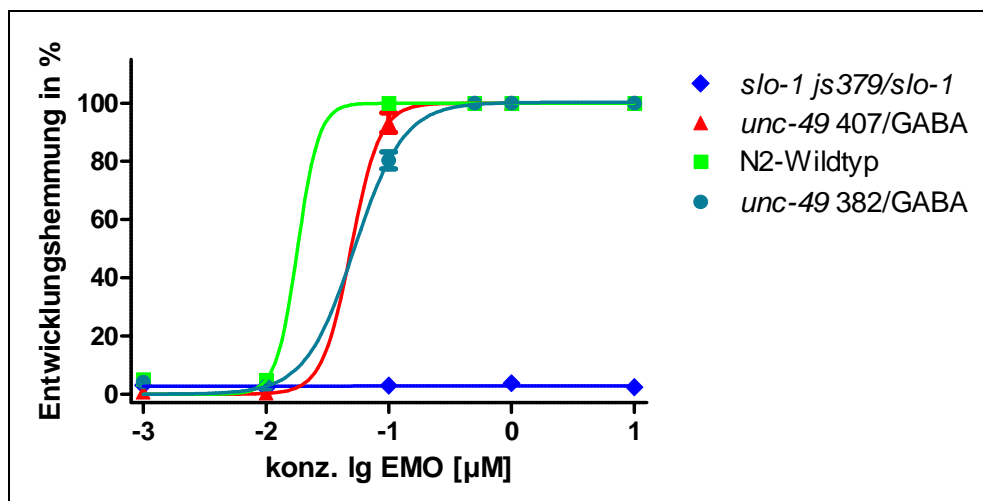


Abb. 4.14: Dosis-Wirkungskurve von Emodepsid im Entwicklungsassay mit den *C. elegans* Stämmen N2, *unc-49 407*, *unc-49 382* und *slo-1 js379*. Werte aus 9 Versuchswiederholungen mit jeweils ca. 100 Nematoden pro Stamm. Das Minimum wurde auf 0 % festgesetzt, das Maximum wurde nicht festgelegt. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehlern (SEM).

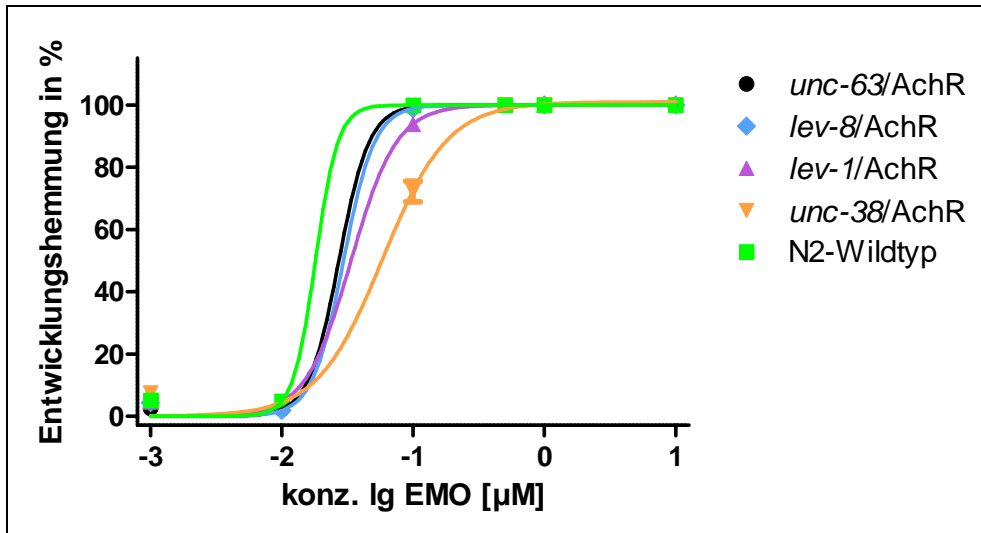


Abb. 4.15: Dosis-Wirkungskurve von Emodepsid im Entwicklungsassay mit den *C. elegans* Stämmen N2, *unc-63*, *lev-8*, *lev-1* und *unc-38*. Werte aus 9 Versuchswiederholungen mit jeweils ca. 100 Nematoden pro Stamm. Das Minimum wurde auf 0 % festgesetzt, das Maximum wurde nicht festgelegt. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehlern (SEM).

	EC ₅₀	p-Werte bei Vergleich mit N2	p-Werte nach Bonferoni Korrektur	R ²	Resistenz Faktor
N2-Wildtyp	0,1804 µM (95 % KI: 0,001148-28,36 µM)			0,9975	1
<i>unc-49 382</i> (GABA)	0,5256 µM (95 % KI: 0,4564-0,6052 µM)	p<0,0001	p<0,0006	0,9923	2,9
<i>unc-49 407</i> (GABA)	0,4926 µM (95 % KI: 0,1904-1,274 µM)	p<0,0001	p<0,0006	0,9920	2,7
<i>lev-1</i> (AchR)	0,3371 µM (95 % KI: 0,3054-0,3722 µM)	p<0,0001	p<0,0006	0,9971	1,9
<i>lev-8</i> (AchR)	0,2953 µM (95 % KI: 0,2101-0,4150 µM)	p<0,3121	p<0,6242	0,9959	1,6
<i>unc-63</i> (AchR)	0,2723 µM (95 % KI: 0,2180-0,3401 µM)	p<0,3758	p<0,6242	0,9989	1,5
<i>unc-38</i> (AchR)	0,5857 µM (95 % KI: 0,5127-0,6691 µM)	p<0,0005	p<0,0015	0,9854	3,2

Tab 4.10: Vergleich der EC₅₀ Werte aller im Entwicklungsassay getesteten Stämme unter Emodepsideinwirkung aus den Abbildungen 4.14 und 4.15.

4.3.4 Wirkung von Tribendimidin im Entwicklungsassay

Tribendimidin zeigte im Entwicklungsassay eine gute Wirksamkeit gegen den Wildtyp, die GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme und die *slo-1* Mutante *slo-1 js379*, deren prozentuale Entwicklungshemmungen in Abbildung 4.16 in verschiedenen Rottönen gezeigt sind. Die Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" Stämme, welche in Abbildung 4.16 durch verschiedene Blautöne gekennzeichnet sind, erwiesen sich als resistent gegenüber Tribendimidin. Sie wurden auch bei

höchsten Konzentrationen gar nicht oder nur sehr gering durch Tribendimidin gehemmt. Auffällig ist, dass die Stämme *lev-1* und *lev-8* etwas mehr in ihrer Entwicklung beeinträchtigt werden als die Stämme *unc-63* und *unc-38*, welche sich als vollständig resistent erwiesen. Der Unterschied bei der höchsten Tribendimidin Konzentration von 1 mM ist zwischen *unc-38* und *lev-8* höchst signifikant ($p < 0,001$), der Unterschied von *lev-1* zu *unc-38* ist ebenfalls höchst signifikant ($p < 0,0001$).

Deutlich ist in Abbildung 4.16 der Unterschied in der Hemmung zwischen dem N2-Wildtyp und den Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" Stämmen zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass der Acetylcholin-Rezeptor tatsächlich eine bedeutende Rolle im Tribendimidinwirkmechanismus spielt. Der GABA_A-Rezeptor wiederum ist für die Tribendimidinwirksamkeit unerheblich, denn die GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme *unc-49 382* und *unc-49 407* werden durch Tribendimidin sogar stärker gehemmt als der Wildtypstamm, der Unterschied ist statistisch höchst signifikant ($p < 0,0003$).

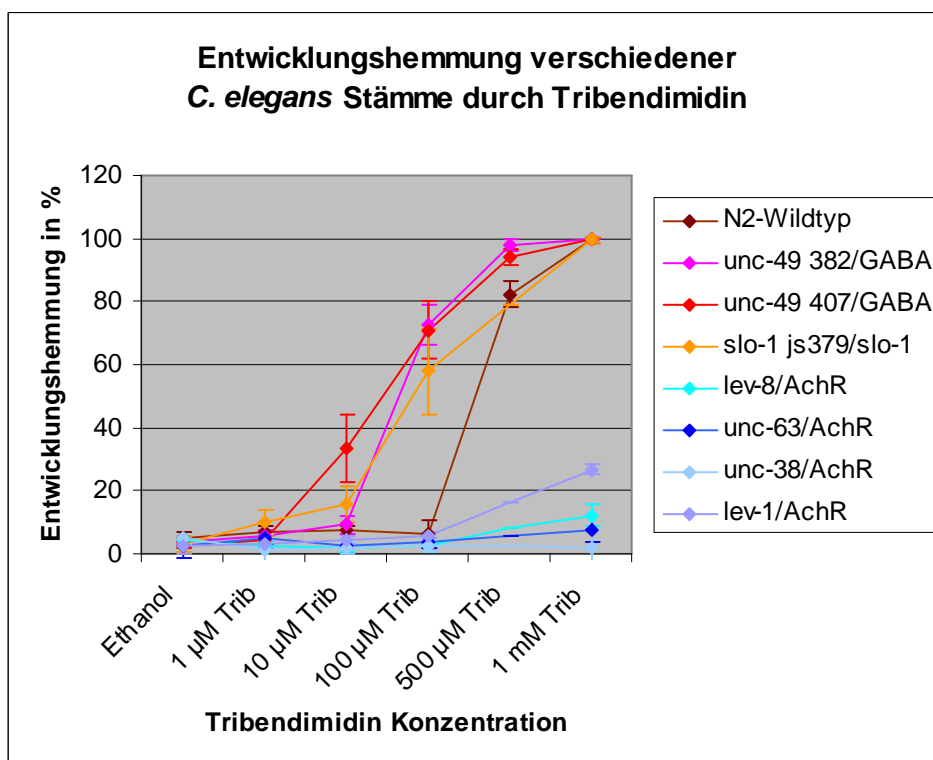


Abb. 4.16: Ergebnisse aller getesteten *C. elegans* Stämme im Entwicklungsassay mit Tribendimidin. Bei der in verschiedenen Blautönen gefärbten Gruppe handelt es sich um die Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" Stämme, die in verschiedenen Rottönen gefärbte Gruppe enthält alle anderen getesteten *C. elegans* Stämme. Mittelwerte aus 9 Versuchswiederholungen mit jeweils ca. 100 Nematoden pro Stamm. Die Balken zeigen die Standardabweichungen (SD).

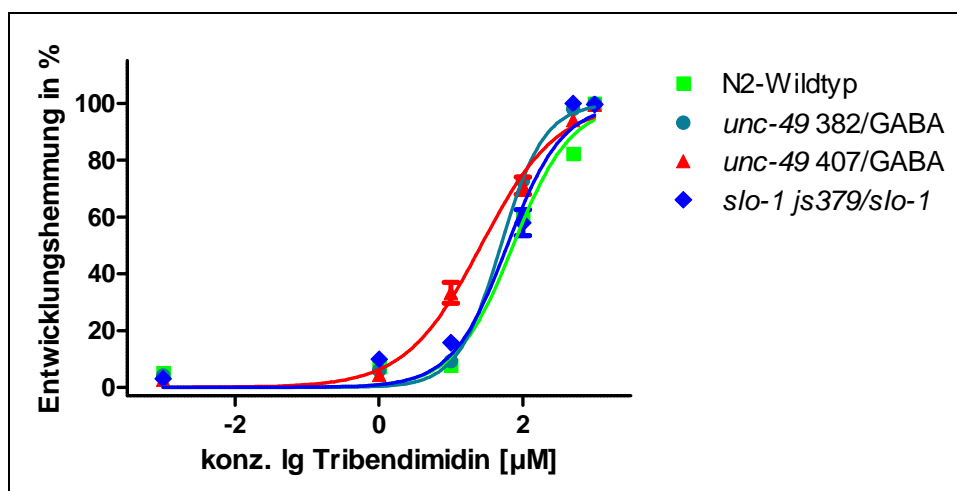


Abb. 4.17: Dosis-Wirkungskurve von Tribendimidin im Entwicklungsassay mit dem Wildtyp, den GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämmen und der *slo-1* Mutante *slo-1 js379*. Werte aus 9 Versuchswiederholungen mit jeweils ca. 100 Nematoden pro Stamm. Das Minimum wurde auf 0 % festgesetzt, das Maximum wurde auf 100 % festgelegt. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehlern (SEM).

Abbildung 4.17 ist ein Auszug aus den Daten aus Abbildung 4.16 in dem die Unterschiede in der Tribendimidinwirkung auf den Wildtyp, die GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme und die *slo-1* Mutante *slo-1 js379* genauer betrachtet werden sollen. Auch hier wird wieder deutlich, dass *C. elegans* Stämme, welche aufgrund einer Mutation eine Resistenz oder Unempfindlichkeit gegenüber einem Anthelminthikum zeigen, dafür möglicherweise sensibler auf einen anderen Wirkstoff reagieren als der Wildtyp. Die gänzlich Emodepsid-resistente *slo-1* Mutante *slo-1 js379*, welche bereits auf Piperazin weitaus sensibler reagierte als der Wildtyp, zeigt auch hier wieder eine leicht erhöhte Sensibilität gegen Tribendimidin im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings ist dieser Unterschied weniger stark ausgeprägt als bei Piperazin, was der Kurvenverlauf in Abbildung 4.17 verdeutlicht. Der Unterschied ist an den EC₅₀ Werten von 73,53 µM für den Wildtyp und 60,93 µM für den *slo-1 js379* Stamm, aus Tabelle 4.11 zwar ersichtlich, jedoch nicht signifikant ($p < 0,1536$). Die GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme *unc-49 382* und *unc-49 407* wiederum reagierten deutlich empfindlicher auf Tribendimidin als der Wildtyp. Während sie gegenüber Emodepsid eine leichte Unempfindlichkeit zeigten, ist ihre Sensibilität gegenüber Tribendimidin signifikant höher als die des Wildtyps, wie in Abbildung 4.17 und Tabelle 4.11 zu sehen ist. Der Unterschied in den EC₅₀ Werten von 73,53 µM für

den Wildtyp, 49,58 μM für den Stamm *unc-49 382* und nur 26,41 μM für den Stamm *unc-49 407* ist statistisch hoch signifikant ($p < 0,003$). Die Acetylcholin-Rezeptor Mutanten wurden in Abbildung 4.17 und Tabelle 4.11 nicht gezeigt, da sie nicht oder nur sehr geringfügig gehemmt werden und daher keine EC_{50} berechnet werden konnte, die mit dem Wildtyp zu vergleichen war.

	EC_{50}	p-Werte bei Vergleich mit N2	p-Werte nach Bonferoni Korrektur	R^2	Resistenz Faktor
N2	73,53 μM (95 % KI: 64,51-83,81 μM)			0,9793	1
<i>unc-382</i> (GABA)	49,58 μM (95 % KI: 44,90-54,76 μM)	$p < 0,0001$	$p < 0,0003$	0,9909	0,6
<i>unc-407</i> (GABA)	26,41 μM (95 % KI: 22,18-31,46 μM)	$p < 0,0001$	$p < 0,0003$	0,9746	0,36
<i>slo-1 js379</i> (<i>slo-1</i>)	60,93 μM (95 % KI: 49,68-74,73 μM)	$p < 0,1536$	$p < 0,1536$	0,9565	0,83

Tab 4.11: Vergleich der EC_{50} Werte des Wildtyps, der GABA_A -Rezeptor "loss of function" Stämme und der *slo-1* Mutante *slo-1 js379* unter Einwirkung von Tribendimidin im Entwicklungsassay, Daten aus Abbildung 4.17.

4.3.5 Wirkung von HLR-9291 im Entwicklungsassay

Die Wirkung von HLR-9291, einem Derivat des Tribendimidin, im Entwicklungsassay ist der Wirkung des Tribendimidins ähnlich, nur insgesamt schwächer ausgeprägt. Wie Abbildung 4.18 deutlich zeigt, sind alle vier Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" Stämme *lev-1*, *lev-8*, *unc-38* und *unc-63* gleichermaßen vollständig resistent gegenüber HLR-9291. Während Tribendimidin noch eine leichte Wirkung gegen die Stämme *lev-1* und *lev-8* zeigte, ist bei HLR-9291 keinerlei Verringerung der Entwicklungsfähigkeit bei allen Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" Stämmen zu beobachten. Auch die Wirksamkeit des HLR-9291 gegenüber dem Wildtyp, sowie den GABA_A -Rezeptor "loss of function" Stämmen *unc-49 382* und *unc-49 407* und der *slo-1* Mutante *slo-1 js379* ist im Vergleich zu Tribendimidin verringert. Während diese vier Stämme durch Tribendimidin bei der höchsten Konzentration von 1 mM vollständig gehemmt wurden, also keine Entwicklung zu Adulten mehr stattfand, ist die Hemmung durch 1 mM HLR-9291 nur etwa halb so stark, es entwickeln sich noch zwischen 40 % und 60 % der Larven zu Adulten.

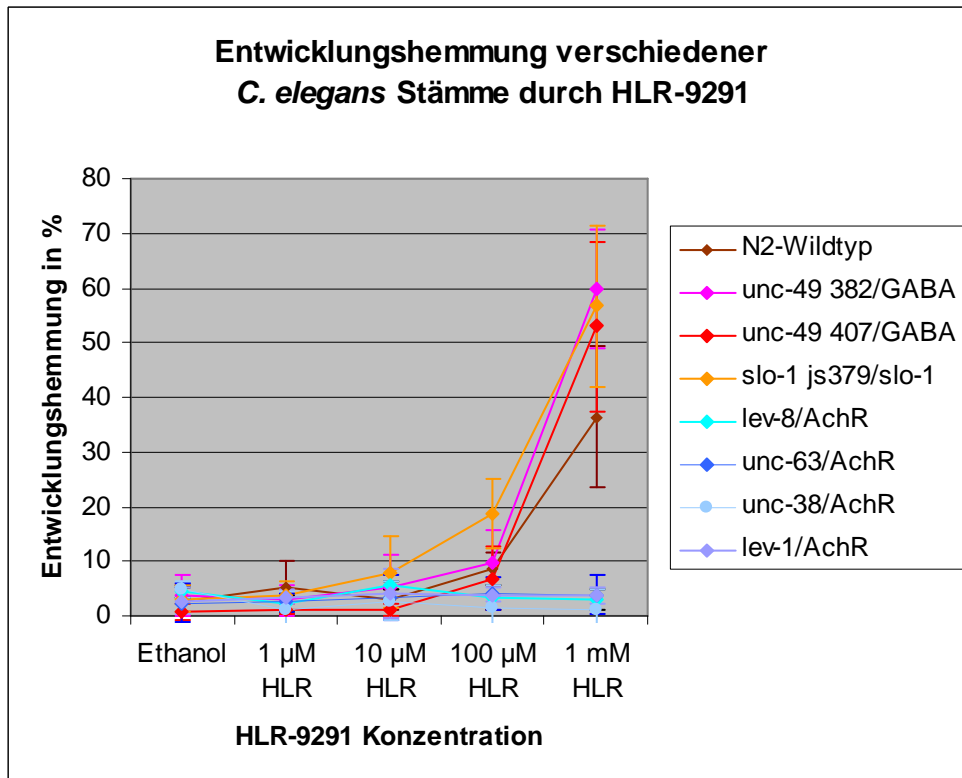


Abb. 4.18: Ergebnisse aller getesteten *C. elegans* Stämme im Entwicklungsassay mit HLR-9291. Bei der in verschiedenen Blautönen gefärbten Gruppe handelt es sich um die Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" Stämme, die in verschiedenen Rottönen gefärbte Gruppe enthält alle anderen getesteten *C. elegans* Stämme. Mittelwerte aus 9 Versuchswiederholungen mit jeweils ca. 100 Nematoden pro Stamm. Die Balken zeigen die Standardabweichungen.

Ganz ähnlich zu den Tribendimidinergebnissen ist allerdings der Unterschied in der Reaktion des Wildtyps und der GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme, sowie der *slo-1* Mutante *slo-1 js379*. Wie die Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 4.19, sowie Tabelle 4.12 zeigen, sind die drei Stämme, welche eine Mutation tragen, die sie gegenüber Emodepsid resistent oder zumindest geringer empfindlich macht, sensibler gegenüber HLR-9291 als der Wildtyp. Die Dosis-Wirkungskurven der drei genetisch veränderten Stämme sind im Vergleich zum Wildtyp deutlich nach links verschoben und bei einem Vergleich der EC₅₀ Werte wird deutlich, dass der Unterschied vom Wildtyp zu allen drei Mutanten höchst signifikant ist ($p < 0,0003$). Während für den Wildtyp eine Konzentration von ca. 2 mM zu einer 50%igen Hemmung führt, reichen für den Stamm *unc-49 407* bereits ca. 0,9 mM aus, also weniger als die Hälfte. Die Stämme *unc-49 382* und *slo-1 js379* werden schon bei einer Konzentration von etwa 0,7 mM zu 50 % in ihrer Entwicklung gehemmt, es reicht also etwa ein Drittel des Wirkstoffes, der für

die 50%ige Hemmung des Wildtyps nötig wäre. Die nötige Konzentration zur 50%igen Hemmung des Wildtyps ist hier mittels Extrapolation geschätzt, da eine 50%ige Hemmung experimentell nicht vollständig erreicht werden konnte. Wie Abbildung 4.18 und 4.19 zeigen, konnte mit der höchsten noch löslichen Konzentration von 1 mM nur etwa eine 40%ige Hemmung beim Wildtyp erreicht werden.

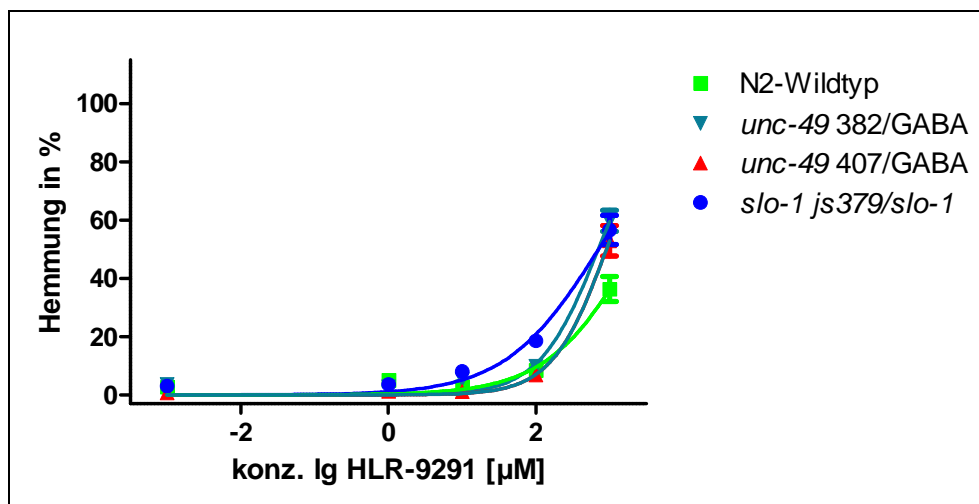


Abb. 4.19: Dosis-Wirkungskurve von HLR-9291 im Entwicklungsassay mit dem Wildtyp, den GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämmen und der *slo-1* Mutante *slo-1 js379*. Werte aus 9 Versuchswiederholungen mit jeweils ca. 100 Nematoden pro Stamm. Das Minimum wurde auf 0 % festgesetzt, das Maximum wurde auf 100 % festgelegt. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehler (SEM).

	EC ₅₀	p-Werte bei Vergleich mit N2	p-Werte nach Bonferoni Korrektur	R ²	Resistenz Faktor
N2	2176 µM (95 % KI: 1428-3316 µM)			0,7779	1
<i>unc-49 382</i> (GABA)	700,3 µM (95 % KI: 593,8-825,8 µM)	<0,0001	<0,0003	0,9115	0,32
<i>unc-49 407</i> (GABA)	906,2 µM (95 % KI: 770,1-1066 µM)	<0,0001	<0,0003	0,8905	0,42
<i>slo-1 js379</i> (SLO-1)	709,1 µM (95 % KI: 533,6-942,4 µM)	<0,0001	<0,0003	0,8641	0,32

Tab. 4.12: Vergleich der EC₅₀ Werte des Wildtyps, der GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme und der *slo-1* Mutante *slo-1 js379* unter Einwirkung von HLR-9291 im Entwicklungsassay aus Abbildung 4.19.

4.3.6 Synergismus

Da möglicherweise Wechselwirkungen zwischen Emodepsid und Tribendimidin bzw. seinem Derivat HLR-9291 bestehen konnten, wie die vielen Fälle potentieller "negative cross resistance" aus den vorhergehenden Tests zeigten, sollten diese Wechselwirkungen näher untersucht werden. Im Fokus stand dabei eine mögliche synergistische Wirkung zwischen Emodepsid und Tribendimidin bzw. HLR-9291, aber auch die Möglichkeit einer antagonistischen Wirkung sollte überprüft werden. Dazu wurden im *C. elegans* Entwicklungsassay verschiedene Emodepsid, Tribendimidin- und HLR-9291-Konzentrationen miteinander kombiniert.

Abbildung 4.20 zeigt eine Untersuchung über Wechselwirkungen zwischen Tribendimidin und Emodepsid, verglichen an den EC_{50} Werten beider Substanzen alleine und in Kombination miteinander im Entwicklungsassay mit *C. elegans* Wildtyp-Nematoden. Bei den Kombinationen wurde so vorgegangen, dass eine Substanz bei nicht voll wirksamer Konzentration konstant gehalten wurde, während für die andere eine Dosis-Wirkungskurve erstellt wurde. Aus dieser wurde dann der entsprechende EC_{50} Wert mit Konfidenzintervall berechnet. Aus Kombinationen mit konstantem Tribendimidin ergeben sich EC_{50} Werte für Emodepsid mit Konfidenzintervall parallel zur Ordinate, aus Kombinationen mit konstantem Emodepsid ergeben sich Tribendimidin EC_{50} Werte mit Konfidenzintervallen parallel zur Abszise.

Die EC_{50} Werte von Emodepsid und Tribendimidin alleine wurden in das Diagramm eingetragen und durch eine Linie verbunden. Die in rot dargestellten EC_{50} Werte aus Versuchen mit beiden Substanzen in Kombination befinden sich in der Nähe dieser Geraden, weichen also nicht stark von ihrem Verlauf ab. Würden sie genau auf der Geraden liegen, wäre von keiner Wechselwirkung zwischen den beiden Substanzen auszugehen. Lägen die Punkte aus den Kombinationsversuchen eher oberhalb der Geraden, würde dies auf Antagonismus zwischen den beiden untersuchten Stoffen hindeuten. Würden die Punkte weit unterhalb der Geraden liegen, wäre dies ein Hinweis auf Synergismus. Im Fall von Tribendimidin und Emodepsid liegen die Punkte alle eher unterhalb der Geraden, was eine Tendenz in Richtung Synergismus ergibt, jedoch schneiden die 95 % Konfidenzintervalle der EC_{50} Werte aus den Kombinationsversuchen alle die Gerade, weshalb der Hinweis auf Synergismus

nicht signifikant ist. Eine klare Wechselwirkung kann nicht identifiziert werden, nur eine leicht synergistische Tendenz, die aber nicht signifikant ist.

In Abbildung 4.21 sind die Ergebnisse aus den Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Emodepsid und HLR-9291 zu sehen. Auch hier liegen die roten EC_{50} Werte aus den Kombinationsversuchen alle in der Nähe der Geraden. Hier allerdings geht die Tendenz eher in Richtung Antagonismus, da die meisten Werte oberhalb der Geraden liegen. Auch diese Tendenz ist jedoch für die meisten Kombinationen nicht signifikant, da die 95 % Konfidenzintervalle der EC_{50} Werte die Gerade schneiden. Nur bei einer Kombination aus 50 nM Emodepsid und 419 μ M Tribendimidin ergibt sich eine leicht antagonistische Tendenz, da das 95 % Konfidenzintervall dieses Punktes die Gerade nicht schneidet. Ein solcher Schnittpunkt wird jedoch nur sehr knapp verfehlt, weshalb auch das nicht als eindeutiger Hinweis für Antagonismus zu werten ist. Insgesamt kann weder Synergismus noch Antagonismus für die kombinierten Substanzen festgestellt werden.

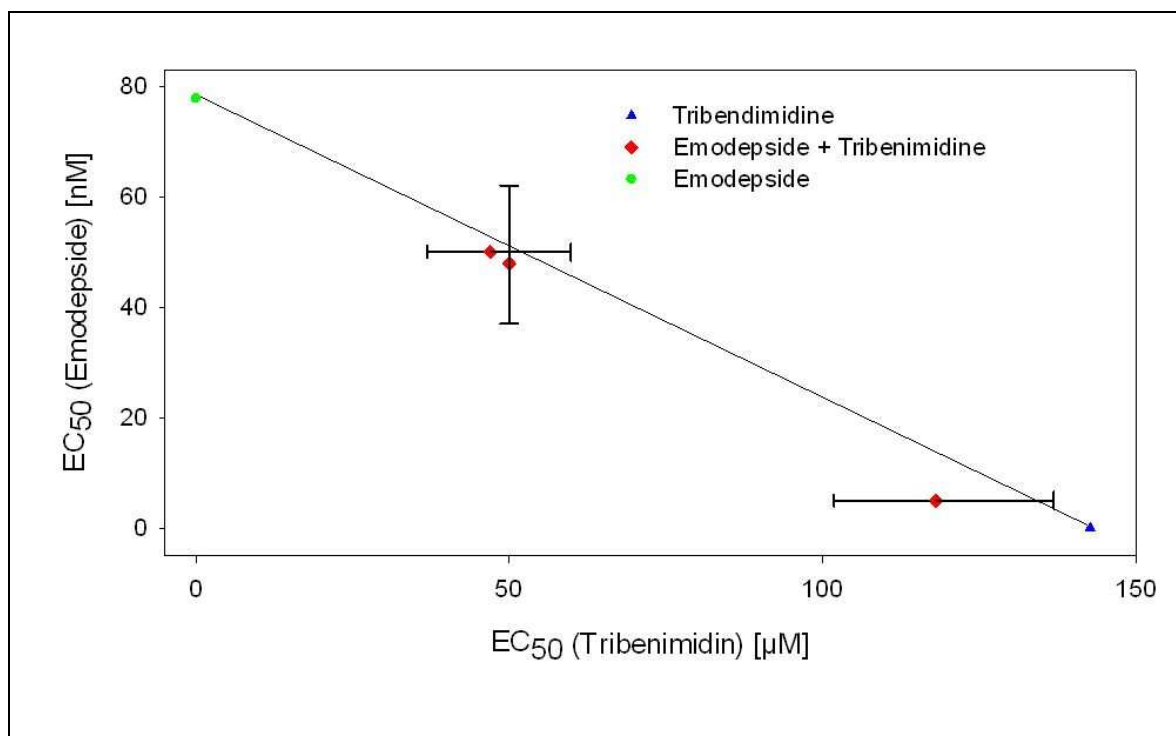


Abb. 4.20: Untersuchung auf Synergismus anhand der EC_{50} Werte von Emodepsid in grün, Tribendimidin in blau und Kombinationen aus beiden Substanzen in rot, im Entwicklungsassay mit *C. elegans* Wildtyp-Nematoden. Als schwarze Balken angegeben sind die 95 % Konfidenzintervalle.

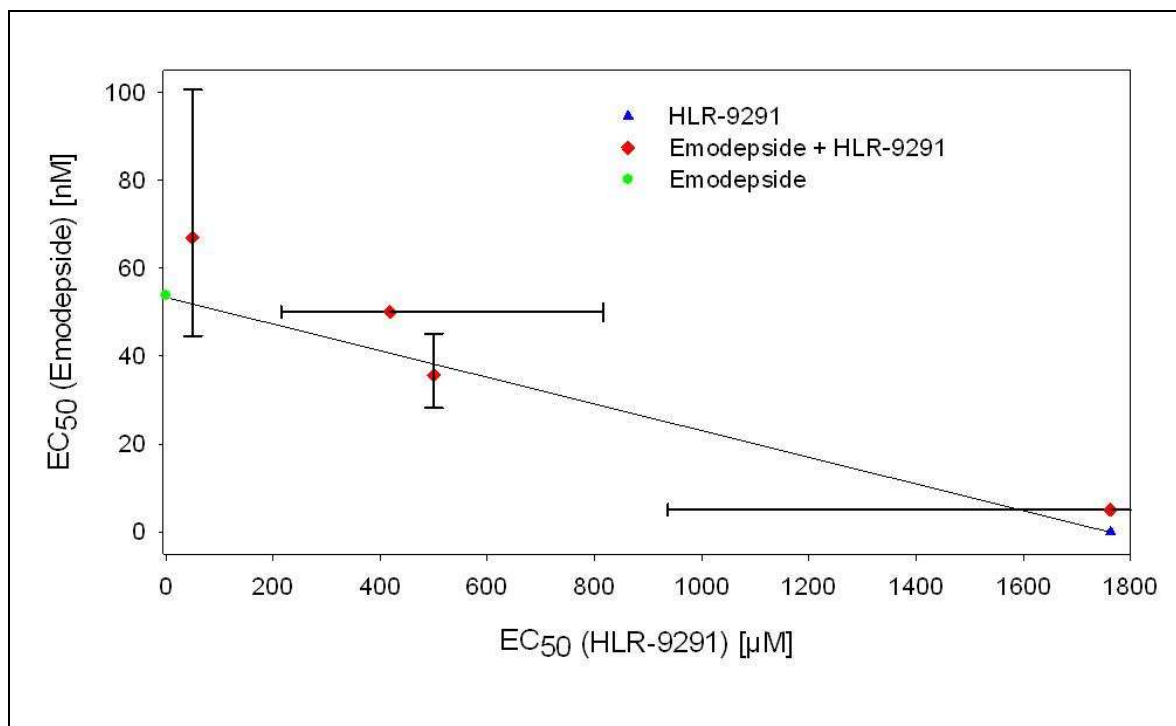


Abb. 4.21: Untersuchung auf Synergismus anhand der EC₅₀ Werte von Emodepsid in grün, HLR-9291 in blau und Kombinationen aus beiden Substanzen in rot, im Entwicklungsassay mit *C. elegans* Wildtyp-Nematoden. Als schwarze Balken angegeben sind die 95 % Konfidenzintervalle.

4.4. Die unc-49B Sequenz von *T. canis*

Um durch ein "rescue" Experiment die Beteiligung des unc-49B GABA_A-Rezeptors im Emodepsidwirkmechanismus endgültig zu beweisen, sollte die vollständige unc-49B cDNA Sequenz von *T. canis* identifiziert werden.

Zur Identifizierung der Sequenz wurden die bereits bekannten GABA_A unc-49B Sequenzen oder Sequenzfragmente von *C. elegans* (Accession number: AF151641), *Caenorhabditis briggsae* (Accession number: XM_002641785) und *Brugia malayi* (Accession number: XP_001894100) aus der Genbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) miteinander verglichen und degenerierte Primer zu besonders konservierten Regionen konstruiert. Mit diesen degenerierten Primern gelang es, ein Stück von ca. 160 bp aus der Mitte der *T. canis* unc-49B Sequenz zu amplifizieren, zu sehen in Abbildung 4.23. Danach konnten von diesem Stück ausgehend spezifische Primer benutzt werden und mit Hilfe der RACE-PCR der übrige Teil der Sequenz amplifiziert werden. In Abbildung 4.22 sind alle Einzel-PCR Schritte, die zu einem gewünschten PCR-Produkt führten, schematisch dargestellt. Zum Schluss wurde die Gesamtsequenz in einem Stück mit sogenannten Vollängen-Primern, welche in der untranslatierten

Region (UTR) lagen, amplifiziert. Die Agarosegelbande, aus welcher die vollständige *T. canis* unc-49B Sequenz isoliert werden konnte, ist in Abbildung 4.23 gezeigt. Die Sequenzen der verwendeten Primer zur Identifizierung der *T. canis* unc-49B Sequenz sind im Anhang unter Punkt 10.1 aufgeführt. In der Gelelektrophoreseaufnahme in Abbildung 4.23 sind außer den Banden der gesuchten Produkte noch weitere Banden von unerwünschten Nebenprodukten zu erkennen. Besonders beim ersten *T. canis* Fragment von 160 bp sind viele Nebenbanden vorhanden. Dies hat seinen Grund darin, dass die Primer für diese PCR degeneriert waren, also aus Primergemischen bestanden, was die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen erhöht. Bei der *T. canis* Vollständigensequenz treten ebenfalls Nebenbanden auf, wenn auch deutlich weniger, hier sind die Primer nicht degeneriert. Die Nebenbanden könnten trotzdem auch hier von unspezifischen Bindungen der Primer im *T. canis* Genom stammen oder es könnte sich um Teile der gewünschten Sequenz handeln, deren Amplifikation vorzeitig abgebrochen wurde, da das gesuchte Produkt recht lang ist.

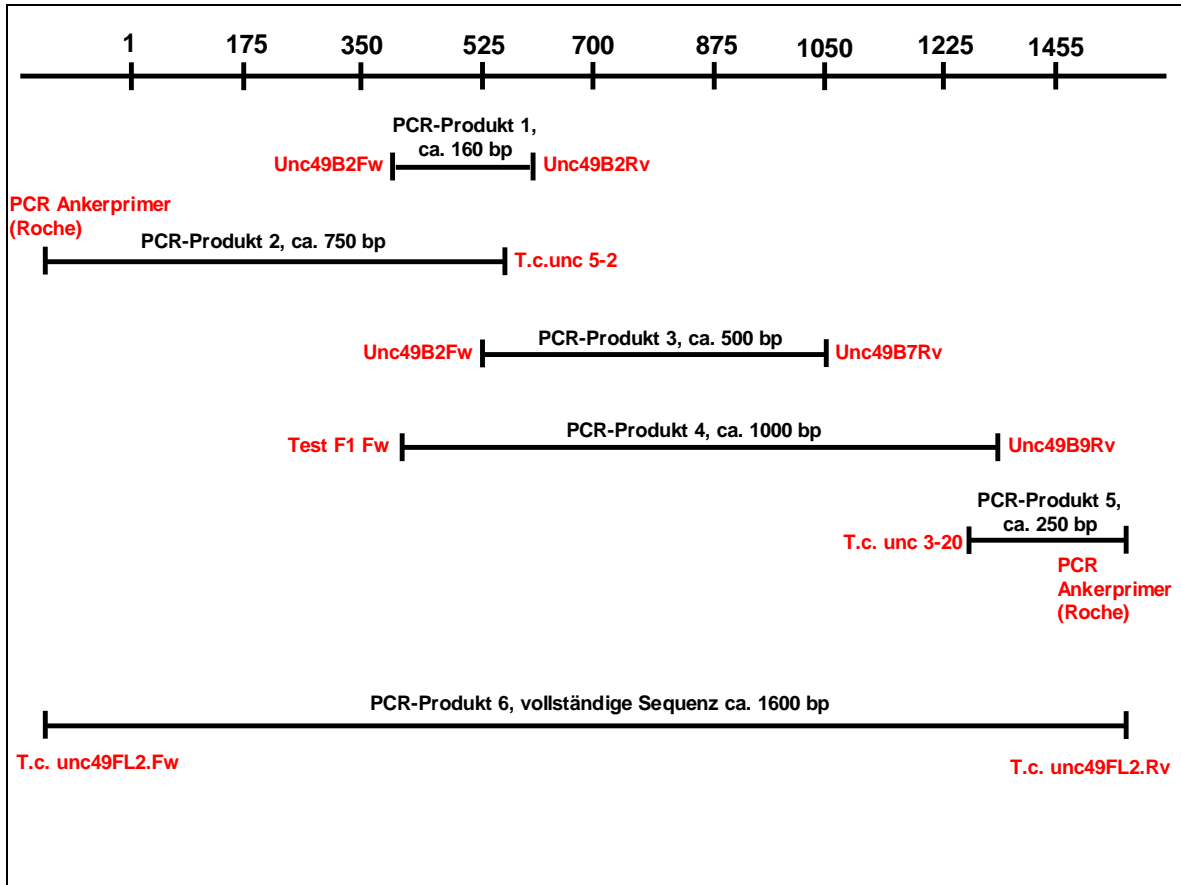


Abb. 4.22: Schematische Darstellung der PCR-Reaktionen, welche zur Identifizierung der

Ergebnisse

vollständigen *T.canis* unc-49B GABA_A-Rezeptor Sequenz führten. In rot sind die verwendeten Primer eingezeichnet, ihre Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

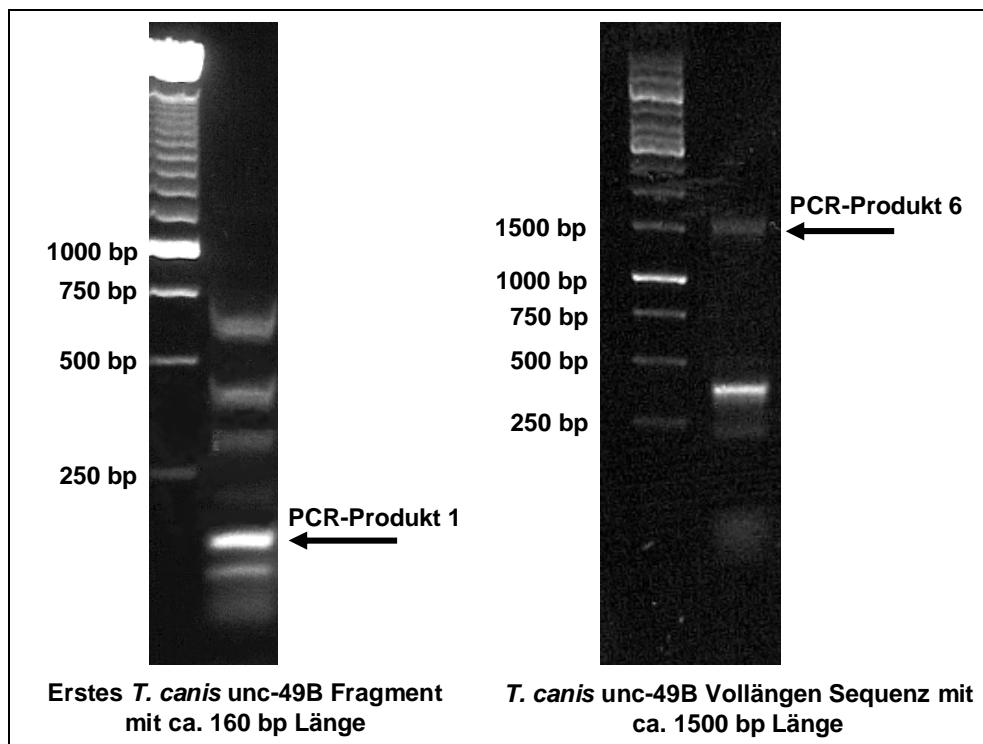


Abb. 4.23: Gelelektrophoreseaufnahme des ersten identifizierten *T.canis* unc-49B Fragments und der *T.canis* unc-49B Vollängen cDNA. Bei den mitgelaufenen Größenstandards handelt es sich im linken Bild um die 250 bp DNA Ladder (Invitrogen) und im rechten Bild um die 1 KB DNA Ladder (Fermentas).

Es konnte die vollständige unc-49B Sequenz von *T. canis* identifiziert werden. Die Sequenz ist auf Nukleinsäureebene vom Start- bis zum Stopcodon 1455 Basenpaare (bp) lang. Auf Aminosäureebene umfasst die *T. canis* unc-49B cDNA 484 Aminosäuren (as), wie in Abbildung 4.24 gezeigt ist. Start- und Stopcodon sind in Abbildung 4.24 in grün und blau markiert, in der 5' UTR befindet sich ein weiteres Startcodon (in grau gekennzeichnet) vor dem eigentlichen Startcodon. Es führt allerdings nicht zu einer erfolgreichen Translation, da sich nur einige Basen weiter ein Stopcodon (in grau gekennzeichnet) befindet. Aus diesem Grund und auch abgeleitet aus den Sequenzvergleichen mit den unc-49B Sequenzen anderer Nematoden (Abbildung 4.25) ist das in grün gekennzeichnete Startcodon das tatsächliche Startcodon. Allerdings könnte das davor in der 5' UTR liegende Startcodon dazu führen, dass das Protein nur wenig effektiv gebildet wird, da das Ribosom häufig beim falschen Startcodon beginnen könnte und dann nur wenige Basen später abbrechen müsste. Aus diesem Grund wurde die Existenz möglicher

Kozak-Sequenzen vor den beiden Startcodons überprüft. Die Kozak-Sequenz für *C. elegans* ist AAA, allerdings kann sie vor keinem der beiden Startcodons gefunden werden. Die Kozak-Sequenz für *T. canis* ist nicht bekannt, deshalb ist es trotzdem nicht ausgeschlossen, dass sie sich vor einem der beiden Startcodons befindet. Dafür ist eine "Spliced Leader 1" (sl1) Sequenz in der 5' UTR lokalisiert, sie ist in Abbildung 4.24 rot unterlegt und bis auf das C an dritter Stelle, welches eigentlich ein T sein müsste, vollständig mit dem sl1 von *C. elegans* identisch.

Das zusätzliche Startcodon in der 5' UTR ist im Plasmidkonstrukt nicht vorhanden, da der *C. elegans* Promotor gleich vor dem eigentlichen Startcodon der *unc-49B* cDNA angefügt wurde und die *T. canis* *unc-49B* 5' UTR gänzlich weggelassen wird. Aus diesem Grund ist die optimale Bildung des Proteins aus dem Plasmidkonstrukt während des "rescue" Experimentes nicht durch die zwei Startsequenzen beeinträchtigt.

Ergebnisse

1	ggc	ttaatta	cccaagtttg	ag	agcataaa	tcttgctcga	tttgggtgtac	ggtagcggct
61	gcatagagtg	aatgcgattg	agaagtttgt	cgaggggggtg	ctgagacgga	gaggggggct		
121	tggtgctcca	tccat	atgca	tctcgtaag	aacgggtcca	attgettctt	ctccttctca	
181	ttctactcac	tcataatgtg	ccatattttt	attctttctg	tttcgcttct	cattcactac		
241	gctattgccg	acgaatagtg	agagtatccg	aaattcaata	caaccgtaat	ttcggatata		
301	ttgaatcggc	taacggataa	atcgacatac	gataagcgat	taaggccgaa	atacggtgcc		
361	gaaccgggtg	acgttggtat	cacaatacat	gtgtccagca	ttagcgtgtg	ttccgaagtt		
421	gatatggatt	tcacattgga	tttttatattg	cgacagacgt	ggcaagacc	gagattagcg		
481	ttcggcaatt	cggatctcag	cttccaaag	gacaaaattg	aatcgcttac	ggtaggatgc		
541	gactattttg	acaagttgtg	gaagccagat	acattttttc	ctaacgagaa	gaaatcattt		
601	ttccatggtg	ccacaacgca	taactctttt	ctcaggatcg	atcccagcgg	tacggtatcc		
661	acatcgcaaa	gactgaccgt	gacagctact	tgctccgatga	agttgcaact	attcccgaatg		
721	gactcacaga	aatgtaaact	tgagatcgaa	agctacgggt	acacaacggc	agatattgac		
781	tatttttggg	gcaaacatag	gaaggatcaa	ggccaagtgg	tcggtttcaa	caatatttcc		
841	ttaccacaat	ttcgaccggt	tggttatcgt	gtgaacgta	cacgtgcaac	aacatcttca		
901	ggtgtatacg	tgcgattgta	tttcgagggtg	ctactcggtc	gtaatcttgg	tttctacctc		
961	atgaacataa	tcattccttc	aatgctgatc	gttaccattt	cgtgggtgtc	tttttgggtg		
1021	aaccgtgaag	catcacctgc	tcgtgtcggc	cttggagtta	ccactgtgct	caccatgacc		
1081	accctcatca	ctaccactaa	taattctatg	cccaaagtca	gctacattaa	agggcttgac		
1141	gtcttcttaa	atthttgttt	cgtaaatgta	ttcgcaagtt	tggtcgaata	tgcagttgtg		
1201	agttatatga	acaaaaagtt	ggcacaacgc	cgagaaaaggc	gtcgtaaaca	agctgaacaa		
1261	caagctccag	ttgaaatgcc	aatgtttcac	agtcagatct	cgtccaagcc	aaatatgggt		
1321	atgatggaga	ttccaccgga	atgcgattgt	cgcaactatc	cgcttatgca	acatccacga		
1381	ctgattgccg	ataatacaat	gtggccagca	ccattcggta	aaccgaaacg	tccaacacgg		
1441	acatgtcgtg	gcgtaacacc	ctcaaagatt	gacaaatgct	cccgatcagt	ttttccattg		
1501	ctcttcttag	gattcaacgt	ttgctattgg	acgataatga	ccgtattgag	ttcgttcata		
1561	gacacaagcg	agtacatatc	tttcgag	tga	tgcactcaac	tgcattcgac	gatcactcta	
1621	ttatgcgcgg	ctttgttcac	ttgggtcaact	ctcataactc	cactcacata	aaaaaaaaaa		
1681	aaaaa							

Abb. 4.24: Vollständige unc-49B cDNA Sequenz von *T. canis* mit 1455 bp Länge vom Startcodon in grün bis zum Stopcodon in blau, sowie UTR und *T. canis* unc-49B Aminosäuresequenz bestehend aus 484 Aminosäuren gezeigt in grün. In rot markiert ist die sl1 Sequenz und in grau unterlegt ist ein alternatives Startcodon, dem allerdings ein ebenfalls grau unterlegtes Stopcodon folgt.

4.4.1 Vergleich der *T. canis* unc-49B Sequenz mit den unc-49B Sequenzen anderer Organismen

Die identifizierte *T. canis* unc-49B Sequenz wurde mit anderen Sequenzen aus der NCBI Datenbank mittels "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) mit der Funktion blastn zum Vergleich auf Nukleinsäureebene verglichen. Dabei ergaben sich hohe Übereinstimmungen zu den unc-49B Sequenzen anderer Organismen, wie z.B. *C. elegans*. Die höchste Identität von 81 % konnte bei einem Vergleich mit einer Teilsequenz von *A. suum* erzielt werden. Leider war die Sequenz von schlechter Qualität, das heißt sie enthielt einige falsche Stoppcodons, die von Sequenzierfehlern herrühren können und eine konzeptionelle Translation frühzeitig abbrechen ließen. Desweiteren enthielt sie einige unbestimmte Basen, die mit n bezeichnet werden. Die Sequenz konnte daher nur teilweise verwendet werden. Insgesamt wurden 780 bp der Sequenz für eine Vergleichsanalyse mit dem *T. canis* unc-49B Gen verwendet. Auf Grund der Qualitätsmängel war es auch nur in einem kleinen Bereich von 175 Aminosäuren möglich, durch leichtes Editieren der Sequenz eine konzeptionelle Translation durchzuführen. Die Übereinstimmungen auf Aminosäureebene in dieser Teilsequenz zwischen *A. suum* und *T. canis* lagen allerdings sehr hoch, nämlich bei 94 %.

Die Übereinstimmungen zwischen der *T. canis* unc-49B Sequenz und den unc-49B Nukleinsäuresequenzen von *Haemonchus contortus* und *C. elegans* lagen bei 73 % bzw. 68 % und etwas höher beim Vergleich der Aminosäuresequenzen mit der Funktion Blastp der NCBI Datenbank. Da diese Sequenzen vollständig und von hoher Qualität waren, sowie eindeutig als unc-49B Sequenzen beschrieben vorlagen, lässt die hohe Identität darauf schließen, dass tatsächlich das richtige Gen als unc-49B von *T. canis* identifiziert wurde. Die geringste Identität ergab sich mit einer unc-49B Teilsequenz von *Brugia malayi*, deren Länge 841 Basenpaare auf Nukleinsäureebene betrug und 280 Aminosäuren als Proteinsequenz. Die Übereinstimmungen lagen hierbei nur bei 57 % auf DNA- und 59 % auf Aminosäureebene. Alle prozentualen Identitäten sind in Tabelle 4.13 aufgeführt, dort finden sich auch die "accession numbers" der verwendeten Sequenzen.

	<i>T.canis</i> unc-49B NS	Länge NS	<i>T.canis</i> unc-49B AS	Länge AS
<i>H. contortus</i> unc-49B	73% über 1455 bp	1491 bp	74% über 484 as	496 as
<i>C. elegans</i> unc-49B	68% über 1428 bp	1428 bp	71% über 475 as	475 as
<i>A. suum</i> unc-49B Teilsequenz	81% über 780 bp	780 bp	94% über 175 as	175 as
<i>B. malayi</i> unc-49B Teilsequenz	57% über 841 bp	841 bp	59% über 280 as	280 as

Tab. 4.13: Prozentuale Identitäten zwischen der *T. canis* unc-49B Sequenz und den unc-49B Sequenzen der Organismen: *H. contortus* ("accession number": EU939734), *C. elegans* ("accession number": AF151642), *A. suum* ("accession number": J1173655) und *B. malayi* ("accession number": XP_001894065). Die Sequenzen von *A. suum* und *B. malayi* waren nur als Teilsequenzen vorhanden. Die Sequenz von *A. suum* musste durch das Einfügen von je einem N an vier Stellen editiert werden, um ein offenes Leseraster zu erhalten.

Zur Illustration der prozentualen Identitäten zeigen Abbildung 4.25, 4.26 und 4.27 Bilder der Sequenzvergleiche. Abbildung 4.25 zeigt die *T. canis* unc-49B Sequenz im direkten Vergleich mit der *H. contortus* und der *C. elegans* unc-49B Sequenz auf Aminosäureebene. Bereiche großer Ähnlichkeit bestehen besonders im Mittelteil der Sequenz, während am 5'-Ende und am 3'-Ende mehr Unterschiede auftreten. In jedem Fall zeigt dieser Vergleich gut, dass es sich wirklich bei der identifizierten Sequenz um die B-Untereinheit des *T. canis* *unc-49* handelt. Während die drei GABA_A-Rezeptor *unc-49*-Untereinheiten A, B und C sich am 5'-Ende sehr stark ähneln, werden die Unterschiede zwischen den Untereinheiten von der Mitte an bis zum Ende der Sequenz deutlich. Wie man im Sequenzvergleich in Abbildung 4.25 sieht, zeigt die *T. canis* unc-49B Sequenz auch im Mittelteil und fast bis zum Ende hin große Ähnlichkeiten mit den *H. contortus* und *C. elegans* unc-49B Sequenzen. Es ist daher davon auszugehen, dass die gesuchte GABA-Rezeptoruntereinheit identifiziert wurde.

T.c.unc49B	1	mhlakngsncffsfyslimchifilsvsllihyaiadeygeypkfnnt
H.c.unc49B	1	mrisd-----lflfa-----ttatfyhvsrage--ddiivdts
C.e.unc49B	1	--marp-----ftliv---llsahlc lhvvvtqd--edshintq
T.c.unc49B	51	visdilnr ltdkstydkr lrpkgyaepvdvgitihvssisavsevdmft
H.c.unc49B	32	qlstvlr ltnkti ydkr lrprygdkpvdvgitihvssisavsevdmft
C.e.unc49B	33	llssvlr ltnrttydkr lrprygekpvvdvgitihvssisavsevdmft
T.c.unc49B	101	ldfy l rqt wq dpr lafgnsdl sfqr dkiesltvgvdyldklwkpdtffpn
H.c.unc49B	82	ldfymrqt wq dpr lafgtldlgiak-qitsltvgvdyldr lwkpdtffpn
C.e.unc49B	83	ldfymrqt wq dpr lafgsldlgl ske-idsltvgvdyldr lwkpdtffpn
T.c.unc49B	151	ekksffhvatthnsflridpdgtvstsqr ltvatcpmkqlfpm dsqkc
H.c.unc49B	131	ekksffhlatthnsflridsdgtvytsqr ltvatcpmkqlfpm dsqrc
C.e.unc49B	132	ekksffhlatthnsflriegdgtvytsqr ltvatcpmdklfpm dsqhc
T.c.unc49B	201	kleiesygyttadidyfwgkhrkd-qgq-vvgfnnislpqfrpvgyrvnv
H.c.unc49B	181	kleiesycytmadidyfwgrqrsd-prqsavvfgnfm lpqfkqtcy hvny
C.e.unc49B	182	kleiesygyetkdidyywgkkrtdleit-avkfdt fqlpqfqtlyfvnt
T.c.unc49B	249	trattssgyvyr lyfevllgrnlgfylvlniiipsmlivtiswvsfwlnre
H.c.unc49B	230	tqattssgsyrr lyfeillvrnmgfysmnivipsmlivtiswvsfwlnre
C.e.unc49B	231	tkaetssgkyvr lallevilvrnmgfytmnivipsilivtiswvsfwlnre
T.c.unc49B	299	asparvlgvttvltmttlitttnsmpkvsyikgldvflnfcfvmvfas
H.c.unc49B	280	asparvlgvttvltmttlitttnsmpkvsyikgldvflnfcfvmvfas
C.e.unc49B	281	asparvlgvttvltmttlitttnsmpkvsyvkglvflnfcfvmvfas
T.c.unc49B	349	lveyavvsymnkkl aqrrrrrrkqaeqqapvempmfh-sqissk-----
H.c.unc49B	330	lveyavvsymnkrialrrekrrrrkqaeqqqrnevpmfs-npvtpkqpnnv
C.e.unc49B	331	lleyaivsymnkrlvlrrekrrrkaaeqqqrnempmfnas pkaan-----
T.c.unc49B	392	-----pnmgmmeippecdcrtip lmqhprliad--ntm
H.c.unc49B	379	yemamisqnstpaktfvphsqlmeipvdcdcrtip lqhprlvadgthtm
C.e.unc49B	375	-----nnnplmeipencdcrtipnmqhprlvtdgahtl
T.c.unc49B	423	wpapfgkpkprtrtc-rsvtpskidkcsryvfp llflgfnvcywt imtv1
H.c.unc49B	429	wpapfgkpkkasktc-rnvtpakidkcsrylfp llfsafnvvywt imtv1
C.e.unc49B	408	wpapfarpkkasktc cqrwtpakidklsrygfplsfisifnivwylmky1
T.c.unc49B	472	ssf---idtseyisfe-----
H.c.unc49B	478	ssiaedlskde wvpivied----
C.e.unc49B	458	s-----lnssdkiqendkwqqih

Abb. 4.25: Sequenzvergleich zwischen unc-49B Sequenzen von *T. canis* (T.c.), *H. contortus* (H.c.) ("accession number": EU939734) und *C. elegans* (C.e.) ("accession number": AF151642) auf Aminosäureebene.

In Abbildung 4.26 ist das Teilstück der unc-49B Sequenz von *A. suum* im Vergleich mit der *T. canis* unc-49B Sequenz dargestellt. Obwohl nur ein Teilstück betrachtet werden kann, ist trotzdem deutlich, dass sich die Sequenzen sicher auch auf Grund des engen Verwandtschaftsgrades der Nematoden, die beide zur Familie Ascaridae gehören, sehr stark ähneln. Es gibt nur sehr wenige

Aminosäureaustausche. Dagegen fällt deutlich die geringere Ähnlichkeit zwischen den unc-49B Sequenzen von *B. malayi* zu *T. canis* in Abbildung 4.27 auf.

T.c.unc49B	301	parvlgvttvltmttlitttnsmpkvsyikgldvflnfcfvwvfaslv
A.s.unc49B	33	-----fvwvfaslv
T.c.unc49B	351	eyavvsymnkklagrerrrrrkqaeqqapvempmfhsqisskpnmgmmeip
A.s.unc49B	42	eyavvsymnkklagrerrrrrkqaeqqapvevpmfhsqispkpnlgmmeip
T.c.unc49B	401	pecdcrtiplmqhrprliadntmwpapfgkpkprtrtrcrsvtpskidkcsr
A.s.unc49B	92	pecdcrtiplmqhrprlvadnamwpapfgkpkprtrtrcrsvtpskidkcsr
T.c.unc49B	451	yvfplllflgfvncywtimtvlssfidtseyisfe
A.s.unc49B	142	yvfplllflvfvncywtimtvlssfvdtseyisfd

Abb. 4.26: Sequenzvergleich zwischen unc-49B Sequenzen von *T. canis* (T.c.) und *A. suum* (A.s.) ("accession number": J1173655) auf Aminosäureebene.

T.c.unc49B	101	ldfyrlrqtwdprlafgnsdlsfgrdkiesltvgvdylkklwkpdtffpn
B.m.unc49B	1	-----vgvdylkklwkpdtffpn
T.c.unc49B	151	ekksffhvatthnsflridpdgtvstsqrltvttatcpmklqlfpmdsqkc
B.m.unc49B	19	ekksyfhittthnsflriypngnvftsqrltvtaicnmklhlfpmdsqkc
T.c.unc49B	201	kleiesygyttadidyfwgkhrkdqgvvgfnnislpqfrpvyrvnvtr
B.m.unc49B	69	kleiesygyvldivvyffnnskn-----vsksefelppqfvlidtqvasrn
T.c.unc49B	251	attssgyvrylyfevllgrnlgfylvniiipsmlivtiswvsfwlnreas
B.m.unc49B	115	wlssgnysrltcaflfkrnigfyiiqvylpsilivviswvsfwlnrdat
T.c.unc49B	301	parvlgvttvltmttlitttnsmpkvsyikgldvflnfcfvwvfaslv
B.m.unc49B	165	parvalsvltiltmttlatttnasmpkvsyvksidiflgvsfvwvssll
T.c.unc49B	351	eyavvsymnkklagrerrrrrkqaeqqapvempmfhsqisskpnmgmmeip
B.m.unc49B	215	efaavgvyskri-klierkqkdlhrklp-----stapd-----

Abb. 4.27: Sequenzvergleich zwischen unc-49B Sequenzen von *T. canis* (T.c.) und *B. malayi* (B.m.) ("accession number": XP_001894065) auf Aminosäureebene.

Abbildung 4.28 zeigt einen phylogenetischen Vergleich der *T. canis* unc-49B Sequenz, in der sie gemeinsam mit den bereits in den Sequenzvergleichen verwendeten unc-49B Sequenzen von *H. contortus*, *C. elegans*, *A. suum* und *B. malayi* verwandtschaftlich eingeordnet wird. Ferner wurden in die phylogenetische Untersuchung auch Sequenzen der beiden anderen GABA_A-Rezeptoruntereinheiten mit aufgenommen, soweit vorhanden. Dabei handelte es sich um die C-Untereinheiten von *H. contortus* und *C. elegans*, sowie die A-Untereinheit von *C. elegans*. Es wird deutlich, dass sich die drei

Untereinheiten phylogenetisch eindeutig voneinander abgrenzen lassen. In Abbildung 4.28 sind die jeweiligen orthologen Untereinheiten als Blöcke farbig unterlegt. Den höchsten Verwandtschaftsgrad zeigt die *T. canis* unc-49B Sequenz auch hier mit der unc-49B Sequenz von *A. suum*. Sie befindet sich jedoch auch in einem engen verwandtschaftlichen Verhältnis mit den unc-49B Sequenzen von *H. contortus* und *C. elegans*. Die unc-49C Sequenzen von *C. elegans* und *H. contortus* grenzen sich in einem eigenen Block deutlich von den unc-49B Sequenzen ab. Auch die unc-49A Sequenz von *C. elegans* bildet einen eigenen Ast im Stammbaum, deutlich abgegrenzt von den anderen Untereinheiten. Sie liegt allerdings verwandtschaftlich eng zusammen mit der vermeintlichen unc-49B Sequenz von *B. malayi*. Nachdem auch schon die Identitäten im Sequenzvergleich zwischen der *T. canis* und der *B. malayi* unc-49B Sequenz sehr niedrig waren, ist nach den Ergebnissen aus dem Phylogramm zu vermuten, dass es sich bei der *B. malayi* unc-49B Sequenz eigentlich um eine unc-49A Sequenz handelt. Insgesamt zeigt die phylogenetische Untersuchung deutlich, dass es sich bei der in dieser Arbeit identifizierten Sequenz um die unc-49B-Untereinheit von *T. canis* handelt, da sie verwandtschaftlich in den Block der B-Untereinheiten eingeordnet wird und sich deutlich von den unc-49A- und C-Untereinheiten abgrenzt.

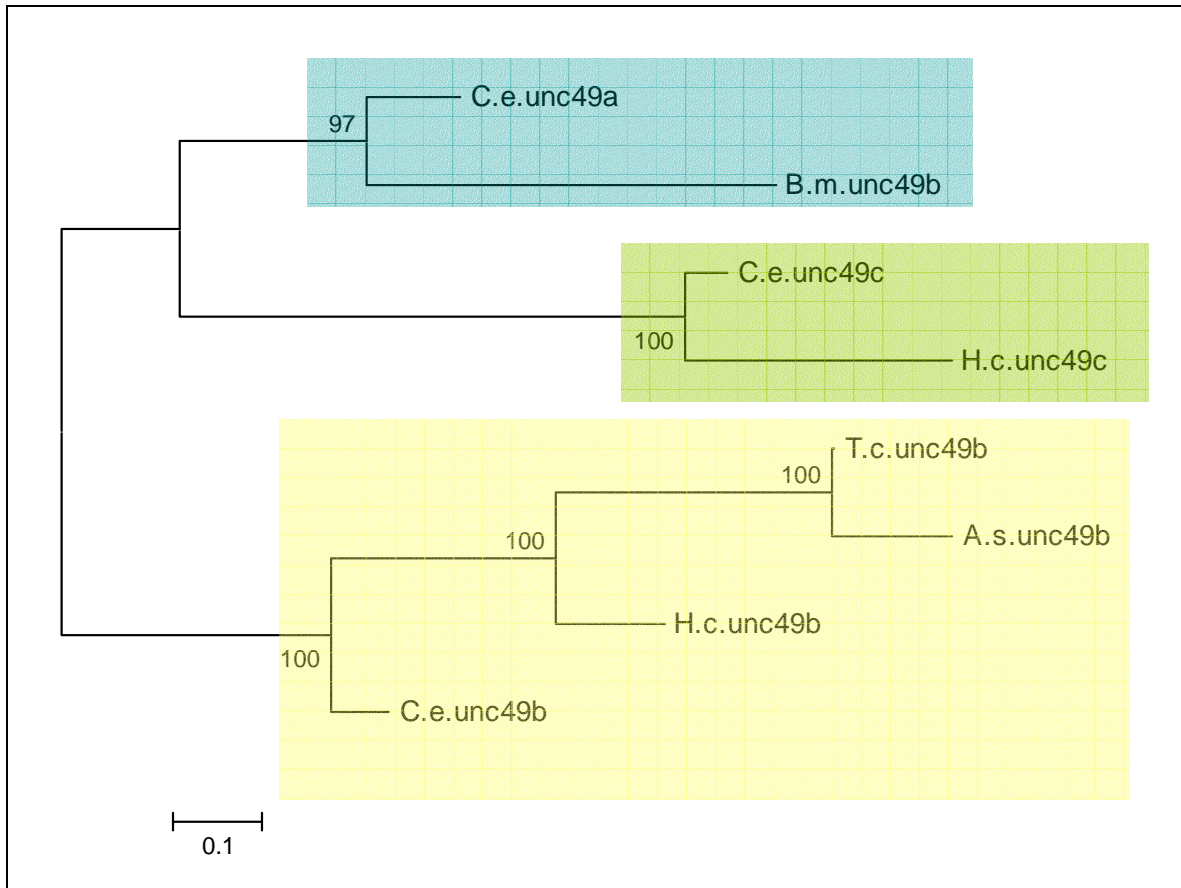


Abb. 4.28: Phylogramm der *T. canis* unc-49B Sequenz (T.c.unc49b) im verwandschaftlichen Vergleich mit den bereits im Sequenzvergleich verwendeten unc-49B Sequenzen von *H. contortus* (H.c.unc49b, "accession number": EU939734), *C. elegans* (C.e.unc49b, "accession number": AF151642), *A. suum* (A.s.unc-49b, "accession number": JI173655) und *B. malayi* (B.m.unc49b, "accession number": XP_001894065). Außerdem wurden in die phylogenetische Untersuchung auch Sequenzen der beiden anderen GABA_A-Rezeptoruntereinheiten mit aufgenommen und zwar die C-Untereinheiten von *H. contortus* (H.c.unc49c, "accession number": EU049602) und *C. elegans* (C.e.unc49c, "accession number": AF151644), sowie die A-Untereinheit von *C. elegans* (C.e.unc49a, "accession number": AF151640). Die Sequenzen wurden mit dem Programm ClustalW2 verglichen, der phylogenetische Stammbaum wurde aus dem Sequenzvergleich mit dem Programm PhyML 3.0 erstellt und mit dem Programm Mega 4 dargestellt.

Die Zahlen an den Abzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit in Prozent für die richtige Verknüpfung dieser Sequenzen an einem Knoten wieder, die mit Hilfe des in PhyML 3.0 implementierten "likelihood ratio"-Tests bestimmt wurde. Die Zahl (0,1) unter dem Größenstandardbalken gibt an, wie viele Aminosäuren pro Position auf der von dem Balken vorgegebenen Strecke ausgetauscht sind.

4.4.2 Bioinformatische Analysen der UNC-49B Sequenz von *T. canis*

Mit Hilfe der CD Blast ("conserved domains") Software konnten konservierte Domänen in der Proteinstruktur der B-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors

UNC-49B von *T. canis* identifiziert werden, dies ist schematisch in Abbildung 4.29 gezeigt. Wie in Abschnitt 2.4.1.1 bereits erwähnt, bestehen die Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors unter anderem aus einem extrazellulären NH₂-Terminus, welcher die GABA-Bindestelle trägt. Diese konservierte Domäne konnte in der Aminosäuresequenz gefunden werden. Darüber hinaus besitzen die Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors vier Transmembrandomänen, welche den Ionenkanal formen. Auch diese konservierte Domäne konnte in der Sequenz identifiziert werden. Insgesamt sind in der Aminosäuresequenz die für den GABA_A-Rezeptor typischen konservierten Domänen zu finden. Die identifizierte Sequenz gehört damit eindeutig zur gesuchten Kationen Transporter Familie.

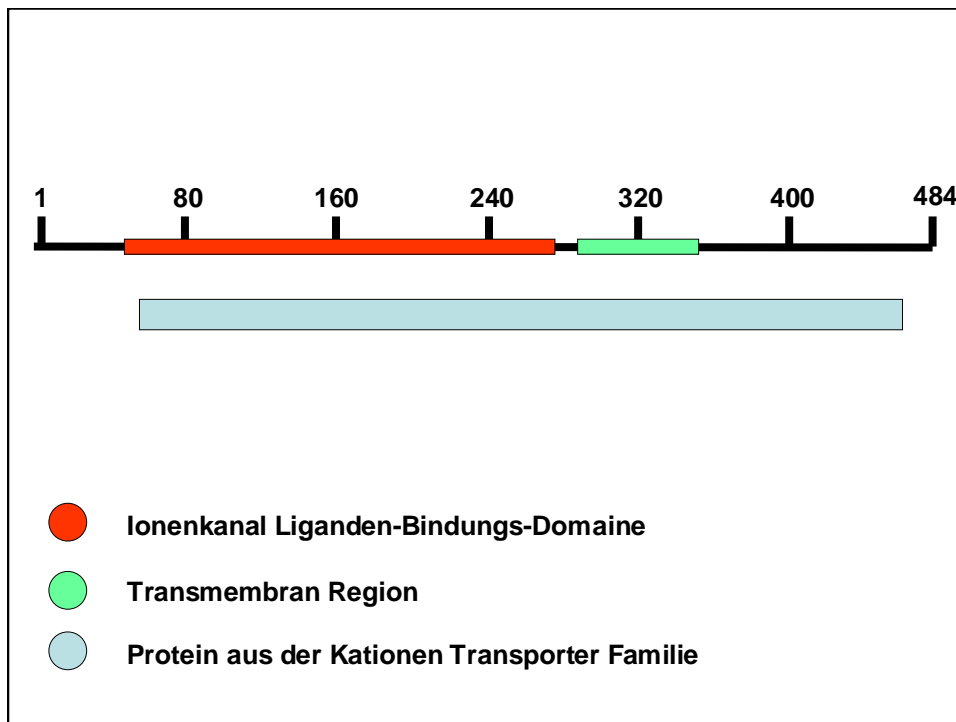


Abb. 4.29: Konservierte Domänen in der Proteinstruktur der B-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors *unc-49* von *T. canis*. Die Zahlen zeigen die Positionen der Aminosäuren an. In Rot markiert ist die extrazelluläre Liganden-Bindungs-Domäne des Ionenkanals (NCBI "accession number": Pfam02931). In Grün markiert ist der Teil des Proteins, in dem sich die vier Transmembranregionen befinden, welche den Ionenkanal formen (NCBI "accession number": Pfam02932). Blau markiert ist der ganze Bereich, welcher deutliche Zugehörigkeit zur Kationen-Transporter Familie zeigt (NCBI "accession number": TIGR00860).

Es wurden weitere bioinformatische Untersuchungen der Sequenz mit mehreren Programmen zur Identifikation von Transmembrandomänen durchgeführt. Dabei wurden folgende Programme verwendet, deren Herkunft in Abschnitt 3.1.10

genauer aufgeführt ist: TMMOD, TopPred 0.01, MINNOU, HMMTOP und TMHMM. Sämtliche Programme sagten das gleiche grundlegende Muster an Transmembrandomänen voraus, das Tabelle 4.14 wiedergibt. Darüber hinaus wurden die gleichen Bereiche des Proteins als extra- bzw. intrazellulär vorhergesagt, wie in Tabelle 4.15 dargestellt ist. Beispielhaft ist in Abbildung 4.30 ein von dem Programm TMMOD errechnetes Schema zu sehen, welches die genaue Lage der Transmembrandomänen in der Proteinsequenz zeigt.

Es werden von allen Programmen fünf potentielle Transmembrandomänen erkannt, sowie ein großer Bereich am NH₂-Terminus, der extrazellulär liegt, der in Abbildung 4.29 in rot gekennzeichnet ist. Diese extrazelluläre Region umspannt den Bereich von Aminosäure 30-270. Dies stimmt mit dem Bereich überein, welcher mit Hilfe der CD BLAST Funktion der NCBI Datenbank als der NH₂-Terminus mit der extrazellulären Liganden-Bindungs-Domäne des Ionenkanals identifiziert wurde. Auch das Schema in Abbildung 4.30 zeigt deutlich diesen großen extrazellulären Bereich an.

Bei der Anzahl der Transmembrandomänen wiederum stimmen die Ergebnisse aus der NCBI Datenbank nicht mit den Ergebnissen der anderen Programme überein. Statt wie erwartet vier Transmembrandomänen, identifizieren alle Programme fünf Transmembrandomänen in der Sequenz, wobei drei in der Region von Aminosäure 270-350 liegen. Diese Region wird auch von der CD BLAST Funktion der NCBI Datenbank als Transmembranregion erkannt. Die letzte Transmembrandomäne ist etwas weiter ans Ende der Sequenz verschoben, liegt aber noch nahe an dem Bereich der als Transmembranregion erkannt wird. Die erste Transmembrandomäne allerdings, welche zwischen Aminosäure 10 und 40 vorhergesagt wird, im Bereich des NH₂-Terminus, ist weder in der Literatur an dieser Stelle beschrieben, noch liegt sie in der von der CD BLAST Funktion der NCBI Datenbank erkannten Transmembranregion. Aus diesem Grund wurde mit dem Programm SignalP 3.0 überprüft, ob es sich bei der Transmembrandomäne im Bereich des NH₂-Terminus um ein Signalpeptid handeln könnte. Dies konnte bestätigt werden, SignalP 3.0 erkannte ein Signalpeptid im Bereich von Aminosäure 1-39, also genau in dem Bereich in dem die anderen Programme die zusätzliche Transmembrandomäne vorhergesagt hatten. Es handelt sich dabei also eigentlich um ein Signalpeptid und damit ist die Anzahl erkannter Transmembrandomänen mit insgesamt vier so wie erwartet.

Programme	Lage der Transmembrandomänen				
	14-38	271-291	304-324	336-356	451-475
TMMOD	14-38	271-291	304-324	336-356	451-475
TopPred 0.01	10-30	275-295	303-323	333-353	452-472
MINNOU	10-37	272-294	305-322	331-358	442-474
HMMTOP	11-33	271-295	304-321	336-358	451-475
TMHMM	13-35	273-295	302-321	336-358	453-475

Tab. 4.14: Lage der Transmembrandomänen in der Proteinsequenz der B-Untereinheit des *T. canis* GABA_A-Rezeptors UNC-49.

Programme	Intrazelluläre Bereiche			Extrazelluläre Bereiche		
	TMMOD	1-13	292-303	357-450	39-270	325-335
TopPred 0.01	1-9	296-302	354-451	31-274	324-332	473-484
MINNOU	1-9	295-303	359-441	38-271	323-330	475-484
HMMTOP	1-10	296-303	359-450	34-270	322-335	476-484
TMHMM	1-12	296-301	359-452	36-272	322-335	476-484

Tab. 4.15: Lage der intrazellulären und extrazellulären Bereiche der B-Untereinheit des *T. canis* GABA_A-Rezeptors UNC-49. In rot markiert ist ein großer extrazellulärer Bereich am 5'-Ende, der von allen fünf Programmen erkannt wird.

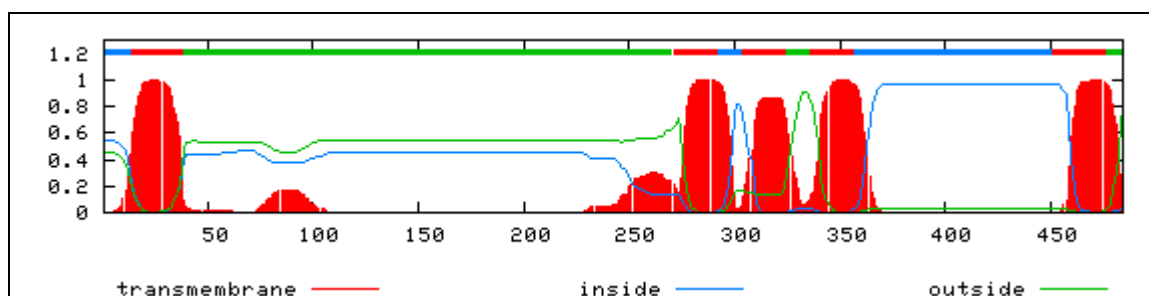


Abb. 4.30: Lage der Bestandteile der B-Untereinheit des *T. canis* GABA_A-Rezeptors UNC-49 in der Zellmembran. Die Lage der Transmembrandomänen, sowie die Bereiche welche innerhalb und außerhalb der Zellmembran liegen und deren Länge, errechnet mit dem Programm TMMOD mit Hilfe eines "Hidden Markov" Modells für Transmembranproteine (Kahsay et al. 2005). Die Ordinate gibt die Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit einer Transmembrandomäne an der durch die Abszisse bezeichneten Position in der Aminosäuresequenz an.

4.5 "Rescue" Experiment

4.5.1 Plasmidkonstrukte

Für das "rescue" Experiment mussten insgesamt zwei Plasmidkonstrukte erstellt werden, deren genauer Aufbau in Abschnitt 3.2.6.1 ausführlich erläutert ist. Abbildung 4.31 zeigt das Ergebnis einer Gelelektrophoreseaufnahme zweier Restriktionsenzymverdau-Ansätze mit verschiedenen Enzymen, welche den

korrekten Aufbau der Plasmidkonstrukte zeigen. Bei den mit P1 bzw. P2 gekennzeichneten Proben handelt es sich um zwei Klone, welche das vollständige Plasmid mit dem *C. elegans* Promotor, dem *T. canis* unc-49B und der *C. elegans* 3' UTR enthalten. Alle Teilstücke liegen in richtiger Orientierung und Kombination vor. Dies zeigen deutlich die Gelelektrophoreseaufnahmen der zwei Restriktionsenzymverdau-Ansätze in Abbildung 4.31. Im ersten Restriktionsenzymverdau mit den Enzymen *NotI*, *NheI* und *PstI* erscheinen wie erwartet vier Banden bei P1 und P2. Zum Vergleich ist in Abbildung 4.31 auch das Vektorkonstrukt noch einmal schematisch abgebildet. Die Enzyme *NotI* und *NheI* schneiden den Promotor aus dem Konstrukt aus, was eine ca. 3000 bp große Bande im Agarosegel ergibt. Zwischen *NheI* und *PstI* wird die ca. 1500 bp große *T. canis* unc-49B Sequenz herausgeschnitten. Da *PstI* auch *SbfI* Schnittstellen schneidet, wird gleichzeitig auch die *C. elegans* 3' UTR mit ca. 700 bp herausgeschnitten, so dass als letztes noch ein ca. 4000 bp großes Stück übrig bleibt, bei dem es sich um das Vektorgerüst handelt. Auf diese Weise erscheinen im Agarosegel vier Banden in den Größen von ca. 4000 bp, 3000 bp, 1500 bp und 700 bp, wie sie auch in Abbildung 4.31 zu sehen sind. Das Kontrollplasmid ohne *T. canis* unc-49B wurde ebenfalls mit den gleichen Enzymen geschnitten, es ist bezeichnet als K. Wie man deutlich sieht zeigt es die erwarteten drei Banden nach dem Restriktionsenzymverdau, die ca. 4000 bp große Bande vom Vektorgerüst, die ca. 3000 bp große Bande vom *C. elegans* Promotor und die ca. 700 bp große Bande der *C. elegans* 3' UTR. Es fehlt die ca. 1500 bp große Bande des *unc-49* Gens, welches nicht in die Kontrolle eingefügt wurde. Der Restriktionsenzymverdau bestätigt also in beiden Fällen das Vorhandensein der richtigen Elemente im Plasmidkonstrukt.

Zur Überprüfung der richtigen Orientierung der *C. elegans* 3' UTR, welche als einzige Komponente in zwei Orientierungen eingebaut werden konnte, wurde ein weiterer Restriktionsenzymverdau durchgeführt, diesmal nur mit den Enzymen *NheI* und *SbfI*. Auch das Ergebnis dieses Restriktionsenzymverdaus zeigt Abbildung 4.31. Bei richtiger Orientierung wurde eine 2200 bp große Bande erwartet, welche aus dem ausgeschnittenen *T. canis* unc-49B und der 3' UTR besteht. Diese Bande zeigt sich in Abbildung 4.31 sehr deutlich, darüber bei etwa 7000 bp befindet sich eine zweite Bande, welche den Promotor und das Vektorgerüst enthält. Auch für die Kontrolle konnte auf diese Weise die richtige

Orientierung der 3' UTR bewiesen werden. Hier wurde eine 700 bp große Bande erwartet, da ja das *T. canis unc-49* Gen fehlt. Die Bande ist in Abbildung 4.33 nur schwach zu erkennen, aber mit einem Pfeil markiert. Die Gelelektrophoreseaufnahme der zwei Restriktionsenzymverdau-Ansätze zeigt eindeutig die korrekte Konstruktion der Plasmide. Zusätzlich wurde dies auch noch mit Hilfe einer Kontroll-PCR und Sequenzierung bestätigt.

Die Plasmide konnten somit für die Mikroinjektion in *C. elegans unc-49B* "loss of function" Stämmen verwendet werden.

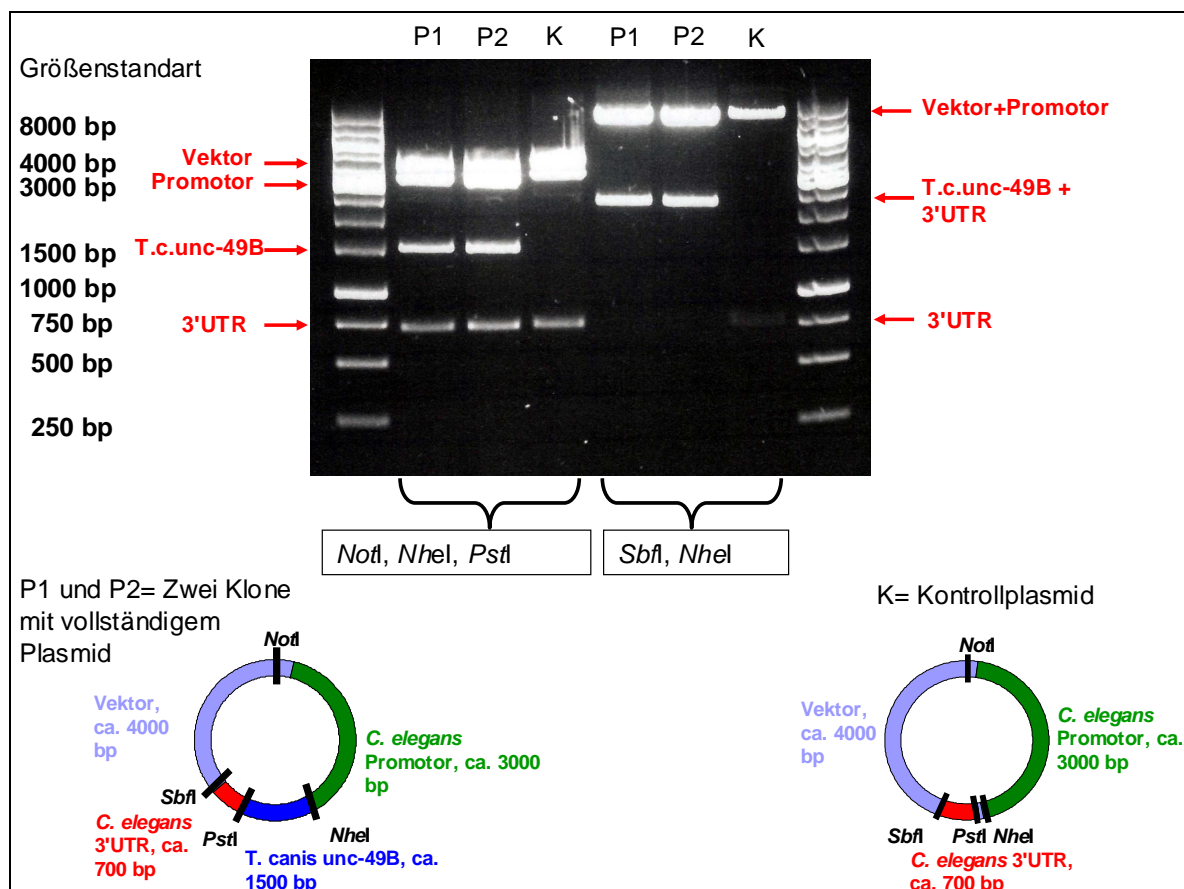


Abb. 4.33: Gelelektrophoreseaufnahme zweier Restriktionsenzymverdau-Ansätze zur Verifizierung der Plasmidkonstruktionen. Die schematischen Darstellungen beider Plasmide sind ebenfalls gezeigt. Als Größenstandard wurde der Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) verwendet.

4.5.2 "Rescue" Experiment: Mikroinjektion

Die Plasmide konnten erfolgreich in *C. elegans* eingeführt werden. Aus 50 Würmern in die das Plasmid injiziert wurde, ergaben sich ca. 25 grün fluoreszierende Nematoden in der F1 Generation, welche demnach das co-transfizierte GFP-Plasmid und somit aller Wahrscheinlichkeit nach auch das

Vektor-Plasmid für das Gen *unc-49* extrachromosomal von ihren Elterntieren übertragen bekommen hatten.

Abbildung 4.32 zeigt die Anatomie des *C. elegans* Pharynx, welcher bei transgenen Nematoden durch das GFP angefärbt wird. Der Pharynx ist ein tubulärer Muskel, bestehend aus drei Teilen: dem Corpus, welcher sich wiederum in Pro- und Metacarpus unterteilt, dem Isthmus und dem terminalen Bulbus (Avery und Shtonda, 2003). Es ist erkennbar, dass bei transgenen Würmern alle drei Teile des Pharynx deutlich angefärbt sind, weshalb man die transgenen Nematoden gut von nicht transgenen Nematoden unterscheiden kann. Das starke Leuchten im gesamten Pharynxbereich spricht für eine starke Expression der Plasmide in den Muskelzellen.

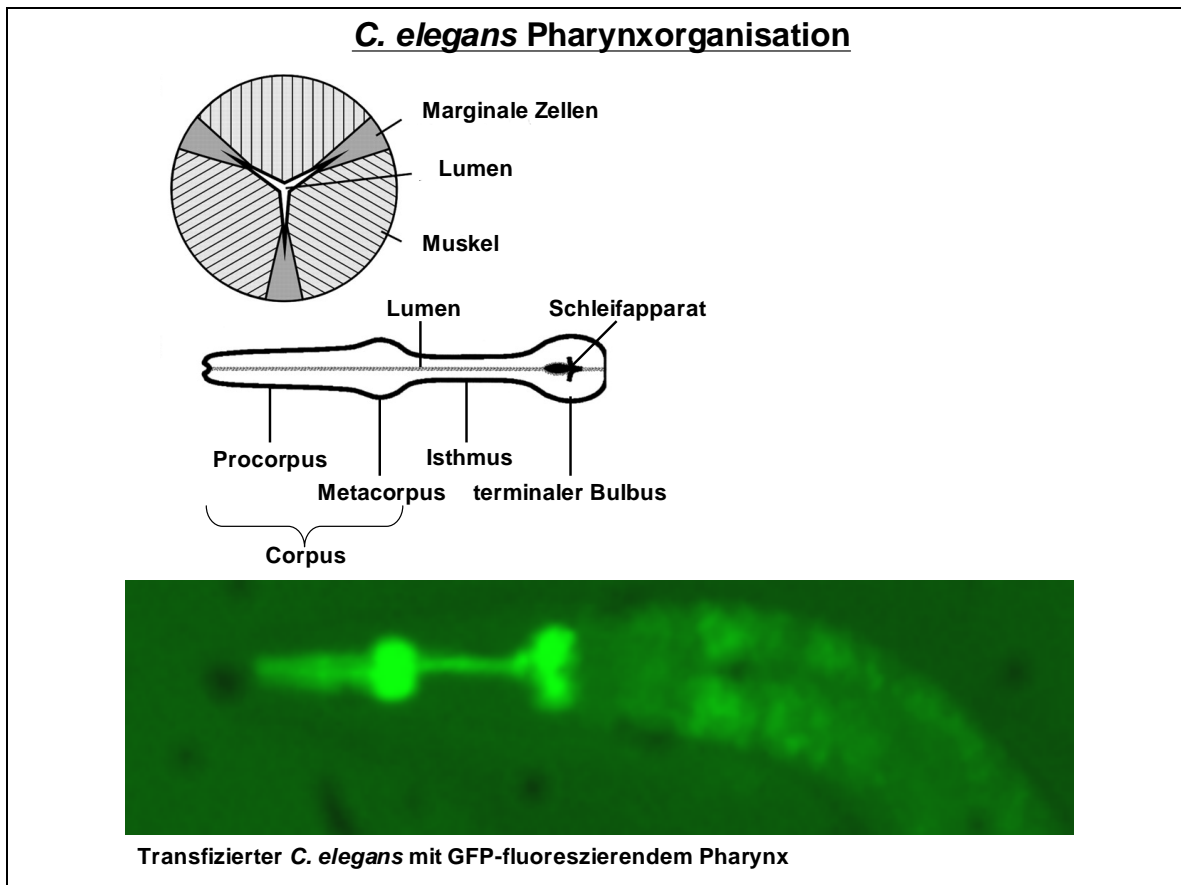


Abb. 4.32: Anatomie des *C. elegans* Pharynx im Querschnitt und seitlich betrachtet. Im Vergleich dazu ein fluoreszierender Pharynx eines transgenen Nematoden (verändert nach Avery und Shtonda, 2003).

In Abbildung 4.33 ist ein transgener *C. elegans* aus der F1 Generation zu sehen. Derselbe Wurm ist einmal mit und einmal ohne Fluoreszenz-Beleuchtung

fotografiert worden. Der grün fluoreszierenden Pharynx ist gut sichtbar, was dokumentiert, dass die Transfektion erfolgreich war. Die Fluoreszenz setzt sich auch im restlichen Wurmkörper fort allerdings deutlich schwächer. Bei dieser Fluoreszenz könnte es sich um auto-fluoreszierende Bakterien im Darm des Wurmes handeln.



Abb. 4.33: Transgener *C. elegans* aus der F1 Generation unter Fluoreszenz- und ohne Fluoreszenz-Beleuchtung.

Aus etwa 20 grün fluoreszierenden F1 Nematoden erzeugte ein Exemplar eine stabile Linie, indem es das Plasmid an seine Nachkommen weitergab. Es konnten auf diese Weise zwei transgene *C. elegans* Linien erzeugt werden, die das Gen *unc-49* von *T. canis* enthielten. Die Linien werden im folgenden als *C.e.T.c.unc-49 1* und *C.e.T.c.unc-49 2* bezeichnet. Während *C.e.T.c.unc-49 2* mit normaler Intensität leuchtet und sich sehr gut reproduziert, indem etwa auf die Hälfte der Nachkommenschaft das Plasmid übertragen wird, leuchtet *C.e.T.c.unc-49 1* sehr viel stärker, zeigt aber Schwierigkeiten in der Reproduktion. Es können bei *C.e.T.c.unc-49 1* häufig Schlupfschwierigkeiten bei den Larven

oder auch das Absterben von ersten Larven beobachtet werden, außerdem sind viele Adulte steril und produzieren keine Eier. Der Unterschied in der GFP-Leuchtintensität zwischen den beiden transgenen Linien *C.e.T.c.unc-49 1* und *C.e.T.c.unc-49 2* ist in Abbildung 4.34 illustriert. Die Nematoden aus diesen beiden Linien konnten für das "rescue" Experiment genutzt werden. Außerdem konnte eine Linie mit dem Kontrollplasmid erzeugt werden, welches das Gen *unc-49* von *T. canis* nicht enthält. Diese Linie wird im Folgenden als *C.e.Kontrolle* bezeichnet. Da sich der transgene Kontrollstamm nur sehr schlecht reproduzierte, konnten nur wenige transgene *C. elegans* aus dieser Linie gewonnen werden, weshalb der Stamm *C.e.Kontrolle* nur im Assay zur Bewegungsfähigkeit zu sehen ist.

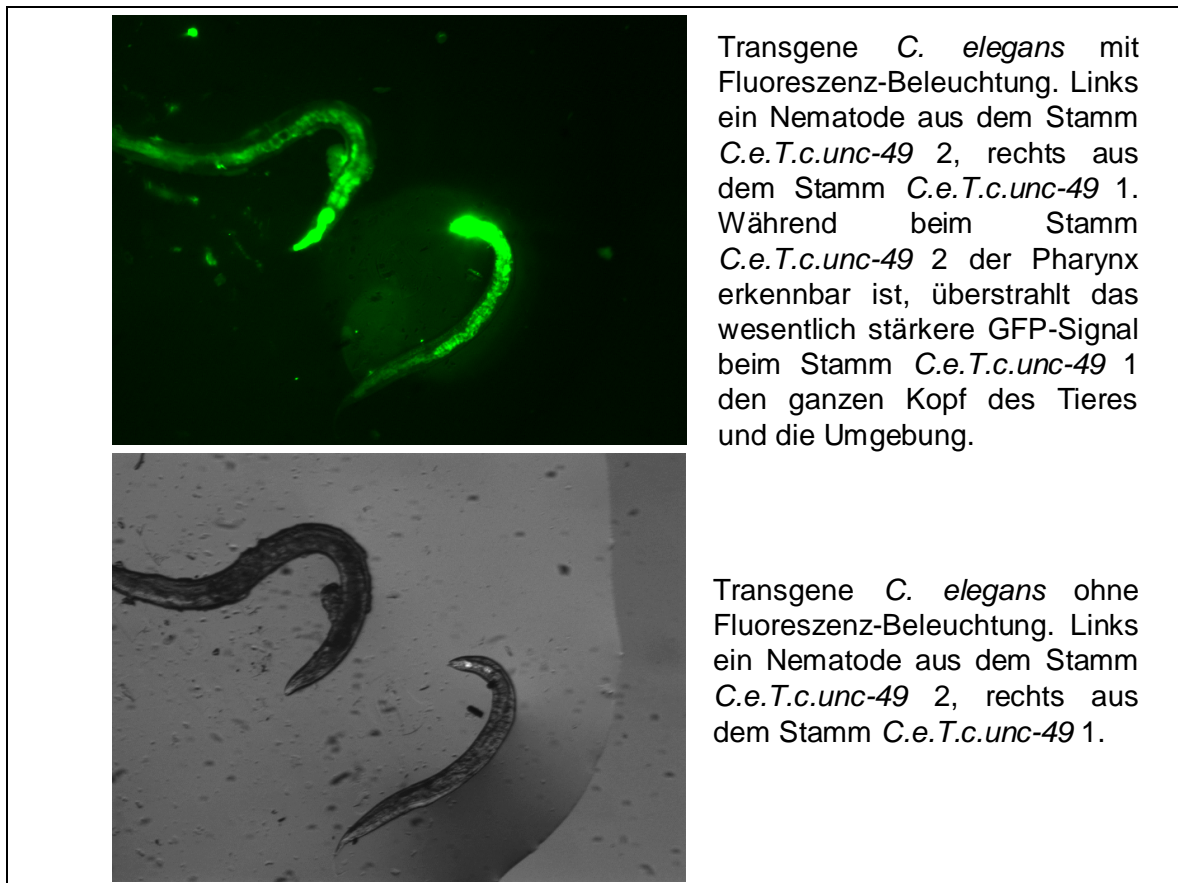


Abb. 4.34: Transgene *C. elegans* aus den Linien *C.e.T.c.unc-49 1* und *C.e.T.c.unc-49 2* unter Fluoreszenz- und ohne Fluoreszenz-Beleuchtung. Die stärkere Leuchtintensität des Stammes *C.e.T.c.unc-49 1* dessen Vertreter auf beiden Bildern rechts abgebildet ist wird deutlich. Er leuchtet so stark, dass es selbst ohne Fluoreszenz-Beleuchtung zu sehen ist.

Durch Abbildung 4.35 wird deutlich, dass nicht nur das GFP-Plasmid, sondern auch das gleichzeitig injizierte Zielplasmid in den transgenen Nematoden exprimiert wird. Dort ist das Ergebnis der RT-PCRs mit spezifischen *T. canis*

unc-49B Primern und der RNA der transgenen *C. elegans* zu sehen. Es konnte mit den Vollängenprimern der *T. canis* unc-49B cDNA Sequenz aus der RNA des transgenen *C. elegans* Stammes C.e.T.c.unc-49 1 die vollständige *T. canis* unc-49B cDNA Sequenz amplifiziert werden. Die Bande bei ca. 1500 bp ist in Abbildung 4.35 B zu sehen. Die Primer binden augenscheinlich auch noch an andere Stellen der *C. elegans* cDNA, denn es erscheinen viele Nebenprodukte als Banden in der Gelelektrophoreseaufnahme.

Zusätzlich wurde mit spezifischen Primern noch ein 220 bp großes Fragment der *T. canis* unc-49B cDNA aus dem Stamm C.e.T.c.unc-49 2 amplifiziert. Dieses Stück ist in Abbildung 4.35 A deutlich zu sehen. Bei beiden Fragmenten ist die minus-RT Kontrolle daneben leer, dies zeigt, dass es sich nicht um DNA-Kontaminationen handelt, also nicht vom injizierten Plasmid herrührt, sondern tatsächlich aus der mRNA der *C. elegans* stammt. Dies wiederum spricht dafür, dass die transgenen Nematoden tatsächlich den *T. canis* GABA_A-Rezeptor UNC-49B exprimieren. Die Identität der amplifizierten Sequenzen wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

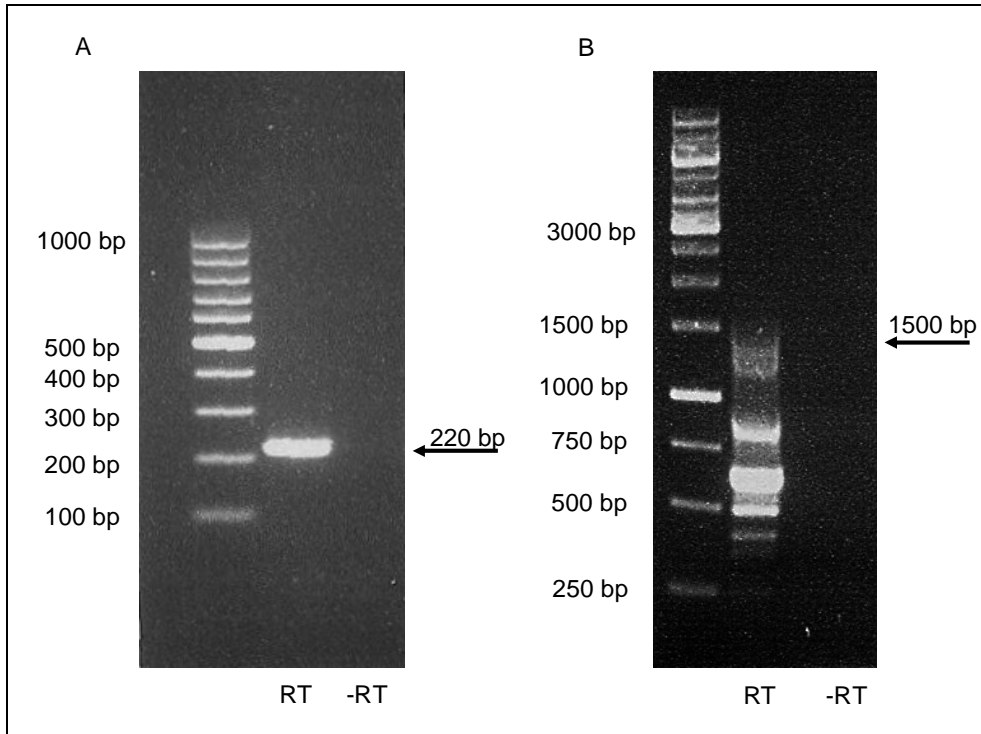


Abb. 4.35: Ergebnis der RT-PCR mit der RNA aus den transgenen Nematoden. Es konnte die gesamte *T. canis* unc-49B cDNA Sequenz aus der RNA der transgenen *C. elegans* des Stammes C.e.T.c.unc-49 1 amplifiziert werden. Ihre ca. 1500 bp große Bande ist in Abbildung B mit einem Pfeil gekennzeichnet. Durch die leichte Überladung des Gels zieht sich die Bande etwas weiter

nach unten, doch ihre Ansätze liegen bei etwa 1500 bp. Zusätzlich konnte ein 220 bp großes Fragment aus der *T. canis* unc-49B cDNA in der RNA der transgenen *C. elegans* des Stammes C.e.T.c.unc-49 2 identifiziert werden. Es ist in Abbildung A mit einem Pfeil gekennzeichnet. Bei beiden Fragmenten ist die minus-RT-Kontrolle leer. Als Größenstandard wurde der Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas), sowie der Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) verwendet.

4.5.3 "Rescue" Experiment: Bewegungsassay

Um zu überprüfen, ob das Plasmid in den transgenen *C. elegans* Stämmen nicht nur aufgenommen und exprimiert wurde, sondern auch Auswirkungen auf den Phänotyp besaß, wurde die Bewegungsgeschwindigkeit von N2-Wildtyp *C. elegans*, GABA_A-Rezeptor "loss of function" Nematoden und den transgenen Stämmen verglichen. Die transgenen Stämme gehen aus den GABA-Rezeptor "loss of function" Nematoden hervor, welche wiederum eine vom Wildtyp abweichende Bewegungsform besitzen. Durch das Fehlen des GABA-Rezeptors ist das Relaxieren der Muskeln beeinträchtigt, was zu der typischen Fortbewegungsform dieser *C. elegans* Stämme, dem sogenannten "shrinken", führt. Durch diese Bewegungsbeeinträchtigung ist ihre Fortbewegung deutlich langsamer als die von N2-Wildtyp *C. elegans*. Abbildung 4.36 zeigt den Vergleich in der Bewegungsgeschwindigkeit zwischen den verschiedenen *C. elegans* Stämmen. Es wird deutlich, dass die GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* des Stammes *unc-49 382* etwa um ein Drittel langsamer sind als der Wildtyp. Die transgenen Stämme wiederum zeigen einen deutlichen "rescue" dieses Phänotypes, denn sie "shrinken" nicht mehr und sind daher fast ebenso beweglich wie der N2-Wildtyp.

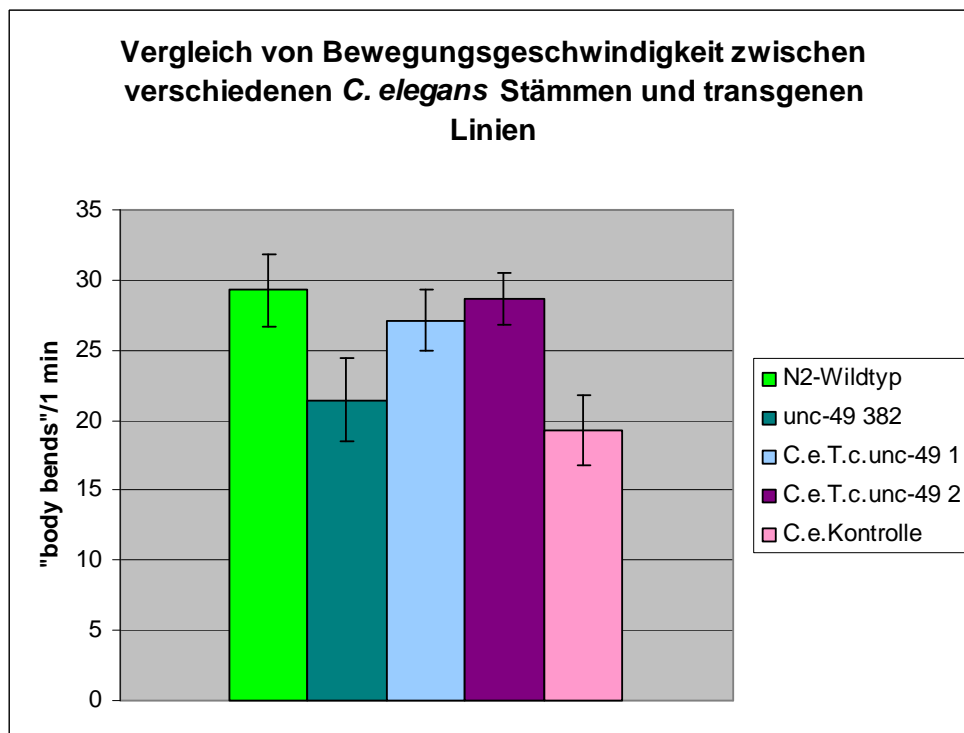


Abb. 4.36: Vergleich der Bewegungsgeschwindigkeit anhand der "body bends"/1 min von Wildtyp *C. elegans* (N2-Wildtyp in hellgrün), *unc-49 382* GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* (*unc-49 382* in dunkelgrün) und selbst erzeugten transgenen *C. elegans* Stämmen (*C.e.T.c.unc-49 1* in blau und *C.e.T.c.unc-49 2* in lila, sowie *C.e.Kontrolle* in rosa). Die Stämme *C.e.T.c.unc-49 1* und *C.e.T.c.unc-49 2* enthalten das eingefügte Plasmid mit dem *T. canis unc-49* Gen während der Stamm *C.e.Kontrolle* nur das leere Plasmid ohne das *unc-49* Gen enthält. Die Standardabweichung ist als schwarzer Balken angegeben.

	N2-Wildtyp	<i>unc-49 382</i>	<i>C.e.T.c.unc-49 1</i>	<i>C.e.T.c.unc-49 2</i>	<i>C.e.Kontrolle</i>
N2-Wildtyp	—	p< 0,001	ns	ns	p< 0,001
<i>unc-49 382</i>	—	—	p< 0,001	p< 0,001	ns
<i>C.e.T.c.unc-49 1</i>	—	—	—	ns	p< 0,001
<i>C.e.T.c.unc-49 2</i>	—	—	—	—	p< 0,001
<i>C.e.Kontrolle</i>	—	—	—	—	—

Tab. 4.16: Analyse von Unterschieden in der Bewegungsfähigkeit von Wildtyp *C. elegans*, *unc-49 382* GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* und selbst erzeugten transgenen *C. elegans* Stämmen auf Signifikanz. Es wurde der "Kruskal-Wallis" Test in Verbindung mit dem "Dunn's multiple comparison" Test verwendet. Nicht signifikante Unterschiede sind mit der Abkürzung "ns" gekennzeichnet.

Wie Tabelle 4.16 zeigt besteht ein höchst signifikanter Unterschied in der Bewegungsgeschwindigkeit zwischen N2-Wildtyp und *unc-49 382* Stamm (p<0,001). Die transgenen Stämme unterschieden sich ebenfalls höchst signifikant vom *unc-49 382* Stamm und sind in ihrer Bewegungsgeschwindigkeit ähnlich dem Wildtyp (p<0,001). Das zeigt deutlich, dass der GABA-Rezeptor "loss of function"

Phänotyp bei den transgenen *C. elegans* Linien verschwunden ist und stattdessen der Wildtyp Phänotyp durch die Injektion des *T. canis unc-49* Genes wieder hergestellt werden konnte. Bei der Kontrolle, einem transgenen Stamm, welcher nur das leere Plasmid ohne das Gen *unc-49* von *T.canis* enthielt, ist deutlich zu sehen, dass kein "rescue" erfolgte. Die Kontroll-Nematoden zeigten eine ebenso langsame Bewegung wie der Stamm *unc-49 382*.

4.5.4 "Rescue" Experiment: Bewegungsassay mit Muscimol

Desweiteren sollte überprüft werden, ob die transgenen *C. elegans* auch die starke Empfindlichkeit gegenüber dem GABA_A-Agonisten Muscimol durch den "rescue" zurück erlangen konnten. Wie bereits gezeigt wurde, ist der N2-Wildtyp sehr empfindlich gegenüber Muscimol, während die GABA_A-Rezeptor *unc-49B* "loss of function" Stämme gänzlich unempfindlich auf Muscimol reagieren. In Abbildung 4.37 ist gezeigt, dass sich die Anzahl der "body bends" sowohl beim Wildtyp als auch bei beiden transgenen Stämmen mit steigender Muscimolkonzentration verringert, während die *unc-49* Mutante *unc-49 382* selbst bei hohen Muscimolkonzentrationen, bei einer stetigen Anzahl von 20 "body bends"/1 min bleibt. Auch diese Reaktion konnte also in den transgenen Stämmen durch die Injektion des *unc-49* Genes von *T.canis* zurückgebildet werden.

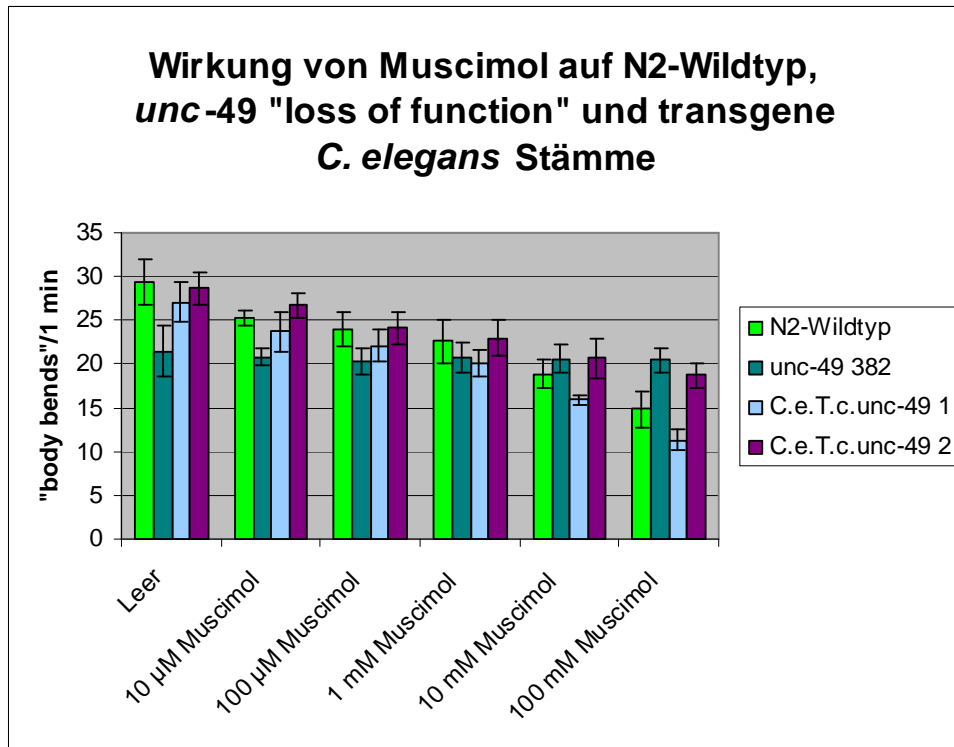


Abb. 4.37: Vergleich der Wirkung des GABA_A-Agonisten Muscimol auf Wildtyp *C. elegans* (N2-Wildtyp in hellgrün), *unc-49 382* GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* (*unc-49 382* in dunkelgrün) und selbst erzeugten transgenen *C. elegans* Stämmen (*C.e.T.c.unc-49 1* in blau und *C.e.T.c.unc-49 2* in lila) im Bewegungsassay. Die Balken zeigen den Mittelwert für n=20 gezählte Nematoden mit der Standardabweichung (SD) als schwarzem Balken.

Während sich der Stamm *C.e.T.c.unc-49 1* sogar als empfindlicher als der Wildtyp erwies, wie die Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 4.38 zeigt, ist der transgene Stamm *C.e.T.c.unc-49 2* deutlich weniger gehemmt als der Wildtyp. Aber auch der Stamm *C.e.T.c.unc-49 2* zeigt eine Empfindlichkeit gegenüber Muscimol, die sich deutlich von der Reaktion des *unc-49B* "loss of function" Stammes unterscheidet, aus denen der transgene Stamm hervorgegangen ist. Auch hier kann eindeutig ein erfolgreicher "rescue" des *unc-49B*-Phänotyps durch die Injektion des *T. canis* *unc-49B* cDNA Plasmids verzeichnet werden. Der Stamm *unc-49 382* unterscheidet sich signifikant von allen anderen getesteten Stämmen, da mit Hilfe einer Anova Varianzanalyse gezeigt werden konnte, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Konzentrationen gibt. Damit kann auch keine Dosis-Wirkungskurve angegeben werden, wie auch Abbildung 4.38 zeigt. Die Werte des GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stammes liegen als Gerade in der Nähe des Nullpunktes. Damit reagiert der *unc-49B* "loss

of function" Stamm signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Wildtyp und den transgenen Stämmen auf Muscimol.

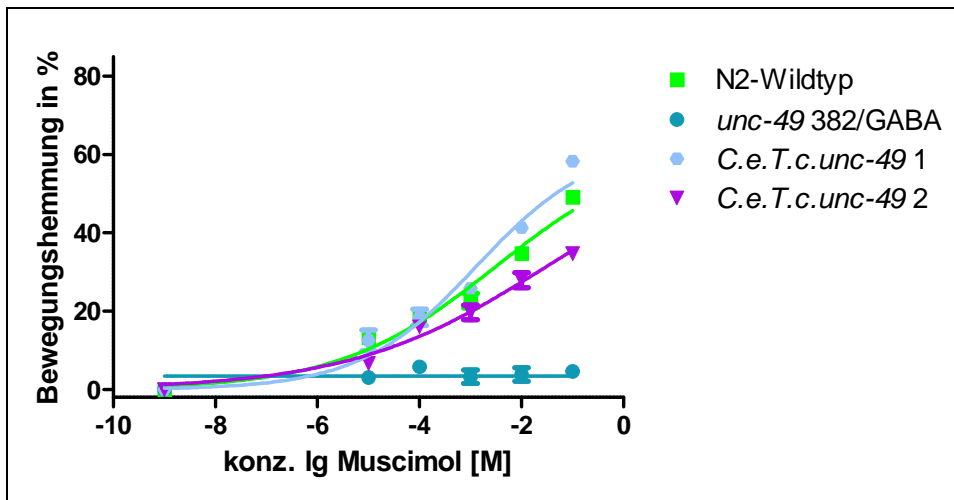


Abb. 4.38: Dosis-Wirkungskurve von Muscimol im Bewegungsassay mit Wildtyp *C. elegans* (N2-Wildtyp in hellgrün), *unc-49 382* GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* (*unc-49 382* in dunkelgrün) und selbst erzeugten transgenen *C. elegans* Stämmen (*C.e.T.c.unc-49 1* in blau und *C.e.T.c.unc-49 2* in lila). Das Minimum wurde auf 0 festgelegt, das Maximum wurde auf 63 % festgelegt. Dies geschah, um die Kurve mit der Kurve aus Abb. 4.6 vergleichbar zu machen, in der eine 63%ige Hemmung als maximal mögliche Hemmung durch Muscimol ausgemacht wurde. EC_{50} und Konfidenzintervalle sind in Tabelle 4.17 aufgeführt, Standardfehler (SEM) sind an den Kurven angegeben.

Tabelle 4.17 zeigt die Unterschiede in den EC_{50} Werten zwischen dem Wildtyp und den transgenen Linien. Für den Stamm *unc-49 382* konnte keine EC_{50} angegeben werden, da Muscimol auf ihn keine Wirkung hat. Es wird deutlich, dass der Stamm *C.e.T.c.unc-49 1* sensibler auf Muscimol reagiert als der Wildtyp. Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant ($p < 0,0016$). Der Stamm *C.e.T.c.unc-49 2* wird zwar von Muscimol beeinträchtigt, jedoch in höchst signifikant geringerem Maße als der Wildtyp ($p < 0,0003$). Der "rescue" ist im Falle des *C.e.T.c.unc-49 2* also nicht ganz vollständig, sondern nur partiell. Die Reaktion der beiden transgenen Linien auf das Muscimol deckt sich mit den vorausgegangenen Beobachtungen, nämlich dass der Stamm *C.e.T.c.unc-49 1* die injizierten Gene deutlich stärker exprimiert, da er auch stärkere Fluoreszenz zeigt, während der Stamm *C.e.T.c.unc-49 2* geringere Fluoreszenz und somit auch geringere Expression zeigt. Der Unterschied in der EC_{50} bei Behandlung mit

Muscimol ist zwischen den beiden transgenen Stämmen ebenfalls höchst signifikant ($p < 0,0003$).

Vergleicht man die hier erreichte EC_{50} des Wildtypes mit den Werten aus den früheren Muscimol Versuchen, so wird deutlich, dass die EC_{50} hier um etwa das Hundertfache erhöht ist, außerdem ist der Kurvenverlauf in Abbildung 4.38 unterschiedlich zu dem Kurvenverlauf aus Abbildung 4.6, welche zum früheren Muscimolversuch gehört. Die Werte erreichte hier kein Plateau wie das in Abbildung 4.6 der Fall ist. Da dort aber gezeigt werden konnte, dass bei 63 % die maximal mögliche Hemmung durch Muscimol erreicht ist, wurden den Kurven hier ein Maximum von 63 % gesetzt. Die etwas unterschiedliche Wirkung des Muscimol kann mit einem Chargenwechsel zusammenhängen.

	EC_{50}	p-Werte bei Vergleich mit N2	p-Werte nach Bonferoni Korrektur	p-Wert bei Vergleich mit C.eT.c.unc-49 1, Bonferoni korrigiert	R^2	Resistenz Faktor
N2-Wildtyp	3,218 mM (95% KI: 2,288-4,526 mM)				0,8602	
<i>C.e.T.c.unc-49 1</i>	1,318 mM (95% KI: 0,924-1,879 mM)	$p < 0,0004$	$p < 0,0016$		0,9211	0,4
<i>C.e.T.c.unc-49 2</i>	31,73 mM (95% KI: 18,47-54,52 mM)	$p < 0,0001$	$p < 0,0003$	$P < 0,0003$	0,8096	9,8

Tab. 4.17: Vergleich der EC_{50} Werte für die Behandlung von Wildtyp *C. elegans*, *unc-49 382* GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* und selbst erzeugten transgenen *C. elegans* Stämmen mit Muscimol im Bewegungsassay aus der Kurve in Abbildung 4.38.

4.5.5 "Rescue" Experiment: Bewegungsassay mit Emodepsid

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *unc-49* GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* weniger empfindlich auf Behandlungen mit dem Anthelminthikum Emodepsid reagieren als der Wildtyp. Es sollte überprüft werden, ob durch Einführen des *unc-49B* GABA_A-Rezeptors von *T. canis* in die *unc-49* GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* die volle Emodepsidempfindlichkeit des Wildtypes wiederhergestellt werden kann. Abbildung 4.39 zeigt einen Vergleich der "body bends" von Wildtyp *C. elegans*, GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* und den beiden transgenen *C. elegans* Linien *C.e.T.c.unc-49 1* und *C.e.T.c.unc-49 2*. Es wird deutlich, dass die GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* bezogen auf ihre ohnehin langsamere Fortbewegungsweise geringer in der Anzahl ihrer "body bends"

absinken als der Wildtyp. Bei den transgenen Linien erweist sich *C.e.T.c.unc-49 1* als empfindlicher im Vergleich zu *C.e.T.c.unc-49 2*, wie auch schon im Muscimolversuch. Die transgene Linie *C.e.T.c.unc-49 2* sinkt allerdings ebenfalls stärker in der Anzahl der "body bends" ab als der GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stamm *unc-49 382*.

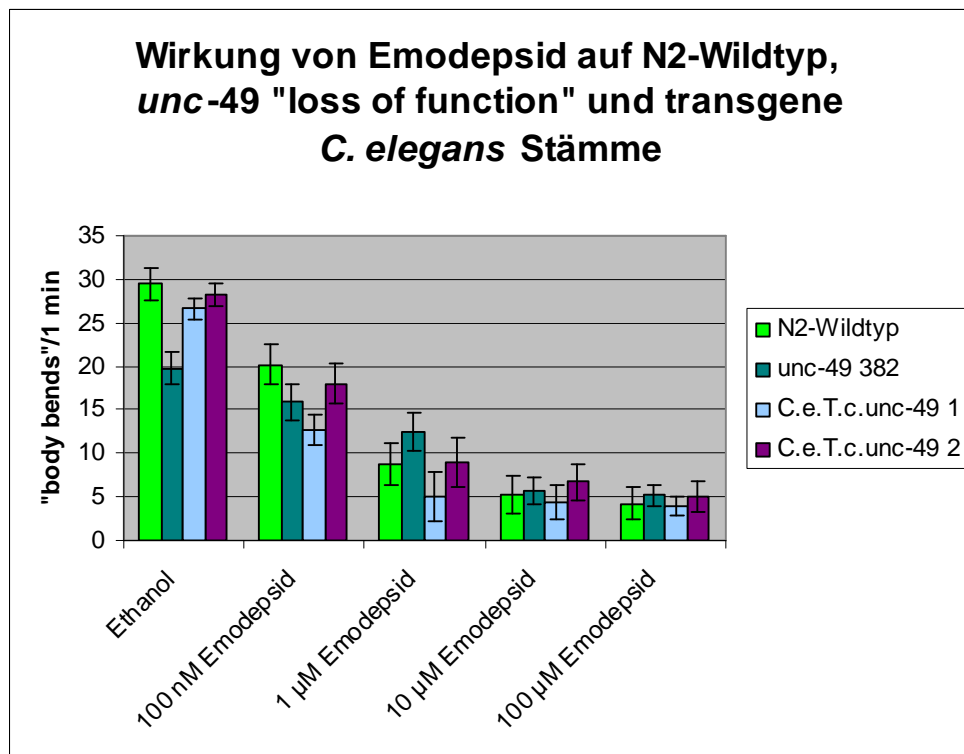


Abb. 4.39: Vergleich der Wirkung von Emodepsid auf Wildtyp *C. elegans* (N2-Wildtyp in hellgrün), *unc-49 382* GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* (*unc-49 382* in dunkelgrün) und selbst erzeugte transgene *C. elegans* Linien (*C.e.T.c.unc-49 1* in blau und *C.e.T.c.unc-49 2* in lila) im Bewegungsassay. Die Balken zeigen den Mittelwert für n=20 gezählte Nematoden mit der Standardabweichung (SD) als schwarzem Balken.

Noch deutlicher wird dies in der Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 4.40. Die Kurve des GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stammes *unc-49 382* liegt deutlich unterhalb der Kurven des Wildtypes und der transgenen Linien. Die transgenen Linien sind also durch die Einschleusung des Plasmids mit dem Gen *unc-49* von *T. canis* in ihrer Reaktion auf Emodepsid verändert worden und zwar in Richtung des Wildtypes. Während die *C. elegans* Linie *C.e.T.c.unc-49 1* sogar etwas empfindlicher geworden ist als der Wildtyp, sind die Kurven von Wildtyp und der transgenen Linie *C.e.T.c.unc-49 2* sehr ähnlich in ihrem Verlauf. Dies spricht für den Erfolg des "rescue" Experiments.

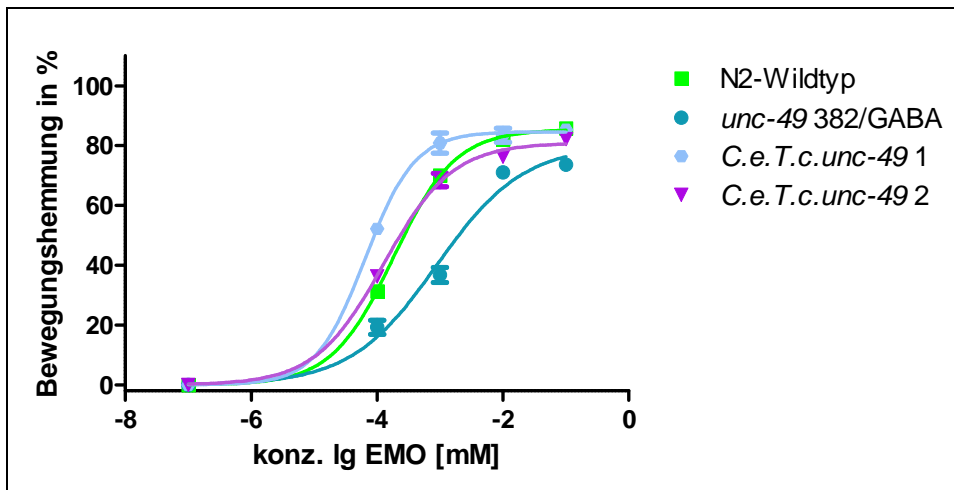


Abb. 4.40: Dosis-Wirkungskurve von Emodepsid im Bewegungsassay mit Wildtyp *C. elegans* (N2-Wildtyp in hellgrün), *unc-49 382* GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* (*unc-49 382* in dunkelgrün) und selbst erzeugten transgenen *C. elegans* Linien (*C.e.T.c.unc-49 1* in blau und *C.e.T.c.unc-49 2* in lila). Das Minimum wurde auf 0 % festgelegt, ein Maximum wurde nicht festgelegt. EC_{50} und Konfidenzintervalle sind in Tabelle 4.18 aufgeführt, Standardfehler (SEM) sind an den Kurven angegeben.

Die aus der Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 4.40 abgeleiteten EC_{50} Werte sind in Tabelle 4.18 aufgeführt. Auch hier wird deutlich, dass im Vergleich der EC_{50} Werte der Wildtyp und die transgene Linie *C.e.T.c.unc-49 2* in einem ähnlichen Bereich liegen, nämlich bei $0,018 \mu\text{M}$ und $0,013 \mu\text{M}$, während die EC_{50} der transgenen Linie *C.e.T.c.unc-49 1* mit $0,0065 \mu\text{M}$ deutlich niedriger liegt. Der EC_{50} Wert des GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stammes *unc-49 382* liegt mit $0,089 \mu\text{M}$ deutlich höher. Die EC_{50} Werte von beiden transgenen Linien sind höchst signifikant unterschiedlich zum EC_{50} Wert des GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stammes *unc-49 382* ($p < 0,0007$). Allerdings unterscheidet sich die transgene *C. elegans* Linie *C.e.T.c.unc-49 1* in ihrem EC_{50} Wert ebenfalls statistisch höchst signifikant vom Wildtyp ($p < 0,0007$). Der Unterschied zwischen Wildtyp und *C.e.T.c.unc-49 2* ist ebenfalls signifikant ($p < 0,0098$). Der Unterschied im EC_{50} Wert zwischen beiden transgenen Linien ist höchst signifikant ($p < 0,0007$). Betrachtet man den Resistenz Faktor, der sich aus dem Verhältnis der EC_{50} Werte errechnet, so wird deutlich, dass die Emodepsidresistenz, die beim GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stamm *unc-49 382* gegeben ist, durch die Einschleusung des *T. canis unc-49* bei den transgenen Linien entfernt werden konnte. Dies zeigt, dass das "rescue" Experiment erfolgreich war und

Ergebnisse

beweist die Beteiligung des GABA_A-Rezeptors *unc-49* am Emodepsidwirkmechanismus, sowie die Übertragbarkeit des *C. elegans* Modellsystems auf parasitische Nematoden, da der "rescue" mit einem Gen von *T. canis* durchgeführt werden konnte.

	EC ₅₀	p-Werte bei Vergleich mit N2	p-Werte nach Bonferoni Korrektur	p-Werte bei Vergleich zu <i>unc-49</i> 382	p-Werte nach Bonferoni Korrektur	R ²	Resistenz Faktor EC ₅₀
N2-Wildtyp	0,018 µM (95% KI: 0,0155-0,0218 µM)	—		p< 0,0001	p< 0,0007	0,9627	
<i>unc-49</i> 382	0,089 µM (95% KI: 0,0581-0,137 µM)	p< 0,0001	p< 0,0007	—		0,9071	4,9
<i>C.e.T.c. unc-49</i> 1	0,0065 µM (95% KI: 0,005-0,0084 µM)	p< 0,0001	p< 0,0007	p< 0,0001	p< 0,0007	0,9753	0,3
<i>C.e.T.c. unc-49</i> 2	0,013 µM (95% KI: 0,0104-0,0159 µM)	p<0,0098	p< 0,0098	p< 0,0001	p< 0,0007	0,9478	0,7

Tab. 4.18: Vergleich der EC₅₀ Werte für die Behandlung von Wildtyp *C. elegans*, *unc-49* 382 GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* und selbst erzeugten transgenen *C. elegans* Linien im Bewegungsassay mit Emodepsid aus der Kurve in Abbildung 4.40.

5. Diskussion

5.1 Überblick

Der Befall mit parasitischen Helminthen stellt weltweit ein hohes Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier dar. Die für die Behandlung von parasitären Infektionen eingesetzten Anthelminthika verlieren durch die Bildung von Resistenzen an Wirkung. Daher ist die Identifikation neuer Wirkstoffe, ihrer Zielstrukturen und möglicher Wechselwirkungen mit anderen Substanzen von großer Bedeutung (Kaplan, 2004). Die Aufklärung anthelminthischer Wirkmechanismen und Zielstrukturen kann helfen, neue Wirkstoffe gezielt zu synthetisieren und mögliche Resistenzmechanismen voraus zu ahnen (Martin, 1997). Weiterhin kann die Identifikation möglicher Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Substanzen zur Entwicklung neuer Kombinationspräparate beitragen und sogar resistenzbrechend wirken (Pittendrigh et al., 2000; Hu et al., 2010).

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich vor diesem Hintergrund mit der Aufklärung des Wirkmechanismus des Anthelminthikums Emodepsid. Mehrere Studien gaben bereits Hinweise darauf, dass der GABA-Rezeptor im Emodepsidwirkmechanismus eine Rolle spielt, da die Emodepsid Ursprungssubstanz PF1022A, an einen GABA_A-Rezeptor bindet und durch GABA_A-Antagonisten wie Bicuculline verdrängt wird (Chen et al., 1996; Harder et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte diese Hypothese überprüft werden. Da in *C. elegans unc-49* als einziger GABA_A-Rezeptor an der neuromuskulären Synapse lokalisiert ist, (Bamber et al., 1999; Richmond und Jorgensen, 1999), wurde er als geeigneter Kandidat für den Versuch identifiziert. Es wurde die Wirkung von Emodepsid auf *C. elegans* Wildtyp und GABA_A-Rezeptor *unc-49B* "loss of function" Stämme in verschiedenen Assays verglichen. Ferner wurde ein abschließendes "rescue" Experiment mit der, in dieser Arbeit identifizierten *T. canis unc-49B* Sequenz in GABA_A-Rezeptor *unc-49B* "loss of function" *C. elegans* Stämmen durchgeführt.

Darüber hinaus wurden die Wirkmechanismen der anthelminthischen Substanzen Piperazin, Tribendimidin und HLR-9291 mit verschiedenen *C. elegans* Mutanten überprüft und mögliche Wechselwirkungen zwischen Tribendimidin, HLR-9291 und Emodepsid im *C. elegans* Assay untersucht.

Damit leistet diese Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Wirkmechanismen der anthelminthischen Substanzen Emodepsid, Piperazin, Tribendimidin und HLR-9291 und erbringt außerdem wichtige Erkenntnisse im noch wenig untersuchten Bereich der anthelminthischen Wechselwirkungen.

5.2 *Caenorhabditis elegans* Assays zur Überprüfung von anthelminthisch wirksamen Substanzen gegen parasitische Nematoden

Der freilebende Nematode *C. elegans* ist bereits seit mehreren Jahrzehnten in vielen Wissenschaftsbereichen ein sehr beliebter Modellorganismus (Brenner, 1974; Riddle et al., 1997). Zu seinen zahlreichen Vorteilen gehört die Zellkonstanz bzw. die Möglichkeit, die Differenzierung jeder einzelnen Zelle im Körper des Nematoden zu verfolgen. *Caenorhabditis elegans* ist mit geringem Aufwand im Labor zu kultivieren. Gründe dafür sind seine anspruchslose, bakterivore Ernährungsweise und die Fähigkeit sowohl auf NGM-Agarplatten als auch in Flüssigkultur zu überleben. Durch seine Körpertransparenz sind wesentliche Vitalfunktionen gut zu beobachten. Sein Lebenszyklus ist schnell und unkompliziert und er toleriert Einfrieren bei -80 °C. Ebenfalls von großem Nutzen bei der Arbeit mit dem Nematoden im Bereich der Genetik ist das Vorliegen seines vollständig sequenziertes Genoms (Hodgkin et al., 1995).

Besonders in der Parasitologie bringt die Arbeit mit *C. elegans* als Modellsystem maßgebliche Vorteile. Meist haben parasitische Nematoden komplizierte Lebenszyklen, die einen oder mehrere Wirte mit einschließen und oft auch ein oder mehrere Stadien in der Außenwelt, welche wiederum spezifische Bedingungen zur Weiterentwicklung benötigen. Aus diesem Grund ist es schwierig oder bei den meisten Spezies sogar bislang unmöglich, sie im Labor bis zum Adultstadium heranzuzüchten und für Experimente zu verwenden (Gilleard, 2004; Holden-Dye und Walker, 2007). Es gibt eine kleine Zahl von Parasit-Wirt-Beziehungen, die auch im Labor aufrecht erhalten werden können (Gilleard, 2004) und es werden mit Eiern und Larven vieler parasitischer Nematoden auch *in vitro* Tests durchgeführt (Rew et al., 1986; Johansen 1989; Kotze et al., 2004). Adulte sind jedoch meist nur aus dem Wirt zu gewinnen, so dass eine große Anzahl Versuchstiere getötet werden müsste. Durch die Verwendung von *C. elegans* als Modellorganismus können somit viele Versuchstiere eingespart werden.

Vielfach stellt sich allerdings die Frage nach der Übertragbarkeit der im *C. elegans* Modellsystem gewonnenen Erkenntnisse auf parasitische Nematoden (Geary und Thompson, 2001; Gilleard, 2004; Holden Dye und Walker, 2007;). Parasitische Nematoden unterscheiden sich in ihrer Lebensweise erheblich von dem freilebenden Nematoden *C. elegans*. Ein Unterschied besteht beispielsweise in den bereits erwähnten komplexeren Lebenszyklen der Parasiten (Geary und Thompson, 2001; Gilleard, 2004; Holden-Dye und Walker, 2007). Auch in ihrer Größe können sich die parasitischen Nematoden stark von *C. elegans* unterscheiden, da manche Spezies bis zu 30 cm lang werden (Morand, 1996). Als der längste Nematode ist der Walnematode *P gigantissima* mit über 8 m Länge beschrieben (Gubanov, 1951).

Außerdem besiedeln parasitische Nematoden ein gänzlich anderes Habitat als *C. elegans*. Das innere Milieu des Körpers ihrer Wirte stellt deutlich andere Anforderungen an die parasitischen Nematoden als die äußere Umwelt, in der sich *C. elegans* aufhält. Parasitische Nematoden müssen beispielsweise an die pH-Werte und Temperaturen im Körper, sowie die Immunabwehr angepasst sein. Im Gegensatz dazu hat sich *C. elegans* eher an die Gegebenheiten in der Außenwelt angepasst, welche meist instabiler und variabler sind als in einem Wirtsorganismus (Bürglin et al., 1998; Gilleard, 2004; Ruiz-Lancheros et al., 2011). Dennoch muss hervorgehoben werden, dass von allen Forschungsbereichen in denen *C. elegans* als Modellorganismus genutzt wird, in der Parasitologie noch die engste Verwandtschaft zu den eigentlichen Studienobjekten besteht. *C. elegans* ist als Nematode eng mit den anderen Nematodenspezies verwandt, was für eine Übertragbarkeit der an *C. elegans* gewonnenen Ergebnisse günstig ist (Blaxter, 1998; Bürglin et al., 1998; Geary und Thompson, 2001). Nach 18S rRNA Untersuchungen zu urteilen, ist *C. elegans* ein Mitglied der Rhabditida und eng verwandt mit den parasitischen Strongylida (Bürglin et al., 1998). Nach dem System von Blaxter (1998) werden sowohl *C. elegans* als auch die Strongylida in "Clade" V eingeordnet.

Im Stammbaum der Nematoden stehen häufig freilebende und parasitische Arten eng beieinander, da sich der Parasitismus mehrfach unabhängig aus freilebenden Arten entwickelt hat. Dies unterstreicht die enge Verwandtschaft von parasitischen und freilebenden Nematoden und somit die hervorragende Eignung von *C. elegans* als Modellorganismus für parasitische Nematoden (Politz und Philipp,

1992; Bürglin et al., 1998). Der Grad der Übertragbarkeit der im *C. elegans* Modellsystem gewonnenen Erkenntnisse auf parasitische Nematoden erhöht sich mit der Nähe der Verwandtschaft. Man könnte also eine bessere Vergleichbarkeit mit zu den Strongylida gehörenden Arten wie *H. contortus* erwarten, als beispielsweise zu *Trichinella spiralis* (Gilleard, 2004).

Bei der Entscheidung, ob *C. elegans* ein geeigneter Modellorganismus für einen Versuch und zur Übertragung der Ergebnisse auf parasitische Nematoden ist, kommt es auch wesentlich auf die Art der zu vergleichenden Ergebnisse an. Die Anpassungen der Nematoden an die Immunabwehr des Wirtes, wie etwa durch cuticuläre Oberflächenantigene, ist beispielsweise an *C. elegans* nicht gut zu untersuchen, da *C. elegans* als freilebender Nematode nicht mit Wirtsimmunabwehr in Berührung kommt (Politz und Philipp, 1992; Gilleard, 2004). Dagegen ist aber beispielsweise der Grundaufbau des Nervensystems bei parasitischen Nematoden und *C. elegans* identisch (Angstadt et al., 1989) und deshalb gut vergleichbar (Holden-Dye und Walker, 2007). Da viele anthelminthische Substanzen auf das Nervensystem wirken, eignet sich hier *C. elegans* besonders gut als Modellorganismus. Darüber hinaus sind Acetylcholin und GABA in den Motoneuronen bei parasitischen Nematoden und *C. elegans* als die wichtigsten Neurotransmitter identifiziert worden (Johnson und Stretton, 1985; Johnson und Stretton, 1987). Da in dieser Arbeit die Beteiligung eines GABA-Rezeptors und verschiedener Acetylcholin-Rezeptoruntereinheiten in anthelminthischen Wirkmechanismen untersucht wurde, ist hier eine hohe Vergleichbarkeit gewährleistet. Hinzu kommt, dass in dieser Arbeit in den Assays mit *C. elegans* Funktionen des Wurmkörpers untersucht wurden, die im Allgemeinen für alle Nematoden gleich sind (Politz und Philipp, 1992). Im MTT-Assay wird nur die metabolische Aktivität der Zellen gemessen, was die Ergebnisse sowohl für *C. elegans* als auch parasitische Nematoden uneingeschränkt vergleichbar macht. Im Bewegungsassay wird die sinusoidale Schlängelbewegung verglichen, die sowohl freilebenden als auch den meisten parasitischen Nematoden zur Fortbewegung dient (Gray und Lissmann, 1964). Auch hier ist *C. elegans* als Modellsystem sehr gut geeignet, und die Ergebnisse sind daher auf parasitische Nematoden übertragbar. Einzig im Entwicklungsassay wird ein Bereich verglichen, der sich bei *C. elegans* und den parasitischen Nematoden unterscheiden könnte, jedoch auch hier nicht grundsätzlich, da sowohl

bei *C. elegans* als auch bei parasitischen Nematoden eine Entwicklung vom Ei über vier Larvenstadien bis zum Adulten stattfindet (Politz und Philipp, 1992). Einziger Unterschied ist, dass bei *C. elegans* diese Entwicklung vollständig in der Außenwelt stattfindet und bei parasitischen Nematoden teilweise in der Außenwelt und teilweise im Wirt. Dennoch ist die generell inhibierende Wirkung von anthelminthischen Substanzen auf den Entwicklungsvorgang bei *C. elegans* und parasitischen Nematoden vergleichbar, da die Entwicklung vom Prinzip her gleich verläuft und nur in unterschiedlichen Milieus stattfindet (Politz und Philipp, 1992).

In vielerlei Hinsicht sind sich die Mitglieder des Phylums Nematoda sehr ähnlich und zeigen eine hohe Uniformität in Entwicklung, Anatomie, Nervensystem und Cuticula (Politz und Philipp, 1992).

Desweiteren muss bedacht werden, dass anthelminthische Substanzen meist gegen unterschiedliche Nematodenspezies wirken und damit ein breites Wirkspektrum besitzen. Wenn also ohnehin von einer Wirkung gegen eine Vielzahl parasitischer Nematodenarten ausgegangen wird und diese auch zwischen vielen verschiedenen Nematodenarten vergleichbar ist, so kann auch ein freilebender Nematode wie *C. elegans* als Modellsystem dienen (Geary und Thompson, 2001). Dies begründet, dass *C. elegans* als Modellsystem in der Parasitologie von großem Wert ist, um daran die Wirkungsweise anthelminthischer Substanzen zu untersuchen. Die Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit der an *C. elegans* gewonnenen Erkenntnisse auf parasitische Nematoden ist bei den Assays, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, somit gewährleistet.

In der vorliegenden Arbeit wurde der freilebende Nematode *C. elegans* genutzt, um die Wirkungsweise verschiedener anthelminthischer Substanzen zu überprüfen. Dazu wurden drei verschiedene *C. elegans* Assays etabliert und genutzt: der MTT-Assay, der Bewegungsassay und der Entwicklungsassay. Alle drei Assays wurden bereits in anderen Arbeitsgruppen erfolgreich zur Untersuchung von Hemmstoffen genutzt (James und Davey, 2007; Guest et al., 2007; Hu et al., 2009).

5.2.1 MTT-Assay

Der eigentlich für die Zellkultur entwickelte MTT-Assay nutzt den Farbumschlag bei der Umsetzung von MTT zu Formazan in lebenden Zellen zur Messung des Überlebens anhand von metabolischer Aktivität. Dieser Assay wurde, nachdem er

bereits erfolgreich für Säugetierzellen (Mosmann, 1983) sowie Mikro- und Makro-*Fillarien* genutzt wurde (Comley et al., 1989), von einer australischen Arbeitsgruppe 2007 für die schnelle quantitative Analyse der Wirkung anthelminthischer Substanzen auf *C. elegans* verwendet (James und Davey, 2007). Die Wirkung von Ivermectin und kurzkettigen Alkoholen auf *C. elegans* konnte mit Hilfe des MTT-Assays erfolgreich überprüft werden (James und Davey, 2007). Daher sollte in dieser Arbeit der MTT-Assay für den Vergleich der Wirkung des Anthelminthikums Emodepsid auf *C. elegans* Wildtyp und GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme genutzt werden. In den ersten Vorversuchen mit Bakterien des Stammes *E. coli* OP50 wurde deutlich, dass der Versuch mit Zellen gut funktioniert. Es ergab sich im Vergleich zur Kontrolle ohne Bakterien oder Ansätzen mit abgetöteten Bakterienzellen eine deutlich messbare 1000-fache Erhöhung der Formazanproduktion in den Ansätzen, welche lebende Bakterienzellen enthielten. Bei den Versuchen mit *C. elegans* wurde jedoch deutlich, dass der Versuch nicht wie bei James und Davey (2007) zu reproduzieren war. Die OD₅₇₅ Werte, die mit *C. elegans* im MTT-Assay erreicht werden konnten, waren mehr als 10-fach niedriger als die von James und Davey, (2007) publizierten Werte. Zwar war eine deutliche Korrelation zwischen der Anzahl eingesetzter lebendiger Nematoden und der Formazanproduktion zu erkennen, wie sie auch für Säugetierzellen beschrieben ist (Mosmann, 1983), jedoch stiegen die gemessenen OD₅₇₅ Werte erst bei so hohen Wurmanzahlen auf ein von der Kontrolle ohne Bakterien signifikant unterschiedliches Niveau, dass der Assay dadurch unpraktikabel in der Durchführung wurde, da für jeden Versuch mehrere zehntausend *C. elegans* benötigt würden. Nach mündlicher Rücksprache mit der australischen Arbeitsgruppe, welche den Versuch zuvor erfolgreich durchgeführt hatte, aber ihn inzwischen auch nicht mehr reproduzieren konnte (James und Davey, 2009, mündl.), und der Firma, welche das MTT vertreibt, kann angenommen werden, dass der Assay auf Grund einer Änderung in der MTT-Formulierung mit Nematoden nicht mehr durchzuführen ist. Die Art der Änderung in der MTT-Formulierung wurde von der Vertriebsfirma nicht näher erläutert. Da der Assay mit Zellen nach wie vor funktioniert, wie auch in dieser Arbeit festgestellt werden konnte, muss das Problem Nematoden-spezifisch sein. Nematoden besitzen im Gegensatz zu Zellen beispielsweise eine Cuticula. Möglicherweise kann das MTT in der neuen Formulierung diese weniger effizient

durchdringen und aus diesem Grund wird auch weniger MTT zu Formazan umgesetzt. In einer Studie zum Stofftransport durch die Cuticula von *A. suum* konnte gezeigt werden, dass der Transport von Peptiden durch die *A. suum* Cuticula 10-fach langsamer ablief als der Transport durch Wirbeltierzellmembranen. Viele der untersuchten Peptide waren auch überhaupt nicht in der Lage, die Cuticula-Hypodermis-Barriere der Nematoden zu durchdringen (Sheehy et al., 2000). Dieselbe Studie zeigte auch, dass Peptide mit einer größeren Anzahl Methylgruppen einfacher durch die Cuticula-Hypodermis-Barriere transportiert werden. Je mehr Methylgruppen ein Peptid besaß, umso höher wurde die Permeabilität der Cuticula für dieses Peptid (Sheehy et al., 2000). Es ist nicht bekannt was an der Formulierung des MTT geändert wurde, jedoch können schon leichte Veränderungen an der MTT-Formulierung dazu geführt haben, dass es weniger effizient in der Lage ist, durch die Cuticula der Nematoden zu dringen. Auf Grund der eigenen Untersuchungen kann der MTT-Assay weiterhin für Zellen empfohlen werden, jedoch nicht mehr für den Ansatz mit Nematoden.

5.2.2 Bewegungsassay

Im Bewegungsassay sollte die Wirkung des Anthelminthikums Emodepsid auf *C. elegans* Wildtyp und GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme direkt anhand ihrer Bewegungsfähigkeit überprüft werden. Hierdurch sollten Hinweise auf die Beteiligung des GABA_A-Rezeptors *unc-49* im Emodepsidwirkmechanismus gewonnen werden. Dieser *C. elegans* Assay wurde verwendet, da er schon mehrfach erfolgreich zur Identifikation von anthelminthischen Wirkmechanismen eingesetzt wurde, unter anderem auch schon zur Überprüfung möglicher Zielstrukturen für das auch hier untersuchte Anthelminthikum Emodepsid (Guest et al., 2007; Welz et al., 2011). Insofern ist es für die Vergleichbarkeit mit früheren Studien zu anderen möglichen Zielstrukturen des Anthelminthikums Emodepsid, wie etwa zum Kalzium-aktivierten Kaliumkanal *slo-1* (Guest et al., 2007; Welz et al., 2011), sinnvoll, den gleichen Assay auch für die Überprüfung der Beteiligung des GABA_A-Rezeptors *unc-49* im Emodepsidwirkmechanismus durchzuführen.

Der Assay wurde zunächst mit dem Neurotransmitter GABA, dem GABA-Agonist Muscimol und dem putativ GABA-agonistisch wirkenden Anthelminthikum

Piperazin durchgeführt, um den Assay zu etablieren und seine Effizienz zu testen. Anschließend wurde die Wirkung des Anthelminthikums Emodepsid auf *C. elegans* Wildtyp und GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* mit Hilfe des Bewegungsassays getestet. Der Bewegungsassay wurde später auch für das "rescue" Experiment mit den transgenen *C. elegans* Linien verwendet.

5.2.3 Entwicklungsassay

Im Entwicklungsassay sollte die inhibierende Wirkung der anthelminthisch wirksamen Substanzen Muscimol, Piperazin, Emodepsid, Tribendimidin und HLR-9291 auf die Entwicklung von *C. elegans* Wildtyp und verschiedenen genetisch veränderten *C. elegans* Stämmen überprüft werden, um so mögliche Zielstrukturen der getesteten Anthelminthika identifizieren zu können. Ein ähnlicher Assay wurde bereits erfolgreich mit Tribendimidin und den hier verwendeten Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" Stämmen *unc-29*, *unc-38*, *unc-63*, *lev-1* und *lev-8* durchgeführt (Hu et al., 2009). Er wurde hier leicht verändert durchgeführt, indem eine höhere Wurmanzahl in den Assay eingesetzt wurde, um die Repräsentativität der Ergebnisse zu erhöhen. Außerdem wurden sowohl die entwickelten als auch die nicht-entwickelten Stadien ausgezählt. Der Assay wurde ausgewählt, da es bereits eine erfolgreiche Studie mit Tribendimidin in diesem Assay gab (Hu et al., 2009) und somit die Ergebnisse mit dem Tribendimidin Derivat HLR-9291, Emodepsid und Piperazin gut mit den Ergebnissen aus der früheren Studie vergleichbar waren. Der Entwicklungsassay hat gegenüber dem Bewegungsassay den Vorteil, dass wesentlich mehr Nematoden pro Versuch ausgezählt werden können und damit die Ergebnisse statistisch besser ausgewertet werden können.

5.3 Wirkung des Neurotransmitters GABA auf *C. elegans* Wildtyp und GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" Stämme

Die Bindung des Neurotransmitters GABA an den GABA_A-Rezeptor *unc-49* an der neuromuskulären Synapse bewirkt durch erhöhte Leitfähigkeit für Chloridionen eine Hyperpolarisation der Membran und eine postsynaptische Hemmung, welche den Muskel erschlaffen lässt (Iravani, 1965). Das abwechselnde Anspannen und Erschlaffen der dorsalen und ventralen Muskeln des Nematodenkörpers bewirkt die schlängelnde Fortbewegung der Nematoden (McIntire et al., 1993). Die

Hypothese für den ersten Versuch zur Etablierung des Bewegungsassays mit GABA war deshalb, dass bei einem Überschuss von GABA in der Umgebung die *C. elegans* Wildtyp-Nematoden in eine schlaffe Paralyse fallen, da ihre GABA-Rezeptoren permanent durch GABA aktiviert werden. Die *C. elegans unc-49* "loss of function" Stämme sollten nicht beeinträchtigt werden, da sie keinen funktionsfähigen GABA_A-Rezeptor *unc-49* besitzen. Dies konnte allerdings in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden. Zwar reagierte der Wildtyp mit stärkerer Bewegungshemmung auf GABA, jedoch waren die Ergebnisse schlecht reproduzierbar und die Daten sehr schwankend. Außerdem wurde auch der GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" Stamm durch hohe GABA-Konzentrationen leicht gehemmt, obwohl er keinen GABA_A-Rezeptor *unc-49* an der neuromuskulären Synapse besitzt, an den GABA binden könnte. Entweder wurden auch GABA-Rezeptoren in anderen Neuronen durch die Behandlung mit GABA beeinträchtigt, was somit zur indirekten Bewegungshemmung des GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" Stammes geführt haben könnte oder die Hemmung wurde möglicherweise gar nicht hauptsächlich durch GABA ausgelöst, sondern vielmehr durch die hohe osmotische Wirkung, die die großen eingesetzten Wirkstoffmengen von bis zu 500 mM erzeugten. In diesem Falle wären sowohl der Wildtyp als auch der GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" Stamm beeinträchtigt. Es ist beschrieben, dass starker osmotischer Stress die Bewegungsfähigkeit von *C. elegans* einschränken kann (Solomon et al., 2004). Eine Konzentration von 500 mM NaCl über 24 h im Medium ist sogar für fast 90 % der *C. elegans* tödlich (Solomon et al., 2004). Die hohen GABA-Konzentrationen könnten eine ähnliche, wenn auch osmotisch schwächere, Wirkung gehabt haben. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte sein, dass GABA möglicherweise gar nicht oder nur unzureichend in der Lage ist, aus dem Agar über die Cuticula in die Nematoden einzudringen, da diese Barriere für viele Stoffe nicht zu überwinden ist (Sheehy et al., 2000) und dass deshalb die Ergebnisse nicht reproduzierbar waren. Dafür würde auch die Tatsache sprechen, dass sehr hohe Mengen an GABA in den Versuch eingesetzt werden mussten, bevor überhaupt eine leichte Hemmung erzeugt werden konnte.

Da mit diesem Ergebnis die Funktionsfähigkeit des Bewegungsassays nicht dargestellt werden konnte, wurden weitere Versuche zur Etablierung des Systems mit dem Antheminthikum Piperazin und dem Pilzgift Muscimol, durchgeführt.

5.4 Wirkmechanismus des Anthelminthikums Piperazin

Schon 1964 wurde vermutet, dass Piperazin als Agonist eines natürlichen inhibitorischen Transmitters wirkt (Del Castillo et al., 1964). Heute wird dem Piperazin eine schwach GABA-agonistische Wirkung zugeschrieben (Martin, 1985; Martin, 1997; Köhler, 2001). Dabei sollte es an GABA-Rezeptoren der somatischen Muskelzellen binden, dort zu einem Einstrom von Chloridionen führen und damit zu einer Erschlaffung des Muskels (Martin, 1985; Martin, 1997; Köhler, 2001).

Diese Vermutung konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Piperazin wirkt sowohl im Bewegungsassay als auch im Entwicklungsassay ebenso stark hemmend auf den Wildtyp wie auf die GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" Stämme und dies auch schon bei einer Konzentration von 50 mM. Damit können osmotische Effekte hier ausgeschlossen werden. Möglicherweise wirkt Piperazin also doch nicht auf den GABA_A-Rezeptor *unc-49* und verfügt stattdessen über einen anderen Wirkmechanismus. Oder es wirkt nicht auf den GABA_A-Rezeptor *unc-49* an der neuromuskulären Synapse, sondern auf einen anderen GABA_A-Rezeptor in *C. elegans*.

Es gibt unterschiedliche Ansichten über die Piperazinwirkungsweise. Neben der GABA-agonistischen Wirkung wird von einigen Autoren auch eine mögliche unspezifische Blockade des Acetylcholin-Rezeptors als Piperazinwirkmechanismus angenommen (Courtney, 1995; Islam et al., 2006). Weiterhin wird eine dem Curare ähnliche Wirkung des Piperazins als kompetitiver Acetylcholin-Antagonist vermutet (Aubry et al., 1970). Dies kann allerdings in dieser Arbeit für die untersuchten Acetylcholin-Rezeptoruntereinheiten ebenfalls nicht bestätigt werden, da die Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme im Entwicklungsassay keinerlei Unempfindlichkeit gegenüber Piperazin zeigten. Allerdings besitzt *C. elegans* noch weitere Acetylcholin-Rezeptoruntereinheiten, die in dieser Arbeit nicht getestet wurden und auf die eine Wirkung daher nicht ausgeschlossen werden kann. Insgesamt sind für *C. elegans* 27 verschiedene Acetylcholin-Rezeptoruntereinheiten beschrieben (Rand, 2007).

Keiner der in beiden Assays eingesetzten genetisch veränderten Stämme zeigt gegenüber Piperazin eine höhere Toleranz als der Wildtyp. Weder die GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme, noch die Acetylcholin-Rezeptor "loss

of function" Stämme sind gegenüber Piperazin geringer empfindlich. Deshalb könnte auch ein anderer Wirkmechanismus für die Wirkung von Piperazin verantwortlich sein.

Eine mögliche Wirkung von Piperazin könnte die Blockade der Produktion von Bernsteinsäure (Succinat) im Metabolismus der Nematoden sein (Bueding et al., 1959; Courtney, 1995). In Leberegeln, vielen Nematoden und den meisten Cestoden ist die Succinatbildung mit einer ATP-Synthese verknüpft, bei der es sich um eine Elektronentransport-vermittelte Phosphorylierung handelt. Dabei verläuft die Fumaratreduktion zu Succinat im Prinzip durch Umkehr der letzten Schritte des Citratzyklus. Die Succinatbildung in Helminthen ist mit dem mitochondrialen Elektronentransport aerober Organismen vergleichbar, läuft jedoch ohne Beteiligung von Sauerstoff ab und wird daher als anaerobe Atmung bezeichnet (Hiepe et al., 2005). In einer Studie konnte bestätigt werden, dass Piperazin die Bildung von Succinat in *A. suum* signifikant absenkt. Es konnte eine starke Korrelation zwischen dem paralyisierenden Effekt des Piperazins und der inhibierenden Wirkung auf die Succinatproduktion festgestellt werden (Bueding et al., 1959). Es wurde vermutet, dass die Succinatbildung Energie für die Muskelkontraktion liefert und ihre Blockade durch Piperazin so zu einer schlaffen Paralyse führt (Bueding et al., 1959). Dies könnte auch in *C. elegans* erfolgen, da gezeigt wurde, dass auch in *C. elegans* wie bei parasitischen Nematoden anaerobe Atmung unter Succinatbildung ablaufen kann, wenn kein Sauerstoff zur Verfügung steht oder während der Hypobiose als Dauerlarve (Cooper und Van Gundy, 1970; Holt und Riddle, 2003).

Der Wirkmechanismus von Piperazin kann hier nicht abschließend geklärt werden, jedoch geben die vorliegenden Ergebnisse Anlass zur Vermutung, dass der GABA_A-Rezeptor *unc-49* und auch die untersuchten Acetylcholin-Rezeptoruntereinheiten nicht in den Wirkmechanismus involviert sind.

5.5 Wirkung des GABA_A-Agonisten Muscimol auf *C. elegans* Wildtyp und GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" Stämme

Mit Hilfe des GABA_A-Agonisten Muscimol, konnte die Funktionsfähigkeit und erfolgreiche Etablierung des Bewegungsassays bestätigt werden. Es zeigte sich, dass die Wirkung von Muscimol auf den *C. elegans* Wildtyp und die GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme sehr unterschiedlich ist.

Die Wildtyp *C. elegans* wurden durch Muscimol deutlich in ihrer Bewegungsfähigkeit gehemmt, während die GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme in ihrer Beweglichkeit uneingeschränkt blieben. Dies wurde auch so erwartet, da Muscimol als GABA_A-Agonist nur an den GABA_A-Rezeptor UNC-49 des Wildtyps binden kann und dort auf dieselbe Weise wie GABA zu einer Muskeler schlaffung führt (Macdonald und Olsen, 1994). Bei den GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämmen wird kein Rezeptor exprimiert, an den Muscimol binden könnte, weshalb auch keine Hemmung auftritt (McIntire et al., 1993).

Im Entwicklungsassay war die Hemmung des Wildtyps durch Muscimol deutlich schwächer ausgeprägt, die EC₅₀ lag im Entwicklungsassay ca. tausendmal höher als im Bewegungsassay. Möglicherweise waren die Nematoden trotz Bewegungshemmung noch in der Lage, sich zu entwickeln. Da sie in Flüssigmedium mit Nahrung geschüttelt wurden, war kein aktives zum Futter hin Bewegen nötig, weshalb sie sich möglicherweise trotz geringer Beweglichkeit weiter entwickeln konnten. Da im Entwicklungsassay auch die GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme bei den höchsten Muscimolkonzentrationen leicht gehemmt wurden, könnte es sein, dass Muscimol nicht nur auf den GABA_A-Rezeptor an der neuromuskulären Synapse wirkt. Möglicherweise gibt es auch eine Wirkung auf andere GABA_A-Rezeptoren im Nematodennervensystem, wovon dann auch die GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme betroffen wären. Dabei handelt es sich dann nicht um direkte bewegungshemmende Auswirkungen jedoch gegebenenfalls um entwicklungshemmende Effekte. Allerdings sind diese nicht so gravierend wie die bewegungsinhibierenden Effekte.

5.6 Wirkmechanismus des Anthelminthikums Emodepsid

Die Beteiligung des GABA_A-Rezeptors UNC-49 im Emodepsidwirkmechanismus konnte mit Hilfe des Bewegungsassays und des Entwicklungsassays anhand von Vergleichen zwischen *C. elegans* Wildtyp und GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämmen bestätigt werden. Sowohl im Bewegungsassay als auch im Entwicklungsassay erwiesen sich die GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme als signifikant geringer Emodepsid-empfindlich als der *C. elegans* Wildtyp.

Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Ergebnissen, die in Studien an PF1022A, der Grundverbindung des Anthelminthikums Emodepsid, durchgeführt wurden. In einer elektrophysiologischen Studie an *Angiostrongylus cantonensis* konnte nachgewiesen werden, dass PF1022A zu einer Bewegungshemmung bei Nematoden führt. Diese Bewegungshemmung konnte durch Zugabe von GABA_A-Antagonisten wie Picrotoxin und Bicuculline partiell wieder aufgehoben werden (Terada, 1992). Dies führte zu dem Schluß, dass PF1022A die Bewegung des Wurms durch die Stimulanz des GABA_A-Rezeptors hemmt und deshalb auch die Lähmung durch Zugabe von GABA_A-Antagonisten teilweise aufgehoben werden kann (Harder et al., 2003). Außerdem konnte eine Bindung von PF1022A an GABA_A-Rezeptoren im isolierten *A. suum* Muskel gezeigt werden (Chen et al., 1996), was ebenfalls darauf schließen lässt, dass der GABA_A-Rezeptor an der neuromuskulären Synapse im Wirkmechanismus von PF1022A eine Rolle spielt (Chen et al., 1996; Harder et al., 2003). Da eine Beteiligung des GABA_A-Rezeptors an der neuromuskulären Synapse im Wirkmechanismus von PF1022A in diesen Studien gezeigt wurde, sollte auch seine Rolle im Emodepsidwirkmechanismus in dieser Arbeit überprüft werden. Es konnten mehrere Indizien gefunden werden, die auch eine Beteiligung des GABA_A-Rezeptors im Emodepsidwirkmechanismus bestätigen.

Die Anzahl der "body bends" der GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* verringert sich mit steigender Emodepsidkonzentration weniger stark als die des *C. elegans* Wildtyp Stammes. Besonders bei den höchsten Dosierungen blieben die GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* besser beweglich als der Wildtyp. Dies zeigte auch die Dosis-Wirkungskurve. Der Unterschied in EC₅₀ und maximaler Hemmung zwischen den Wildtyp *C. elegans* und den GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämmen ist höchst signifikant ($p < 0,0002$). Besonders bei den höchsten Konzentrationen wird ein Unterschied in der Emodepsidwirkung zwischen Wildtyp und GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämmen hinsichtlich der Überlebensrate deutlich. Es überleben bei 100 µM Emodepsidkonzentration nach 24 h alle Individuen der GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme, während 50 % des Wildtyps absterben. Dies ist ein deutlicher Beleg für die geringere Empfindlichkeit der GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme und somit ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung des

GABA_A-Rezeptors UNC-49 im Emodepsidwirkmechanismus. In einer zweiten Dosis-Wirkungskurve aus den gleichen Daten jedoch mit festgesetztem Minimum auf 0 % und Maximum auf 100 % sind die EC₅₀ Werte der Kurven noch eindrucksvoller zu vergleichen. Hier wird deutlich, wie stark sich die Emodepsidwirkung zwischen Wildtyp und Mutanten unterscheidet. Der Unterschied in den EC₅₀ Werten für die einzelnen Stämme gegenüber dem Wildtyp ist mit $p < 0,002$ und $p < 0,0016$ statistisch hoch signifikant. Noch deutlicher wird der Unterschied in den aus den bekannten Werten extrapolierten EC₉₅ Werten. Die EC₉₅ liegt für den Stamm *unc-49 407* ca. 50-fach und für den Stamm *unc-49 382* sogar ca. 100-fach höher als für den Wildtyp.

Beide Möglichkeiten der Datenanalyse mittels logistischer Regression zeigen hoch bzw. höchst signifikante Unterschiede zwischen der Reaktion des Wildtyps und der GABA_A Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme auf die Behandlung mit Emodepsid.

Die in diesem Experiment gezeigte geringere Emodepsidempfindlichkeit der GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme konnte im Entwicklungsassay bestätigt werden. Der Wildtyp wird stärker durch Emodepsid in seiner Entwicklung gehemmt als die GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme. Die EC₅₀ Werte der GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme liegen zweimal bis dreimal höher als die EC₅₀ des Wildtyps. Der Unterschied ist statistisch höchst signifikant ($p < 0,0006$). Auch hier bestätigt sich also wieder, dass die GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme geringer empfindlich auf Emodepsid reagieren als der Wildtyp. Somit liegt eine Beteiligung des GABA_A-Rezeptors *unc-49* im Emodepsidwirkmechanismus nahe. Abschließend konnte dies auch durch ein "rescue" Experiment bestätigt werden, welches im Folgenden noch eingehend erläutert wird.

Wie die gewonnenen Daten aber auch zeigen, handelt es sich jedoch im Falle der GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme nicht um eine vollständige Emodepsidresistenz, wie sie für den Stamm *slo-1 js379* beschrieben ist (Guest et al., 2007; Holden-Dye et al., 2007; Welz et al., 2011) und auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, sondern um eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Emodepsid. Man kann somit schlussfolgern, dass möglicherweise der Kalzium-aktivierte Kaliumkanal *slo-1* das Hauptziel von Emodepsid ist, in der

gesamten Wirkkaskade aber auch der GABA_A-Rezeptor UNC-49 eine Rolle spielt. Möglicherweise spielen in der Emodepsidwirkkaskade auch noch andere Rezeptoren eine Rolle. Grund zu dieser Annahme besteht, da in dieser Arbeit auch herausgefunden werden konnte, dass neben den GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämmen auch einige der Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme eine Unempfindlichkeit gegenüber Emodepsid zeigen. Alle untersuchten Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme haben im Vergleich zum Wildtyp eine nach rechts verschobene Dosis-Wirkungskurve. Zumindest für die Stämme *lev-1* und *unc-38* ist der Unterschied in der EC₅₀ zum Wildtyp statistisch höchst bzw. hoch signifikant ($p < 0,0006$ bzw. $p < 0,0015$). Möglicherweise bezieht der Emodepsidwirkmechanismus also mehrere Rezeptoren mit ein, wobei die Hauptwirkung über den Rezeptor *slo-1* vermittelt wird, aber der GABA_A-Rezeptor *unc-49* und Acetylcholin-Rezeptoren als Nebenziele fungieren. Dabei ist nicht sicher, ob eine Beteiligung des GABA_A-Rezeptors *unc-49* und der Acetylcholin-Rezeptoren in der Wirkkaskade von Emodepsid dem Rezeptor SLO-1 vor- oder nachgeschaltet sind. Genauere Erkenntnisse zur Reihenfolge der Rezeptoren im Emodepsid Wirkmechanismus liegen nicht vor.

Weiterhin wäre es möglich, dass der GABA_A-Rezeptor *unc-49* keine direkte Rolle in der Emodepsidwirkkaskade spielt, aber auf verschiedenen Wegen trotzdem die Emodepsidempfindlichkeit beeinflusst. Die GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme haben durch den Verlust des GABA_A-Rezeptors UNC-49 ohnehin eine andersartige Bewegungsweise als Wildtyp *C. elegans*. Da ihre Muskeln sich nicht durch Bindung von GABA ventral und dorsal abwechselnd entspannen können, ist ihre Schlängelbewegung wesentlich langsamer als beim Wildtyp und sie neigen dazu, ihren Körper zusammenzuziehen, was als "shrinken" bezeichnet wird (Bamber et al., 1999; Bamber et al., 2005; Jorgensen, 2005). Es wäre möglich, dass durch diese alternative Fortbewegungsweise mehr Emodepsid als beim Wildtyp nötig ist, um sie bewegungsunfähig zu machen.

Des Weiteren könnte es sich auch um einen gegenläufigen Prozess zwischen den Phänotypen handeln, denn während der Verlust des GABA_A-Rezeptors UNC-49 phänotypisch bei den Nematoden praktisch zu einer permanenten Muskelkontraktion führt, bewirkt Emodepsid das Gegenteil, nämlich eine schlaffe Paralyse (Willson et al., 2003). Es wäre möglich, dass Emodepsid beim Wildtyp

wesentlich schneller die maximale Hemmung erreicht als bei den GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämmen, weil diese durch ihre phänotypische Ausprägung von permanent kontrahierten Muskeln erst langsamer von der schlaffen Paralyse erfasst werden.

Außerdem ist bekannt, dass es enge Verbindungen zwischen verschiedenen Signaltransduktionswegen gibt und sie sich gegenseitig beeinflussen können (Knight und Knight 2001; Kunkel und Brooks, 2002). Daher ist es möglich, dass die Störung eines neuronalen Rezeptors auch andere Signaltransduktionswege in Mitleidenschaft zieht. Selbst wenn der GABA_A-Rezeptor *unc-49* nicht direkt in die Emodepsidwirkkaskade involviert ist, könnte es trotzdem sein, dass die Störung der GABA-vermittelten Signaltransduktion auch geringe Auswirkungen auf andere Signaltransduktionskaskaden, wie hier den Emodepsidwirkmechanismus, hat. Dafür würde sprechen, dass auch bei den Acetylcholin-Rezeptor Mutanten beobachtet werden konnte, dass der Verlust bestimmter Untereinheiten die Nematoden unempfindlicher gegenüber Emodepsid macht.

5.7 Wirkmechanismus des Anthelminthikums Tribendimidin

Über das Anthelminthikum Tribendimidin ist aus früheren Studien bekannt, dass es über einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Levamisol und Pyrantel verfügt und ebenfalls auf den Acetylcholin-Rezeptor wirkt (Hu et al., 2009). Es ist ein L-Subtyp Acetylcholin-Rezeptor-Agonist und die Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme *unc-38*, *unc-63*, *unc-29*, *lev-1* und *lev-8* zeigen Resistenz gegenüber Tribendimidin (Hu et al., 2009).

Letzteres konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Alle getesteten Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme außer *unc-29*, welches nicht mit getestet werden konnte, waren im Vergleich zum Wildtyp resistent gegenüber Tribendimidin. Allerdings gab es leichte Unterschiede in der Stärke der Resistenz. Zwei Stämme *lev-1* und *lev-8* wiesen bei der höchsten Tribendimidinkonzentration leichte Beeinträchtigungen auf. Der Unterschied in der Hemmung bei der höchsten Tribendimidinkonzentration war zwischen den empfindlicheren Stämmen *lev-1* und *lev-8* im Vergleich zum vollständig resistenten Stamm *unc-38* statistisch höchst signifikant ($p < 0,0001$ bzw. $p < 0,001$).

Dies könnte daraufhin deuten, dass Unterschiede in der Wirkung von Tribendimidin auf die verschiedenen Untereinheiten bestehen: Eine Vermutung die durch die Daten von Hu et al. (2009) nicht bestätigt werden konnte.

Gleichzeitig konnte bestätigt werden, dass keine Beteiligung des GABA_A-Rezeptors *unc-49* im Tribendimidinwirkmechanismus besteht und auch *slo-1* nicht involviert ist. Sowohl der *C. elegans* Stamm *slo-1 js379* als auch die GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme waren absolut empfindlich gegenüber Tribendimidin.

5.8 Wirkmechanismus des Anthelminthikums HLR-9291

HLR-9291 ist ein Derivat des Tribendimidins und zeigt insgesamt eine deutlich herabgesetzte Wirksamkeit im Vergleich zu Tribendimidin. Auch HLR-9291 ist ein L-Subtyp Acetylcholin-Rezeptor-Agonist und die Acetylcholin-Rezeptor *C. elegans* "loss of function" Stämme *unc-38*, *unc-63*, *lev-1* und *lev-8* zeigen in dieser Arbeit Resistenz gegenüber HLR-9291. Es gibt keine verminderte Wirksamkeit gegenüber den Stämmen *lev-1* und *lev-8* wie bei Tribendimidin. Es konnte ebenfalls bestätigt werden, dass keine Beteiligung des GABA_A-Rezeptors *unc-49* am HLR-9291-Wirkmechanismus besteht und auch *slo-1* nicht involviert ist. Sowohl der *C. elegans* Stamm *slo-1 js379* als auch die GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme waren empfindlich gegenüber HLR-9291. Jedoch war diese Empfindlichkeit nur etwa halb so stark ausgeprägt wie gegenüber Tribendimidin. Die im Vergleich zum Tribendimidin geänderte chemische Struktur des Derivates HLR-9291 geht scheinbar mit einer geringeren anthelminthischen Wirksamkeit einher. Möglicherweise wurden bei der Veränderung Wirkungsgruppen aus der Substanz entfernt, welche vorher die Bindung oder Wirkung vermittelt haben.

5.9 Anthelminthische Wechselwirkungen und "negative cross resistance"

Ebenso interessant und wichtig wie die Identifikation neuer anthelminthischer Wirkstoffe ist die Untersuchung anthelminthischer Wechselwirkungen (Hu et al., 2010). So ist beispielsweise das Auftreten eines Synergismus zwischen zwei anthelminthischen Substanzen sehr hilfreich, da es die Behandlung durch die Entwicklung von Kombinationspräparaten effizienter machen kann (Hu et al., 2010). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit eines

Synergismus zwischen Emodepsid und Tribendimidin, bzw. zwischen Emodepsid und HLR-9291 überprüft. Es konnte allerdings diesbezüglich kein Zusammenhang gefunden werden. Es besteht weder ein Synergismus zwischen Emodepsid und Tribendimidin noch zwischen Emodepsid und HLR-9291. Zwischen Emodepsid und Tribendimidin konnte zwar eine leichte synergistische Tendenz festgestellt werden, jedoch ist diese nicht signifikant. Immerhin konnte aber auch gezeigt werden, dass es keinen Antagonismus zwischen den beiden Präparaten gibt, was theoretisch eine Behandlung mit beiden Substanzen gleichzeitig oder nacheinander ermöglicht.

Bei der Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Emodepsid und HLR-9291 konnte bei mittleren Emodepsidkonzentrationen eine leicht antagonistische Tendenz festgestellt werden. Jedoch ist auch diese Tendenz nicht signifikant und bedeutet keine Einschränkung in der Verabreichung der Präparate.

Deutlicher als die Wechselwirkungen zwischen den Substanzen waren die Wechselwirkungen zwischen den Substanzen und den verschiedenen genetisch veränderten *C. elegans* Stämmen. Es konnte das Auftreten von Hypersensibilität beobachtet werden, die ein Hinweis auf sogenannte "negative cross resistance" (NCR) sein könnte (Pittendrigh et al., 2000). Dabei reagieren Parasitenpopulationen, die beispielsweise durch Rezeptormutationen gegen eine Anthelminthikaklasse resistent geworden sind, besonders sensibel auf andere Anthelminthikaklassen (Hu et al., 2010). Dies konnte in dieser Arbeit in mehreren Fällen festgestellt werden. Der vollständig Emodepsid-resistente Stamm *slo-1 js379* reagierte gegenüber Piperazin, Tribendimidin und HLR-9291 sensibler als der Wildtyp. Im Falle von Piperazin und HLR-9291 war dieser Unterschied in den EC_{50} Werten statistisch höchst signifikant ($p < 0,0001$; $p < 0,0003$), im Falle von Tribendimidin war der Unterschied schwächer und nicht signifikant ($p < 0,1536$). Es wird deutlich, dass die Emodepsidresistenz den Stamm *slo-1 js379* gegenüber anderen anthelminthischen Substanzen sensibler macht. Diese Hypersensibilität tritt auch klassenübergreifend auf, denn den Anthelminthika gegenüber denen *slo-1 js379* Hypersensibilität zeigt liegen zum Teil unterschiedliche Wirkmechanismen zu Grunde.

Hypersensibilität konnte nicht nur bei *slo-1 js379* beobachtet werden, sondern auch bei den beiden GABA-Rezeptor *unc-49* "loss of function" Stämmen. Beide Stämme zeigten eine deutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber Emodepsid als

der Wildtyp. Gegenüber Tribendimidin und HLR-9291 erwiesen sie sich beim Vergleich der EC_{50} Werte dafür aber als sensibler im Vergleich zum Wildtyp. Der Unterschied war statistisch höchst signifikant ($p < 0,0003$). Im Gegenzug waren allerdings die Acetylcholin-Rezeptor "loss of function" Stämme, welche gegen Tribendimidin und HLR-9291 resistent sind, nicht hyperempfindlich gegenüber Emodepsid, sondern zeigten hier ebenfalls eine geringere Empfindlichkeit. Dies ist für NCR eigentlich untypisch, da sie meist in beide Richtungen wirkt. Oftmals wird aber auch nur in eine Richtung getestet, weshalb in diesen Fällen keine Aussage getroffen werden kann, ob es in umgekehrter Richtung auch zu NCR kommt. Ein Beispiel dafür gibt die Untersuchung von Pedra et al. (2004).

Da zwei GABA-Rezeptor "loss of function" Stämme *unc-49 407* und *unc-49 382* untersucht wurden und beide die gleiche Reaktion auf Tribendimidin und HLR-9291 zeigten, ist es unwahrscheinlich, dass die höhere Empfindlichkeit von anderen genetischen Veränderungen bedingt wird als dem fehlenden GABA-Rezeptor. In diesem Fall müssten sich sonst die genetischen Abweichungen zweimal an den gleichen Stellen im Genom bei zwei unterschiedlichen Stämmen ereignet haben, was unwahrscheinlich ist.

Interessant ist in dieser Arbeit das gehäufte Auftreten von Hinweisen auf NCR, denn der Stamm *slo-1* zeigt Hypersensibilität gegenüber allen getesteten anthelminthischen Substanzen außer Emodepsid und auch die beiden GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" Stämme zeigen in zwei Fällen Hypersensibilität. Dies spricht dafür, dass das Auftreten von NCR kein seltenes Ereignis ist. Im Bereich der Bekämpfung von Schadinsekten ist die NCR bereits ein bekanntes und viel untersuchtes Ereignis (Yamamoto et al., 1993; Pedra et al., 2004). Im Bereich der Helminthen allerdings ist diese Art von Wechselwirkungen noch wenig untersucht (Hu et al., 2010). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Hypersensibilität auch bei Nematoden auftritt, erhöht das den möglichen Nutzen von NCR zur Bekämpfung von Nematodeninfektionen, besonders im Bereich der resistenten Populationen. Mit Hilfe der NCR ist es möglich, resistente Allele in der Population zu "managen" und mit Hilfe der abwechselnden Behandlung mit zwei Substanzen, zwischen denen eine NCR besteht, die Frequenz der resistenten Allele in der Population gering zu halten (Pittendrigh et al., 2000). Ein von einigen Wissenschaftlern gefordertes "Screening" nach NCR-Substanzen im Hochdurchsatzverfahren (Pittendrigh und

Gaffney, 2001) ist nach den Erkenntnissen dieser Arbeit sehr sinnvoll, da NCR bei Nematoden möglicherweise oft auftritt.

Im Bereich der multiplen Resistenzen ist es schwieriger die NCR zu nutzen, da dort Resistenzen gegen viele Stoffe gleichzeitig bestehen und es daher an Stoffen mangelt, die überhaupt noch Wirkung zeigen. Besonders bei Multiresistenzen die durch Faktoren hervorgerufen werden, die wenig mit der Wirkungsweise des anthelminthischen Wirkstoffes zu tun haben, wie etwa Resistenz durch erhöhte Ausschleusung von Giftstoffen aus der Zelle durch P-Glycoproteine (Kerboeuf und Guegnard, 2011), ist der Nutzen der NCR begrenzt. Natürlich kann auch im Falle von Multiresistenzen durch vermehrtes Suchen nach NCR-Substanzen möglicherweise eine Resistenz gebrochen werden. Dies ist jedoch bedeutend schwieriger als bei einfachen Resistenzen.

5.10 Die *T. canis* GABA_A-Rezeptor unc-49B Sequenz

Die identifizierte *T. canis* unc-49B cDNA Sequenz ist auf Nukleinsäureebene vom Start- bis zum Stopcodon 1455 bp lang. Auf Aminosäureebene umfasst das *T. canis* UNC-49B Protein 484 Aminosäuren. Die Länge der identifizierten Sequenz deckt sich mit der Länge anderer bekannter unc-49B cDNA Sequenzen von *C. elegans* (Bamber et al., 1999) und *H. contortus* (Siddiqui et al., 2010). In der 5' UTR der *T. canis* unc-49B cDNA Sequenz befindet sich eine sl1 Sequenz. Diese 22 Basenpaare lange Sequenz erscheint in der 5' UTR diverser Nematodenspezies und in abgewandelter Form bei Trypanosomen. In anderen Organismen tritt die sl1 Sequenz nicht auf (Krause und Hirsh, 1987; Bektesh et al., 1988). In der sl1 Sequenz der *T. canis* unc-49B cDNA ist die dritte Base (ein T) gegen ein C ausgetauscht, ansonsten entspricht die Sequenz genau der typischen sl1-Sequenz. Ein Beleg dafür, dass dieser Basenaustausch in der sl1 Sequenz Askariden-spezifisch ist, konnte nicht gefunden werden, es ist aber auch wenig über mögliche Basenaustausche in der sl1 Sequenz von Askariden bekannt.

Außerdem befindet sich in der 5' UTR der *T. canis* unc-49B cDNA Sequenz noch ein zweites Startcodon. Dies kann im Vergleich mit den unc-49B cDNA Sequenzen anderer Organismen als Startcodon ausgeschlossen werden. Es bildet auch keinen offenen Leserahmen, da es gleich von einem Stopcodon gefolgt wird. Es könnte allerdings die Effizienz der Bildung des Proteins stören, wenn das Ribosom häufig an diesem Startcodon mit der Initiation der Proteinsynthese

beginnt und dann schon nach wenigen Basen abbrechen muss. Das eigentliche Startcodon würde dann seltener abgelesen und das Protein könnte weniger effizient gebildet werden. So genannte Kozak-Sequenzen, welche sich häufig vor einem Startcodon befinden, werden von den Ribosomen erkannt und sind für den Start der Translation bei der Proteinbiosynthese verantwortlich (Kozak, 1987). Diese Sequenzen könnten dafür sorgen, dass die Translation am richtigen Startcodon beginnt und das Protein effizient gebildet wird. Die ursprünglich von Kozak 1987 publizierte Kozak-Sequenz lautet: GCCGCCRCCATGG, sie kann aber von Organismus zu Organismus unterschiedlich sein (Kozak, 1987). Für *C. elegans* ist häufig eine Abfolge von AAA vor dem Startcodon zu beobachten (Perry et al., 1990), für *T. canis* ist keine spezielle Kozak-Sequenz bekannt, es kommt aber vor, dass die ursprüngliche Kozak-Sequenz in abgewandelter Form vorliegt (Hickox et al., 2002). Dies ist auch bei der *T. canis* unc-49B cDNA Sequenz der Fall. Vor dem ersten ATG, welches nicht der Startpunkt der Translation ist, finden sich überhaupt keine typischen Kozak-Merkmale. Vor dem zweiten ATG, welches der tatsächliche Startpunkt der Translation ist, findet sich eine etwas abgewandelte Translations-Initiations-Sequenz. Statt dem als typische Kozak-Sequenz publizierten CCRCCATGG (Shimokawa et al., 2010) konnte in dieser Arbeit eine ähnliche Sequenz gefunden werden: CCATCCATATGC. Da je nach Organismus leichte Abwandlungen der Kozak-Sequenz üblich sind und für parasitische Nematoden noch keine Kozak-Sequenz beschrieben ist, kann diese durchaus als Translations-Initiations-Sequenz betrachtet werden, obwohl zwei zusätzliche T und ein zusätzliches A in die Sequenz eingebaut sind. Das Typische CCA Motiv ist trotzdem vorhanden. Dies spricht deutlich dafür, dass das zweite ATG in der Translation hauptsächlich abgelesen wird und das zusätzliche ATG in der 5' UTR die Translation des Proteins nicht wesentlich behindert.

Für das Plasmidkonstrukt zur Expression der *T. canis* unc-49B cDNA in *C. elegans* wurde die 5' UTR der *T. canis* unc-49B cDNA Sequenz ohnehin durch die *C. elegans* Promotor Sequenz ersetzt, so dass das zusätzliche ATG im "rescue" Experiment die Bildung des Proteins nicht stören kann. Es wurde stattdessen die für *C. elegans* typische Translations-Initiations-Sequenz AAA vor das Startcodon gesetzt (Perry et al., 1990).

5.10.1 Phylogenetische Einordnung der *T. canis* GABA_A-Rezeptor *unc-49B* Sequenz

Beim Vergleich der *T. canis* *unc-49B* cDNA Sequenz mit den *unc-49B* cDNA Sequenzen anderer Organismen wird ebenfalls deutlich, dass die richtige Sequenz amplifiziert wurde. Die Übereinstimmungen auf Aminosäureebene der *T. canis* *unc-49B* cDNA Sequenz mit der *unc-49B* cDNA Sequenz des ebenfalls zu den Ascariden gehörenden *A. suum* ist mit 94 % am höchsten, gefolgt von *H. contortus* (74 %) und *C. elegans* (71 %). Die Übereinstimmungen mit *B. malayi* sind wesentlich geringer, was dadurch erklärt werden kann, dass die hier verwendete vermeintliche *B. malayi* *unc-49B* cDNA Sequenz aus der NCBI Datenbank gar keine B-Untereinheit ist, sondern vermutlich eine falsch annotierte A-Untereinheit, wie der phylogenetische Vergleich zeigt. Die *unc-49*-Untereinheiten ähneln sich alle am NH₂-Terminus bis kurz hinter dem Cys-"Loop" und unterscheiden sich sehr stark am COOH-Terminus (Siddiqui et al., 2010). Wie auch der phylogenetische Vergleich zeigt, sind die einzelnen Untereinheiten klar von einander abzugrenzen (Bamber et al., 1999; Siddiqui et al., 2010), was wiederum auch für die Identifikation der richtigen *T. canis* *unc-49B* cDNA Sequenz in dieser Arbeit spricht. Die *T. canis* Sequenz wird phylogenetisch eindeutig in die Gruppe der B-Untereinheiten eingeordnet.

5.10.2 Bioinformatische Analysen der *T. canis* GABA_A-Rezeptor *unc-49B* Sequenz

Die bioinformatischen Analysen der Sequenz ließen das erwartete Muster erkennen. Alle verwendeten Programme sagten fünf Transmembrandomänen in der Sequenz voraus, wobei es sich bei der überzähligen fünften wahrscheinlich um ein Signalpeptid am NH₂-Terminus handelte, wie durch eine Untersuchung mit SignalP 3.0 gezeigt werden konnte. Damit ist die für GABA_A-Rezeptoruntereinheiten typische Struktur, in der vier Transmembrandomänen vorhanden sind, gegeben (Bamber et al., 1999). Außerdem befindet sich die GABA-Bindungsstelle am NH₂-Terminus (Bamber et al., 1999), was auch bei der bioinformatischen Untersuchung der Sequenz festgestellt werden konnte, bei der eine Ligandenbindungsdomäne im Bereich des NH₂-Terminus erkannt wurde.

5.11 "Rescue" Experiment

Die korrekte Konstruktion der Plasmide für die Transfektion der GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme konnte anhand eines Restriktionsverdaus deutlich gezeigt werden. Es konnte nicht nur das Vorhandensein, sondern auch der Einbau in der gewünschten Orientierung der Einzelkomponenten dokumentiert werden. Außerdem wurde beides auch durch Sequenzierung überprüft. Somit waren die Voraussetzungen für die Durchführung des "rescue" Experimentes gegeben.

Mit Hilfe der Mikroinjektion konnten mehrere transgene *C. elegans* Linien erzeugt werden, bestehend aus dem GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stamm *unc-49* 382, in den das Gen *unc-49* von *T.canis* oder ein Kontrollplasmid ohne Gen eingeführt wurden. Die transgenen Nematoden sind am deutlichen Fluoreszieren ihres Pharynx zu erkennen, welches durch die Expression des co-injizierten GFP-Plasmids ausgelöst wird. Außer diesem indirekten Beweis für die Expression der injizierten Plasmide, konnte auch mit Hilfe einer RT-PCR gezeigt werden, dass die eingeführte *T. canis unc-49B* cDNA von den transgenen *C. elegans* exprimiert wird.

Desweiteren konnten Unterschiede in der Fluoreszenz zwischen den transgenen Linien ausgemacht werden. Die transgene Linie *C.e.Kontrolle* leuchtet relativ schwach und reproduziert das Plasmid schlecht. Es wird nur an sehr wenige Nachkommen weitergegeben, weshalb diese Linie auch nur in einem Experiment verwendet werden konnte, da für die Wirkstoffexperimente eine größere Anzahl Würmer benötigt wird, als diese Linie hervorzubringen vermochte.

Die Linie *C.e.T.c.unc-49* 2, welche das *T. canis unc-49* Plasmid trägt, leuchtet mit moderater Intensität, ist ansonsten körperlich unbeeinträchtigt, fertil und überträgt die eingeschleusten Plasmide zu etwa 50 % an die Nachkommenschaft. Die Linie *C.e.T.c.unc-49* 1, welche das *T.canis unc-49* Plasmid trägt, leuchtet dagegen besonders stark, teilweise auch etwas über den Pharynxbereich hinaus und zeigt teilweise körperliche Beeinträchtigungen. Besonders hell leuchtende Larven sterben häufig kurz nach dem Schlupf ab, oder der Schlupf kann nicht vollständig ausgeführt werden, dabei sind die Beeinträchtigungen stärker je intensiver die Fluoreszenz wird. Außerdem ist die Linie *C.e.T.c.unc-49* 1 nur bedingt reproduktionsfähig, viele Individuen sind steril und legen keine Eier. Dies könnten Anzeichen einer Überexpression sein, möglicherweise wurden die Plasmide in so

großer Zahl aufgenommen, dass andere Funktionen des Körpers dadurch beeinträchtigt werden oder die Expression des fremden GABA_A-Rezeptors von *T.canis* hat Auswirkungen auf die *C. elegans* wenn die Expression zu hoch wird. Für Beeinträchtigungen durch die Überexpression von Fremdgenen in *C. elegans* gibt es bereits Belege. Studien zeigten, dass eine Überexpression injizierter Gene in *C. elegans* zu einem Rückgang der Fertilität führen kann (Vartiainen et al., 2006) oder dass eine Überexpression der eingeführten Gene zu Störungen bei der Eiablage und Mobilität führt (Rytinki et al., 2011).

Der Stamm *C.e.T.c.unc-49 1* zeigt sich im Bewegungsassay als etwas langsamer als der Wildtyp und der Stamm *C.e.T.c.unc-49 2*. Dieser Unterschied ist nicht signifikant, es könnte sich dabei jedoch bereits um ein Anzeichen einer Motilitätsstörung handeln.

5.11.1 "Rescue" Experiment: Bewegungsassay

Mit Hilfe des Bewegungsassays sollte eine erste Überprüfung des Erfolges des "rescue" Experimentes erfolgen. GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme besitzen einen charakteristischen Phänotyp, der anhand ihrer Bewegungsfähigkeit zu überprüfen ist (McIntire et al., 1993). Die GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme kontrahieren ihre ventralen und dorsalen Muskelstränge gleichzeitig anstatt alternierend, was statt einer normalen Schlängelbewegung das sogenannte "shrinken" hervorbringt (McIntire et al. 1993). Diese Bewegungsform macht sie außerdem deutlich langsamer als den Wildtyp, sie vollziehen nur etwa zwei Drittel der "body bends" pro Minute die ein Wildtyp *C. elegans* vollzieht. Bei den transgenen Stämmen konnte dieser Phänotyp nicht mehr beobachtet werden und ihre Bewegungsgeschwindigkeit war der des Wildtypes ähnlich, der Unterschied zum GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stamm *unc-49 382* war statistisch höchst signifikant ($p < 0,001$). Dies weist in einem ersten Schritt auf den Erfolg des "rescue" Experimentes hin, denn der Wildtyp Phänotyp konnte wieder hergestellt werden. Wichtig ist dabei auch anzumerken, dass der transgene *C.e.*Kontrolle Stamm, welchem nur das leere Plasmid ohne das *unc-49* Gen injiziert wurde, keinen wieder hergestellten Wildtyp-Phänotyp zeigt, sondern sich ebenso verhielt wie der GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stamm *unc-49 382*. Dies zeigt, dass tatsächlich das Gen *unc-*

49 von *T. canis* diese Wiederherstellung des Wildtyp Phänotyps hervorgerufen hat.

5.11.2 "Rescue" Experiment: Muscimol

Der Bewegungsassay mit Muscimol diente ebenfalls dazu, den erfolgreichen "rescue" zu bestätigen. Muscimol wurde auch schon zur Validierung des Bewegungsassay benutzt und zeigte auch hier deutlich den Unterschied in der Muscimol Reaktion von Wildtyp und GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* (McIntire et al., 1993). Während der Wildtyp mit steigender Muscimolkonzentration immer mehr in seiner Bewegungsfähigkeit gehemmt wurde, hatte der GABA_A-Agonist Muscimol keinerlei Wirkung auf den GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stamm *unc-49 382*. Die beiden getesteten transgenen Linien *C.e.T.c.unc-49 1* und *C.e.T.c.unc-49 2* verhielten sich ebenfalls signifikant unterschiedlich zum GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stamm *unc-49 382*. Auf sie hatte Muscimol ebenfalls hemmende Wirkung. Die Hemmung war allerdings von unterschiedlicher Intensität. Die transgene Linie *C.e.T.c.unc-49 1* reagierte sogar empfindlicher auf das Muscimol als der Wildtyp. Der Unterschied beim Vergleich der EC₅₀ Werte war hoch signifikant ($p < 0,0016$). Die transgene Linie *C.e.T.c.unc-49 2* reagierte unempfindlicher als der Wildtyp gegenüber Muscimol. Der Unterschied war statistisch höchst signifikant ($p < 0,0003$). Diese Ergebnisse weisen wiederum daraufhin, dass es sich beim Stamm *C.e.T.c.unc-49 1* um eine Überexpression des *T. canis unc-49* Gens handeln könnte, während der Stamm *C.e.T.c.unc-49 2* möglicherweise nur einen teilweisen "rescue" erfahren hat, da er immer noch signifikant geringer sensibel auf Muscimol reagierte als der Wildtyp. Allerdings zeigt er sich nicht annähernd so resistent wie der GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stamm *unc-49 382*, von dem er sich auch signifikant unterscheidet. Dies zeigt deutlich die Variabilität in der Aufnahme der Plasmide und die Notwendigkeit, verschiedene Linien zu testen. Auffällig ist der Unterschied in der EC₅₀ zwischen den ersten Muscimolversuchen zur Validierung des Bewegungsassay und den "rescue" Experimenten. Die EC₅₀ Werte waren bei den "rescue" Experimenten etwa hundertfach erhöht. Außerdem zeigte der Kurvenverlauf kein Plateau. Deshalb wurde das Kurvenmaximum bei 63 % gesetzt, da dies der Wert der maximalen Hemmung aus den Validierungsversuchen war und eine 100%ige Hemmung nie erreicht werden

konnte. Dies trug zur besseren Vergleichbarkeit der Kurven bei. Der Unterschied in der Muscimolantwort des Wildtypes in den beiden Experimenten kann vielleicht durch das Verwenden unterschiedlicher Muscimolchargen erklärt werden. Außerdem war das Muscimol im zweiten Versuch länger gelagert. Dies hat möglicherweise die Qualität beeinflusst und die Wirkung beeinträchtigt. Auf die Vergleichbarkeit der Reaktionen von Wildtyp und transgenen Stämmen im "rescue" Experiment hat dies jedoch keinen Einfluss.

5.11.3 "Rescue" Experiment: Emodepsid

Das "rescue" Experiment mit Emodepsid wurde durchgeführt, um die in dieser Arbeit festgestellte verminderte Emodepsidempfindlichkeit von GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämmen abschließend belegen zu können. Die Ergebnisse aus dem "rescue" Experiment zeigen deutlich, dass die transgenen Stämme, welche aus dem GABA_A-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stamm *unc-49* 382 hervorgegangen sind, durch Injektion des UNC-49B-Rezeptor von *T. canis*, die ursprüngliche Emodepsidempfindlichkeit des Wildtyps wiedererlangt haben. Beide transgenen Linien erwiesen sich als voll Emodepsid-empfindlich. Die Linie *C.e.T.c.unc-49* 1, welche schon im Bewegungsgassay mit Muscimol als überempfindlich erkannt werden konnte, zeigte auch bei der Behandlung mit Emodepsid eine Überempfindlichkeit. Dies kann ein Anzeichen für eine Überexpression der eingeschleusten Plasmide sein, was indirekt auch durch die erhöhte Fluoreszenz gezeigt wird. Es muss aber bedacht werden, dass die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Emodepsid und Muscimol des Stammes *C.e.T.c.unc-49* 1 auch andere Ursachen haben könnte. Statt einer Überexpression könnte auch eine mangelnde Modulation der Kanalaktivität durch Signaltransduktionskaskaden dieses Ergebnis erklären, falls diese posttranslationalen Mechanismen die Empfindlichkeit des Kanals normalerweise senken und den eingeführten *T. canis* UNC-49B-Rezeptor nicht erkennen. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Gegenteilig ist beschrieben, dass der GABA_A-Rezeptor posttranslational durch Phosphorylierung empfindlicher gegenüber GABA wird. Eine Störung der Phosphorylierung des GABA_A-Rezeptors führt zu einem Rückgang der GABA-Sensitivität und zu einer geringeren GABA_A-Rezeptor-Aktivität, wodurch die synaptische Inhibition nachlässt (Kittler und Moss, 2003; Terunuma et al., 2008; Jacob et al., 2008). Da der Stamm *C.e.T.c.unc-49* 1

eher eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber dem GABA-Agonist Muscimol und Emodepsid zeigt, ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass eine Störung der posttranslationalen Phosphorylierung vorliegt. Deshalb ist eine Überexpression der eingeschleusten *unc-49B* cDNA bei dieser transgenen Linie naheliegender. Die Linie *C.e.T.c.unc-49 2* hingegen zeigte sowohl im Verlauf der Dosis-Wirkungskurve als auch beim Vergleich der EC_{50} Werte große Übereinstimmung mit dem Wildtyp.

Die EC_{50} Werte des Wildtypes und des Stammes *unc-49 382* wiederum sind leicht unterschiedlich zu den EC_{50} Werten, die im ersten Emodepsidbewegungssassay gefunden werden konnten. Die Werte für den Wildtyp sind etwa 10-fach, die Werte für den Stamm *unc-49 382* etwa 4-fach verringert. Dies ist vermutlich auf die Verwendung einer neuen Emodepsidcharge zurückzuführen. Es beeinträchtigt das "rescue" Experiment aber nicht, da für alle Stämme im "rescue" Experiment die gleiche Emodepsidcharge verwendet wurde.

Es ist festzustellen, dass das "rescue" Experiment mit dem Gen *unc-49* von *T. canis* in *C. elegans* GABA-Rezeptor "loss of function" Stämmen erfolgreich war. Die Ergebnisse zeigen, dass der $GABA_A$ -Rezeptor *unc-49* eine Rolle im Emodepsidwirkmechanismus spielt. $GABA_A$ -Rezeptor "loss of function" *C. elegans* Stämme, welche geringer empfindlich auf Behandlung mit Emodepsid ansprachen, konnten durch Einschleusung einer *unc-49B* cDNA wieder empfindlich gemacht werden. Bei einer der transgenen *C. elegans* Linien konnte durch die Einschleusung des *T. canis unc-49* sogar eine Emodepsidüberempfindlichkeit erzeugt werden, die wahrscheinlich auf eine Überexpression des Gens zurückzuführen ist.

Desweiteren konnte mit diesem "rescue" Experiment dokumentiert werden, dass die im *C. elegans* Modellsystem gewonnenen Erkenntnisse auch auf parasitische Nematoden übertragbar sind. Durch die erfolgreiche Expression der parasitischen GABA-Rezeptoren in *C. elegans* konnte außerdem dokumentiert werden, dass Emodepsid in gleicher Weise auf den parasitischen *T. canis unc-49* GABA-Rezeptor wie auf den *C. elegans unc-49* GABA-Rezeptor wirkt.

Erfolgreiche "rescue" Experimente konnten auch schon in anderen Studien an *C. elegans* beschrieben werden. So wurde in einer Untersuchung an einer anderen möglichen Emodepsidzielstruktur, dem Kalzium-aktivierten Kaliumkanal SLO-1 gezeigt, dass der Emodepsid-resistente *slo-1 js379* Stamm durch die

Einführung des SLO-1-Rezeptors von verschiedenen parasitischen Spezies aus dem Taxon Strongylida ("Clade" V) wieder vollständig Emodepsid-empfindlich wird (Welz et al., 2011). In einer weiteren Studie am Emodepsid-resistenten *C. elegans* Stamm *slo-1 js379* war der "rescue" auch mit dem humanen Homolog des *C. elegans slo-1*-Rezeptors geglückt (Crisford et al., 2011). Ein erfolgreiches "rescue" Experiment in *C. elegans* konnte auch schon mit der Acetylcholinesterase des an Pflanzen parasitierenden Nematoden *Globodera pallida* durchgeführt werden. Die Acetylcholinesterase aus diesem "Clade" IV Nematoden führte zu einer Expression und einem funktionalen "rescue" des Phänotypes der *C. elegans* Doppelmutante *ace-1;ace-2* (Costa et al., 2009). In einer Studie, in der versucht wurde, das "heat-shock" Protein 90 (*hsp-90*) von *H. contortus* und *Brugia pahangi* für ein "rescue" Experiment in dem *C. elegans* "loss of function" Stamm *daf-21* zu nutzen, gelang mit dem "heat-shock" Protein des "Clade" V Nematoden *H. contortus* nur ein partieller "rescue" und mit dem "heat-shock" Protein des "Clade" III Nematoden *B. pahangi* gar kein "rescue" des Wildtyp Phänotypes (Gillan et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde also nach dem bisherigen Kenntnisstand erstmals ein Gen aus einem "Clade" III Nematoden für einen vollständigen "rescue" des Wildtyp Phänotypes in *C. elegans* erfolgreich genutzt. Die Verwandtschaft des "Clade" V Nematoden *C. elegans* zu dem "Clade" III Nematoden *T. canis* ist weiter entfernt als zu den Strongylida aus "Clade" V mit denen das *slo-1* "rescue" Experiment durchgeführt wurde (Welz et al., 2011) und zu dem "Clade" IV Nematoden *G. pallida* mit dem bereits ein erfolgreicher "rescue" in *C. elegans* gelungen ist. Verwandtschaftlich noch weiter entfernt ist der humane Kaliumkanal SLO-1 mit dem ebenfalls ein "rescue" Experiment in *C. elegans* durchgeführt wurde (Crisford et al., 2011). Durch das erfolgreiche "rescue" Experiment ist ebenfalls gezeigt, dass die Emodepsidunempfindlichkeit der GABA_A-Rezeptor "loss of function" Stämme ausschließlich von dem Verlust des GABA_A-Rezeptors herrührt und nicht noch durch mögliche andere genetische Unterschiede bedingt ist.

In verschiedenen jüngeren Studien wurde inzwischen gezeigt, dass der Rezeptor SLO-1 eine wichtige, möglicherweise sogar die hauptsächliche Rolle im Emodepsidwirkmechanismus spielt (Welz et al., 2011; Crisford et al., 2011; Buxton et al., 2011,). Die hier gewonnenen Erkenntnisse legen eine Beteiligung des

GABA-Rezeptors im Emodepsidwirkmechanismus nahe, nicht unbedingt als die Hauptzielstruktur aber als ein Teil der Wirkkaskade.

5.12. Schlussfolgerung und Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit konnten grundlegende Erkenntnisse über die Wirkmechanismen verschiedener anthelminthischer Wirkstoffgruppen erlangt werden. Besonders für die Forschung am Wirkmechanismus des Anthelminthikums Emodepsid konnten wichtige neue Impulse gegeben werden. Während eine Beteiligung des SLO-1-Rezeptors im Emodepsidwirkmechanismus bereits mehrfach publiziert wurde (Guest et al., 2007; Welz et al., 2011; Crisford et al., 2011; Buxton et al., 2011), konnte in dieser Arbeit auch die Beteiligung des GABA_A-Rezeptors *unc-49* am Emodepsidwirkmechanismus gezeigt werden. *Caenorhabditis elegans* Stämme, welchen der GABA_A-Rezeptors *unc-49* fehlt, reagieren unempfindlicher auf Emodepsid als der Wildtyp. Es konnte gezeigt werden, dass die Empfindlichkeit des Wildtypes durch das Einschleusen eines parasitischen GABA_A-Rezeptors *unc-49* in die GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* wieder hergestellt werden kann. Nachdem zumindest eine der beiden erzeugten transgenen Linien sowohl überempfindlich auf die getesteten Substanzen reagierte, als auch Störungen in der Fertilität aufwies, wäre es interessant zu verfolgen, ob dies tatsächlich ausschließlich durch Überexpression hervorgerufen wurde oder doch eine Nebenerscheinung des eingefügten Rezeptors eines parasitischen Nematoden ist. Dies könnte überprüft werden, indem auch ein Plasmid, welches das *unc-49* Gen von *C. elegans* enthält, in die GABA-Rezeptor "loss of function" *C. elegans* eingeführt würde. Außerdem könnte mit Hilfe von "quantitativer real-time" RT-PCR die Expression des *T.canis unc-49*-Rezeptors in den beiden transgenen Linien ermittelt und miteinander verglichen werden. Auf diese Weise könnte auch festgestellt werden, ob die Expression im Stamm *C.e.T.c.unc-49 1* im Vergleich zum Stamm *C.e.T.c.unc-49 2* deutlich erhöht ist.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit an verschiedenen anthelminthischen Substanzen gezeigt werden, dass anthelminthische Wechselwirkungen und dabei vor allem "negative cross resistance" häufiger auftreten als erwartet. Dabei wäre es interessant, das Phänomen der NCR besser zu verstehen. Es wäre von großem Nutzen, eine größere Zahl von Wirkstoffgruppen miteinander auf diese

Wechselwirkungen zu testen. In Zeiten wachsender Resistenzproblematik gegenüber den gängigen Anthelminthika sind gerade die anthelminthischen Wechselwirkungen ein noch zu wenig ausgeschöpftes Forschungsgebiet. Diese Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis anthelminthischer Wirkmechanismen und anthelminthischer Wechselwirkungen.

Besonders *C. elegans* als Modellorganismus wurde in dieser Arbeit in vielfältiger Form in die Forschungen eingebracht und hat sich als wertvolles System zur Untersuchung von Anthelminthika erwiesen. Die Etablierung neuer *C. elegans* Assays, die helfen können, noch mehr Bereiche aus dem Leben parasitischer Nematoden im Labormodell nachstellen zu können, ist potentiell von großer Wichtigkeit und hohem Nutzen.

6. Zusammenfassung

Auf Grund der wachsenden Resistenzproblematik bei der Bekämpfung von parasitischen Nematoden ist die Entdeckung neuer Wirkstoffe, die Aufklärung ihrer Wirkmechanismen und die Identifikation möglicher Wechselwirkungen von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit konnte eine Beteiligung des γ -Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptors *unc-49* im Wirkmechanismus des Anthelminthikums Emodepsid anhand von *Caenorhabditis elegans* Bewegungs- und Entwicklungsassays gezeigt werden. Die getesteten GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme erwiesen sich in den durchgeführten Assays als signifikant geringer empfindlich gegenüber der Wirkung von Emodepsid als der Wildtyp. Dies wurde durch ein "rescue" Experiment überprüft, für welches die *unc-49B* cDNA des zoonotischen Ascariden *Toxocara canis* vollständig identifiziert wurde. Die *T. canis* *unc-49B* cDNA wurde in ein Expressionsplasmid gemeinsam mit dem UNC-49 *C. elegans* Promotor und einer *C. elegans* 3' UTR eingebaut und in die Gonaden der GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme injiziert. Auf diese Weise konnte der Wildtyp Phänotyp wieder hergestellt werden. Zusätzlich konnte noch eine verminderte Emodepsidempfindlichkeit bei *C. elegans* Mutanten, denen die Acetylcholin-Rezeptoruntereinheiten *lev-1* und *unc-38* fehlten, festgestellt werden.

Desweiteren wurden die Wirkmechanismen der anthelminthischen Wirkstoffe Piperazin, Tribendimidin und HLR-9291 anhand von *C. elegans* Assays überprüft und Wechselwirkungen mit Emodepsid, sowie das Vorkommen von "negative cross resistance" untersucht. Es konnte für Piperazin weder eine Beteiligung des GABA_A-Rezeptors *unc-49* noch eine Beteiligung der untersuchten Acetylcholin-Rezeptoruntereinheiten *lev-1*, *lev-8*, *unc-38* und *unc-63* am Piperazinwirkmechanismus festgestellt werden, obwohl es dafür Hinweise aus früheren Studien gab. Die Beteiligung der Acetylcholin-Rezeptoruntereinheiten *lev-1*, *lev-8*, *unc-38* und *unc-63* am Tribendimidinwirkmechanismus konnte dagegen bestätigt werden, denn *lev-1*, *lev-8*, *unc-38* und *unc-63* "loss of function" *C. elegans* Stämme zeigten sich im *C. elegans* Entwicklungsassay als resistent gegenüber Tribendimidin. Dem Tribendimidinderivat HLR-9291 liegt vermutlich der selbe Wirkmechanismus zu Grunde wie Tribendimidin. Auch hier sind die *lev-1*, *lev-8*, *unc-38* und *unc-63* "loss of function" *C. elegans* Stämme vollständig

unempfindlich gegenüber HLR-9291. Allerdings ist die Wirkung von HLR-9291 deutlich schwächer als die Wirkung von Tribendimidin.

Es wurden mögliche Wechselwirkungen zwischen Emodepsid, Tribendimidin und HLR-9291 überprüft und dabei festgestellt, dass es keinen Synergismus zwischen den Substanzen gibt. Allerdings konnte in mehreren Fällen das Auftreten von "negative cross resistance" festgestellt werden. Die Emodepsid-resistente Mutante *slo-1 js379* zeigte sich deutlich empfindlicher als der Wildtyp bei Behandlung mit Piperazin und Tribendimidin bzw. HLR-9291. Die geringer Emodepsid-empfindlichen GABA_A-Rezeptor *unc-49* "loss of function" *C. elegans* Stämme waren ebenfalls sensibler als der Wildtyp bei Behandlung mit Tribendimidin und HLR-9291. Dies lässt darauf schließen, dass "negative cross resistance" ein bei Nematoden oft vorkommendes Ereignis ist und näher untersucht werden sollte. Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Aufklärung der Wirkmechanismen der anthelminthischen Wirkstoffe Emodepsid, Piperazin, Tribendimidin und HLR-9291 und liefert außerdem wichtige Erkenntnisse und neue Ansatzpunkte für zukünftige Forschungen im Bereich der anthelminthischen Wechselwirkungen.

Emodepsid • anthelminthische Wechselwirkungen • *Caenorhabditis elegans*

7. Summary

Due to the growing resistance problem in the control of parasitic nematodes the discovery of new drugs, the elucidation of their mechanisms of action and the identification of possible anthelmintic interactions are very important. In this research work the involvement of the γ -aminobutyric acid (GABA) receptor *unc-49* in the mechanism of action of the anthelmintic emodepside was shown in *Caenorhabditis elegans* movement and development assays. In these assays the tested GABA_A receptor *unc-49* loss of function *C. elegans* strains were found to be significantly less susceptible to emodepside than the wildtype. The *Toxocara canis* *unc-49B* cDNA sequence was completely identified and used in a rescue experiment. The *T. canis* *unc-49B* cDNA was inserted into a plasmid together with the *C. elegans* UNC-49 promoter and a *C. elegans* 3' UTR. This plasmid was injected in the gonads of the GABA_A receptor *unc-49* loss of function *C. elegans* strains. Using this approach the wild-type phenotype was successfully restored. Interestingly, there was a lower susceptibility against emodepside in *C. elegans* mutants which have lost the acetylcholine receptor subunit *lev-1* and *unc-38*.

Furthermore, the mechanisms of action of the anthelmintic drugs piperazine, tribendimidine and HLR-9291 were examined using *C. elegans* in the above mentioned assay. Possible interactions between emodepside and other anthelmintic substances were investigated as well as the presence of negative-cross-resistance. In contrast to evidence from previous studies, the current study did not indicate an involvement of the GABA_A receptor *unc-49* or the acetylcholine receptor subunit *lev-1*, *lev-8*, *unc-38* and *unc-63* in the mechanism of action of piperazine. However, *lev-1 lev-8, unc-38* and *unc-63* loss of function *C. elegans* strains were shown to be resistant to tribendimidine in the *C. elegans* development assay, therefore confirming the involvement of those acetylcholine receptor subunits in the mechanism of action of tribendimidine. The tribendimidine derivative HLR-9291 has obviously the same mechanism of action as tribendimidine since the *lev-1 lev-8, unc-38* and *unc-63* loss of function *C. elegans* strains were completely resistant to HLR-9291. However, the effect of HLR-9291 was significantly weaker than the effect of tribendimidine.

Possible interactions between emodepside, tribendimidine and HLR-9291 were examined and no synergism between the substances was found. However, it was shown that negative cross resistance occurs often. The emodepside resistant

Summary

mutant *slo-1 js379* was significantly more susceptible than the wildtype when treated with piperazine, tribendimidine or HLR-9291. The GABA_A receptor *unc-49* loss of function mutants with reduced susceptibility to emodepside were also significantly more susceptible than the wildtype when treated with tribendimidine or HLR-9291. This suggests that "negative cross resistance" is an often occurring event in nematodes and should be further investigated.

This work contributes to the elucidation of the mechanisms of action of the anthelmintic drugs emodepside, piperazine, tribendimidine and HLR 9291 and also provides important insights and new approaches for future research in the field of anthelminthic interactions.

Emodepside • anthelminthic interactions • *Caenorhabditis elegans*

8. Literaturverzeichnis

- Albert, A., 1985, Chemotherapie: history and principles. In: Selective Toxicity, Kapitel 6, 206-265, Chapman and Hall.
- Altreuther, G., Borgsteede, F.H., Buch, J., Charles, S.D., Cruthers, L., Epe, C., Young, D.R., Krieger, K.J., 2005, Efficacy of a topically administered combination of emodepside and praziquantel against mature and immature *Ancylostoma tubaeforme* in domestic cats. *Parasitol Res*, 97 Suppl 1, 51-57.
- Altreuther, G., Radeloff, I., LeSueur, C., Schimmel, A., Krieger, K.J., 2009, Field evaluation of the efficacy and safety of emodepside plus praziquantel tablets (Profender tablets for dogs) against naturally acquired nematode and cestode infections in dogs. *Parasitol Res*, 105 Suppl 1, 23-29.
- Altreuther, G., Gasda, N., Adler, K., Hellmann, K., Thurieau, H., Schimmel, A., Hutchens, D., Krieger, K.J., 2011, Field evaluations of the efficacy and safety of Emodepside plus toltrazuril (Procox(R) oral suspension for dogs) against naturally acquired nematode and *Isospora* spp. infections in dogs. *Parasitol Res*, 109 Suppl 1, 21-28.
- Angstadt, J.D., Donmoyer, J.E., Stretton, A.O., 1989, Retrovesicular ganglion of the nematode *Ascaris*. *J Comp Neurol* 284, 374-388.
- Anziani, O.S., Suarez, V., Guglielmone, A.A., Warnke, O., Grande, H., Coles, G.C., 2004, Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. *Vet Parasitol* 122, 303-306.
- Aubry, M.L., Cowell, P., Davey, M.J., Shevde, S., 1970, Aspects of the pharmacology of a new anthelmintic: pyrantel. *Br J Pharmacol* 38, 332-344.
- Avery, L., Shtonda, B.B., 2003, Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J Exp Biol* 206, 2441-2457.
- Bamber, B.A., Beg, A.A., Twyman, R.E., Jorgensen, E.M., 1999, The *Caenorhabditis elegans unc-49* locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor. *J Neurosci* 19, 5348-5359.
- Bamber, B.A., Twyman, R.E., Jorgensen, E.M., 2003, Pharmacological characterization of the homomeric and heteromeric UNC-49 GABA receptors in *C. elegans*. *Br J Pharmacol* 138, 883-893.
- Bamber, B.A., Richmond, J.E., Otto, J.F., Jorgensen, E.M., 2005, The composition of the GABA receptor at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 144, 502-509.
- Barnes, E.H., Dobson, R.J., Donald, A.D., Waller, P.J., 1988, Predicting populations of *Trichostrongylus colubriformis* infective larvae on pasture from meteorological data. *Int J Parasitol* 18, 767-774.

- Bektesh, S., Van Doren, K., Hirsh, D., 1988, Presence of the *Caenorhabditis elegans* spliced leader on different mRNAs and in different genera of nematodes. *Genes Dev* 2, 1277-1283.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S., 2004, Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology* 340, 783-795.
- Bethony, J.M., Cole, R.N., Guo, X., Kamhawi, S., Lightowers, M.W., Loukas, A., Petri, W., Reed, S., Valenzuela, J.G., Hotez, P.J., 2011, Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunol Rev* 239, 237-270.
- Blaxter, M., 1998, *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science* 282, 2041-2046.
- Boulin, T., Gielen, M., Richmond, J.E., Williams, D.C., Paoletti, P., Bessereau, J.L., 2008, Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 18590-18595.
- Brenner, S., 1974, The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Brown, C.M., Reisfeld, B., Mayeno, A.N., 2008, Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab Rev* 40, 1-100.
- Bueding, E., Saz, H.J., Farrow, G.W., 1959, The effect of piperazine on succinate production by *Ascaris lumbricoides*. *Br J Pharmacol Chemother* 14, 497-500.
- Bull, K., Cook, A., Hopper, N.A., Harder, A., Holden-Dye, L., Walker, R.J., 2007, Effects of the novel anthelmintic emodepside on the locomotion, egg-laying behaviour and development of *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol* 37, 627-636.
- Bürglin, T.R., Lobos, E., Blaxter, M.L., 1998, *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes. *Int J Parasitol* 28, 395-411.
- Buxton, S., Neveu, C., Charvet, C., Robertson, A., Martin, R., 2011, On the mode of action of emodepside: slow effects on membrane potential and voltage-activated currents in *Ascaris suum*. *Br J Pharmacol* 164 (2b), 453-470.
- Cao, B., Porollo, A., Adamczak, R., Jarrell, M., Meller, J., 2006, Enhanced recognition of protein transmembrane domains with prediction-based structural profiles. *Bioinformatics* 22, 303-309.
- Carre-Pierrat, M., Grisoni, K., Gieseler, K., Mariol, M.C., Martin, E., Jospin, M., Allard, B., Segalat, L., 2006, The SLO-1 BK channel of *Caenorhabditis elegans* is critical for muscle function and is involved in dystrophin-dependent muscle dystrophy. *J Mol Biol* 358, 387-395.

- Cassada, R.C., Russell, R.L., 1975, The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 46, 326-342.
- Charles, S.D., Altreuther, G., Reinemeyer, C.R., Buch, J., Settje, T., Cruthers, L., Kok, D.J., Bowman, D.D., Kazacos, K.R., Jenkins, D.J., Schein, E., 2005, Evaluation of the efficacy of emodepside+praziquantel topical solution against cestode (*Dipylidium caninum*, *Taenia taeniaeformis*, and *Echinococcus multilocularis*) infections in cats. *Parasitol Res* 97 Suppl 1, 33-40.
- Chen, W., Terada, M., Cheng, J.T., 1996, Characterization of subtypes of gamma-aminobutyric acid receptors in an *Ascaris muscle* preparation by binding assay and binding of PF1022A, a new anthelmintic, on the receptors. *Parasitol Res* 82, 97-101.
- Chou, T.C., 2006, Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58, 621-681.
- Claros, M.G., von Heijne, G., 1994, TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci* 10, 685-686.
- Clopper, C.J., Pearson, E.S., 1934, The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika* 26, 404-413.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., 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. *Vet Parasitol* 44, 35-44.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruysse, J., 2006, The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 136, 167-185.
- Comley, J.C., Rees, M.J., Turner, C.H., Jenkins, D.C., 1989, Colorimetric quantitation of filarial viability. *Int J Parasitol* 19, 77-83.
- Condi, G.K., Soutello, R.G., Amarante, A.F., 2009, Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. *Vet Parasitol* 161, 213-217.
- Cooper, A.F., Van Gundy, S.D., 1970, Metabolism of Glycogen and Neutral Lipids by *Aphelenchus avenae* and *Caenorhabditis* sp. in Aerobic, Microaerobic and Anaerobic Environments. *J Nematol* 2, 305-315.
- Corbel, V., Stankiewicz, M., Bonnet, J., Grolleau, F., Hougard, J.M., Lapied, B., 2006, Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *Neurotoxicology* 27, 508-519.

- Costa, J.C., Lilley, C.J., Atkinson, H.J., Urwin, P.E., 2009, Functional characterisation of a cyst nematode acetylcholinesterase gene using *Caenorhabditis elegans* as a heterologous system. *Int J Parasitol* 39, 849-858.
- Courtney, C.H., 1995, Chemotherapy of Parasitic Diseases, In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Kapitel 11, 947-1017, Iowa State University Press.
- Cox, D.M., Holland, C.V., 1998, The relationship between numbers of larvae recovered from the brain of *Toxocara canis*-infected mice and social behaviour and anxiety in the host. *Parasitology* 116, 579-594.
- Crisford, A., Murray, C., O'Connor, V., Edwards, R.J., Kruger, N., Welz, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Harder, A., Walker, R.J., Holden-Dye, L., 2011, Selective toxicity of the anthelmintic emodepside revealed by heterologous expression of human KCNMA1 in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Pharmacol* 79, 1031-1043.
- Del Castillo, J., De Mello, W.C., Morales, T., 1964, Mechanism of the Paralyzing Action of Piperazine on *Ascaris* Muscle. *Br J Pharmacol Chemother* 22, 463-477.
- Deplazes, P., 2006, Helminthosen von Hund und Katze, In: Schnieder, T (Hrg.): *Veterinärmedizinische Parasitologie: Kapitel 5.2*, 444-517, Parey.
- DVG, 2011, Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung. Stand: Juni 2011.
- Echevarria, F., Borba, M.F., Pinheiro, A.C., Waller, P.J., Hansen, J.W., 1996, The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Brazil. *Vet Parasitol* 62, 199-206.
- Eckert, K.T.F., Zahner, H., Deplazes, P., 2005a, Therapie und Bekämpfung, In: *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin: Kapitel 5.1*, 500-519, Enke Verlag Stuttgart
- Eckert, K.T.F., Zahner, H., Deplazes, P., 2005b, Stamm Nematozoa (Fadenwürmer), Unterstamm Nematoda (Rundwürmer), In: *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin: Kapitel 2.3.2*, 209-338, Enke Verlag Stuttgart.
- Eddi, C., Caracostantogolo, J., Pena, M., Schapiro, J., Marangunich, L., Waller, P.J., Hansen, J.W., 1996, The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Argentina. *Vet Parasitol* 62, 189-197.
- ESCCAP-Empfehlungen, 2009, Bekämpfung von Würmern (Helminthen) bei Hunden und Katzen. Deutsche Adaption der ESCCAP-Empfehlungen.

- Fahrion, A.S., Staebler, S., Deplazes, P., 2008, Patent *Toxocara canis* infections in previously exposed and in helminth-free dogs after infection with low numbers of embryonated eggs. *Vet Parasitol* 152, 108-115.
- Garwood, F., 1936, Fiducial Limits for the Poisson Distribution. *Biometrika* 28, 437-442.
- Gasbarre, L.C., Smith, L.L., Hoberg, E., Pilitt, P.A., 2009a, Further characterization of a cattle nematode population with demonstrated resistance to current anthelmintics. *Vet Parasitol* 166, 275-280.
- Gasbarre, L.C., Smith, L.L., Lichtenfels, J.R., Pilitt, P.A., 2009b, The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. *Vet Parasitol* 166, 281-285.
- Geary, T.G., Thompson, D.P., 2001, *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites? *Vet Parasitol* 101, 371-386.
- Gillan, V., Maitland, K., McCormack, G., Him, N.A., Devaney, E., 2009, Functional genomics of hsp-90 in parasitic and free-living nematodes. *Int J Parasitol* 39, 1071-1081.
- Gilleard, J.S., 2004, The use of *Caenorhabditis elegans* in parasitic nematode research. *Parasitology* 128 Suppl 1, 49-70.
- Gray, J., Lissmann, H.W., 1964, The Locomotion of Nematodes. *J Exp Biol* 41, 135-154.
- Gubanov, N.M., 1951, Giant nematoda from the placenta of Cetacea; *Placentonema gigantissima* nov. gen., nov. sp. *Dokl Akad Nauk SSSR* 77, 1123-1125.
- Guest, M., Bull, K., Walker, R.J., Amliwala, K., O'Connor, V., Harder, A., Holden-Dye, L., Hopper, N.A., 2007, The calcium-activated potassium channel, SLO-1, is required for the action of the novel cyclo-octadepsipeptide anthelmintic, emodepside, in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol* 37, 1577-1588.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010, New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59, 307-321.
- Hall, T.A., 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Hamilton, C.M., Stafford, P., Pinelli, E., Holland, C.V., 2006, A murine model for cerebral toxocariasis: characterization of host susceptibility and behaviour. *Parasitology* 132, 791-801.

- Harder, A., von Samson-Himmelstjerna, G., 2002, Cyclooctadepsipeptides--a new class of anthelmintically active compounds. *Parasitol Res* 88, 481-488.
- Harder, A., Schmitt-Wrede, H.P., Krucken, J., Marinovski, P., Wunderlich, F., Willson, J., Amliwala, K., Holden-Dye, L., Walker, R., 2003, Cyclooctadepsipeptides--an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. *Int J Antimicrob* 22, 318-331.
- Harder, A., Holden-Dye, L., Walker, R., Wunderlich, F., 2005, Mechanisms of action of emodepside. *Parasitol Res* 97 Suppl 1, 1-10.
- Harris, T.W., Antoshechkin, I., Bieri, T., Blasiar, D., Chan, J., Chen, W.J., De La Cruz, N., Davis, P., Duesbury, M., Fang, R., Fernandes, J., Han, M., Kishore, R., Lee, R., Muller, H.M., Nakamura, C., Ozersky, P., Petcherski, A., Rangarajan, A., Rogers, A., Schindelman, G., Schwarz, E.M., Tuli, M.A., Van Auken, K., Wang, D., Wang, X., Williams, G., Yook, K., Durbin, R., Stein, L.D., Spieth, J., Sternberg, P.W., 2010, WormBase: a comprehensive resource for nematode research. *Nucleic Acids Res* 38, 463-467.
- Hashmi, S., Tawe, W., Lustigman, S., 2001, *Caenorhabditis elegans* and the study of gene function in parasites. *Trends Parasitol* 17, 387-393.
- Hickox, D.M., Gibbs, G., Morrison, J.R., Sebire, K., Edgar, K., Keah, H.H., Alter, K., Loveland, K.L., Hearn, M.T., de Kretser, D.M., O'Bryan, M.K., 2002, Identification of a novel testis-specific member of the phosphatidylethanolamine binding protein family, pebp-2. *Biol Reprod* 67, 917-927.
- Hiepe, T., Lucius, R., Gottstein, B., 2005, Stoffwechselfysiologie von Parasiten, In: *Allgemeine Parasitologie mit den Grundzügen der Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung*. Kapitel 7, 188-218, Medizinverlage Stuttgart.
- Hodgkin, J., Plasterk, R.H., Waterston, R.H., 1995, The nematode *Caenorhabditis elegans* and its genome. *Science* 270, 410-414.
- Holden-Dye, L., O'Connor, V., Hopper, N.A., Walker, R.J., Harder, A., Bull, K., Guest, M., 2007, SLO, SLO, quick, quick, slow: calcium-activated potassium channels as regulators of *Caenorhabditis elegans* behaviour and targets for anthelmintics. *Invert Neurosci* 7, 199-208.
- Holden-Dye, L., Walker, R.J., 2007, Anthelmintic drugs. *WormBook*, 1-13.
- Holmes, A.M., Rudd, J.A., Tattersall, F.D., Aziz, Q., Andrews, P.L., 2009, Opportunities for the replacement of animals in the study of nausea and vomiting. *Br J Pharmacol* 157, 865-880.
- Holt, S.J., Riddle, D.L., 2003, SAGE surveys *C. elegans* carbohydrate metabolism: evidence for an anaerobic shift in the long-lived dauer larva. *Mech Ageing Dev* 124, 779-800.
- Hu, P.J., 2007, Dauer. *WormBook*, 1-19.

- Hu, Y., Xiao, S.H., Aroian, R.V., 2009, The new anthelmintic tribendimidine is an L-type (levamisole and pyrantel) nicotinic acetylcholine receptor agonist. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e499.
- Hu, Y., Platzer, E.G., Bellier, A., Aroian, R.V., 2010, Discovery of a highly synergistic anthelmintic combination that shows mutual hypersusceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 5955-5960.
- Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., Brow, M.A., 1988, DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (24), 9436-9440.
- Iravani, J., 1965, Interrelation between barbiturates, piperazine and GABA in the membrane of crayfish muscles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 251, 265-274.
- Islam, M.K., Miyoshi, T., Yamada, M., Alim, M.A., Huang, X., Motobu, M., Tsuji, N., 2006, Effect of piperazine (diethylenediamine) on the moulting, proteome expression and pyrophosphatase activity of *Ascaris suum* lung-stage larvae. *Acta tropica* 99, 208-217.
- Jacob, T.C., Moss, S.J., Jurd, R., 2008, GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature reviews* 9, 331-343.
- James, C.E., Davey, M.W., 2007, A rapid colorimetric assay for the quantitation of the viability of free-living larvae of nematodes in vitro. *Parasitol Res* 101, 975-980.
- Joachim, A. 2006, Helminthosen des Schweines, In: Schnieder, T (Hsg.): *Veterinärmedizinische Parasitologie: Kapitel 4.2*, 369-397, Parey.
- Johansen, M.V., 1989, An evaluation of techniques used for the detection of anthelmintic resistance in nematode parasites of domestic livestock. *Vet Res Commun* 13, 455-466.
- Johnson, C.D., Stretton, A.O., 1985, Localization of choline acetyltransferase within identified motoneurons of the nematode *Ascaris*. *J Neurosci* 5, 1984-1992.
- Johnson, C.D., Stretton, A.O., 1987, GABA-immunoreactivity in inhibitory motor neurons of the nematode *Ascaris*. *J Neurosci* 7, 223-235.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992, The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8, 275-282.
- Jorgensen, E.M., 2005, Gaba. *WormBook*, 1-13.

- Kahsay, R.Y., Gao, G., Liao, L., 2005, An improved hidden Markov model for transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes. *Bioinformatics* 21, 1853-1858.
- Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Weber, S.S., Wenger, A., Wieland-Berghausen, S., Goebel, T., Gauvry, N., Pautrat, F., Skripsky, T., Froelich, O., Komoin-Oka, C., Westlund, B., Sluder, A., Maser, P., 2008a, A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* 452, 176-180.
- Kaminsky, R., Gauvry, N., Schorderet Weber, S., Skripsky, T., Bouvier, J., Wenger, A., Schroeder, F., Desaulles, Y., Hotz, R., Goebel, T., Hosking, B.C., Pautrat, F., Wieland-Berghausen, S., Ducray, P., 2008b, Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol Res* 103, 931-939.
- Kaplan, R.M., 2004, Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20, 477-481.
- Keiser, J., Thiemann, K., Endriss, Y., Utzinger, J., 2008, *Strongyloides ratti*: in vitro and in vivo activity of tribendimidine. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e136.
- Kenyon, C., 1988, The nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 240, 1448-1453.
- Kenyon, F., Greer, A.W., Coles, G.C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berrag, B., Varady, M., Van Wyk, J.A., Thomas, E., Vercruysse, J., Jackson, F., 2009, The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet Parasitol* 164, 3-11.
- Kerboeuf, D., Guegnard, F., 2011, Anthelmintics are substrates and activators of nematode P-glycoprotein. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 2224-2232.
- Kimmig, P., Naser, K., Frank, W., 1991, Seroepidemiologic studies of human toxocarasis. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 191, 406-422.
- Kittler, J.T., Moss, S.J., 2003, Modulation of GABAA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr Opin Neurobiol* 13, 341-347.
- Knight, H., Knight, M.R., 2001, Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* 6, 262-267.
- Köhler, P., 2001, The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int J Parasitol* 31, 336-345.
- Kotze, A.C., Clifford, S., O'Grady, J., Behnke, J.M., McCarthy, J.S., 2004, An in vitro larval motility assay to determine anthelmintic sensitivity for human hookworm and *Strongyloides species*. *Am J Trop Med Hyg* 71, 608-616.

- Kozak, M., 1987, An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15, 8125-8148.
- Kraus, H., Weber, A., Enders, B., Schiefer, H.G., Slenczka, W., Zahner, H., 1997, Durch Nematoden verursachte Erkrankungen, In: Zoonosen, Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. Kapitel 4.5, 469-511, Deutscher Ärzte-Verlag.
- Krause, M., Hirsh, D., 1987, A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. *Cell* 49, 753-761.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001, Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology* 305, 567-580.
- Kunkel, B.N., Brooks, D.M., 2002, Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 5, 325-331.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007, Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Little, P.R., Hodge, A., Maeder, S.J., Wirtherle, N.C., Nicholas, D.R., Cox, G.G., Conder, G.A., 2011, Efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. *Vet Parasitol* 181, 180-193.
- Löscher, W., 2002, Pharmaka mit Wirkung auf das autonome (vegetative) Nervensystem. In: Löschner, W., Ungemach, F.R., Kroker R., Pharmakotherapie bei Haus-und Nutztieren: Kapitel A, 39-59, Parey
- Macdonald, R.L., Olsen, R.W., 1994, GABA_A receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17, 569-602.
- Martin, R.J., 1985, gamma-Aminobutyric acid- and piperazine-activated single-channel currents from *Ascaris suum* body muscle. *Br J Pharmacol* 84, 445-461.
- Martin, R.J., 1997, Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J* 154, 11-34.
- Martin, R.J., Verma, S., Levandoski, M., Clark, C.L., Qian, H., Stewart, M., Robertson, A.P., 2005, Drug resistance and neurotransmitter receptors of nematodes: recent studies on the mode of action of levamisole. *Parasitology* 131 Suppl, 71-84.
- Maupas, E., 1900, Modes et formes de reproduction des nematodes. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale* 8, 463-624.

- McIntire, S.L., Jorgensen, E., Kaplan, J., Horvitz, H.R., 1993, The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364, 337-341.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M., Toro, L., 1997, Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14066-14071.
- Mehlhorn, H., Piekarski, G., 2002, Fadenwürmer, In: *Grundriß der Parasitenkunde*, Kapitel 14, 285-353. Spektrum akademischer Verlag Gustav Fischer.
- Miyadoh, S., Hiroko K., Aoyagi, K., Yaguchi, T., Okada, T., Sugiyama, J., 2000, Taxonomic position of the fungus producing the anthelmintic PF1022 based on the 18S rRNA gene base sequence. *Nippon Kingakukai Kaiho* 41, 183-188.
- Moller, S., Croning, M.D., Apweiler, R., 2001, Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17, 646-653.
- Morand, S., 1996, Life-History Traits in Parasitic Nematodes: A Comparative Approach for the Search of Invariants. *Functional Ecology* 10, 210-218.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Mülhardt, C., 2006, Einige grundlegende Methoden, In: *Der Experimentator, Molekularbiologie/ Genomics* 5. Auflage: Kapitel 2, 12-41, Elsevier Spektrum akademischer Verlag
- Nicolay, F., Harder, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Mehlhorn, H., 2000, Synergistic action of a cyclic depsipeptide and piperazine on nematodes. *Parasitol Res* 86, 982-992.
- Ondeyka, J.G., Goegelman, R.T., Schaeffer, J.M., Kelemen, L., Zitano, L., 1990, Novel antinematodal and antiparasitic agents from *Penicillium charlesii*. I. Fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* 43, 1375-1379.
- Overend, D.J., Phillips, M.L., Poulton, A.L., Foster, C.E., 1994, Anthelmintic resistance in Australian sheep nematode populations. *Aust Vet J* 71, 117-121.
- Pedra, J.H.F., Hostetler, A., Gaffney, P.J., Reenan, R.A., Pittendrigh, B.R., 2004, Hyper-susceptibility to deltamethrin in para^{ts-1} DDT resistant *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 78, 58-66.
- Perry, M.D., Hertz, G.Z., Wood, W.B., 1990, Preliminary consensus for translation initiation in *C. elegans*. *Worm Breeder's Gazette* 11, 77.

- Petry, G., Kruedewagen, E., Bach, T., Gasda, N., Krieger, K.J., 2011, Efficacy of Procox(R) oral suspension for dogs (0.1% emodepside and 2% toltrazuril) against experimental nematode (*Toxocara cati* and *Ancylostoma tubaeforme*) infections in cats. *Parasitol Res* 109 Suppl 1, 37-43.
- Pittendrigh, B.R., Gaffney, P., Murdock, L.L., 2000, Deterministic modeling of negative cross-resistance strategies for use in transgenic host-plant resistance. *J Theor Biol* 204, 135-150.
- Pittendrigh, B.R., Gaffney, P.J., 2001, Pesticide resistance: can we make it a renewable resource? *J Theor Biol* 211, 365-375.
- Politz, S.M., Philipp, M., 1992, *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes: a focus on the cuticle. *Parasitol Today* 8, 6-12.
- Prichard, R.K., Hall, C.A., Kelly, J.D., Martin, I.C., Donald, A.D., 1980, The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust Vet J* 56, 239-251.
- Rand, J.B., 2007, Acetylcholine. *WormBook*, 1-21.
- Reinemeyer, C.R., Charles, S.D., Buch, J., Settje, T., Altreuther, G., Cruthers, L., McCall, J.W., Young, D.R., Epe, C., 2005, Evaluation of the efficacy of emodepside plus praziquantel topical solution against ascarid infections (*Toxocara cati* or *Toxascaris leonina*) in cats. *Parasitol Res* 97 Suppl 1, 41-50.
- Rew, R.S., Urban, J.F., Jr., Douvres, F.W., 1986, Screen for anthelmintics, using larvae of *Ascaris suum*. *Am J Vet Res* 47, 869-873.
- Richmond, J.E., Jorgensen, E.M., 1999, One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci* 2, 791-797.
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B., Priess, J.R., 1997, Introduction to *C. elegans*, In: *C. elegans* II. Kapitel 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rufener, L., Baur, R., Kaminsky, R., Maser, P., Sigel, E., 2010, Monepantel allosterically activates DEG-3/DES-2 channels of the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*. *Mol Pharmacol* 78, 895-902.
- Ruiz-Lancheros, E., Viau, C., Walter, T.N., Francis, A., Geary, T.G., 2011, Activity of novel nicotinic anthelmintics in cut preparations of *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol* 41, 455-461.
- Rytinki, M.M., Lakso, M., Pehkonen, P., Aarnio, V., Reisner, K., Perakyla, M., Wong, G., Palvimo, J.J., 2011, Overexpression of SUMO perturbs the growth and development of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol Life Sci* 68, 3219-3232.
- Saeger, B., Schmitt-Wrede, H.P., Dehnhardt, M., Benten, W.P., Krucken, J., Harder, A., Von Samson-Himmelstjerna, G., Wiegand, H., Wunderlich, F.,

- 2001, Latrophilin-like receptor from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* as target for the anthelmintic depsipeptide PF1022A. *Faseb J* 15, 1332-1334.
- Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., Wei, A., 2006, High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nature reviews* 7, 921-931.
- Sasaki, T., Takagi, M., Yaguchi, T., Miyadoh, S., Okada, T., Koyama, M., 1992, A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *J Antibiot (Tokyo)* 45, 692-697.
- Schimmel, A., Schroeder, I., Altreuther, G., Settje, T., Charles, S., Wolken, S., Kok, D.J., Ketzis, J., Young, D., Hutchens, D., Krieger, K.J., 2011, Efficacy of emodepside plus toltrazuril (Procox((R)) oral suspension for dogs) against *Toxocara canis*, *Uncinaria stenocephala* and *Ancylostoma caninum* in dogs. *Parasitol Res* 109 Suppl 1, 1-8.
- Schnieder, T., Tenter, A., 2006, Erreger von Parasitosen: Taxonomie, Systematik und allgemeine Merkmale, In: Schnieder, T (Hrg.): *Veterinärmedizinische Parasitologie: Kapitel 1.2*, 26-72, Parey.
- Schnieder, T., Laabs, E.M., Welz, C., 2011, Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Vet Parasitol* 175, 193-206.
- Sheehy, B.A., Ho, N.F., Burton, P.S., Day, J.S., Geary, T.G., Thompson, D.P., 2000, Transport of model peptides across *Ascaris suum* cuticle. *Mol Biochem Parasitol* 105, 39-49.
- Shimokawa, T., Nunomura, S., Enomoto, Y., Ra, C., 2010, Amino acid residues in the β 3 strand and subsequent loop of the conserved ETS domain that mediate basic leucine zipper (bZIP) recruitment and potentially distinguish functional attributes of Ets proteins. *Biochem. J.* 430, 129-139.
- Shoop, W.L., Eary, C.H., Michael, B.F., Haines, H.W., Seward, R.L., 1991, Anthelmintic activity of paraherquamide in dogs. *Vet Parasitol* 40, 339-341.
- Siddiqui, S.Z., Brown, D.D., Rao, V.T., Forrester, S.G., 2010, An UNC-49 GABA receptor subunit from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* is associated with enhanced GABA sensitivity in nematode heteromeric channels. *J Neurochem* 113, 1113-1122.
- Solomon, A., Bandhakavi, S., Jabbar, S., Shah, R., Beitel, G.J., Morimoto, R.I., 2004, *Caenorhabditis elegans* OSR-1 regulates behavioral and physiological responses to hyperosmotic environments. *Genetics* 167, 161-170.
- Sonnhammer, E.L.L., Von Heijne, G., Krogh, A., 1998, A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In: *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, Menlo Park, CA, 175-182.

- Soulsby, L., 2007, New concepts in strongyle control and anthelmintic resistance: the role of refugia. *Vet J* 174, 6-7.
- Steinmann, P., Zhou, X.N., Du, Z.W., Jiang, J.Y., Xiao, S.H., Wu, Z.X., Zhou, H., Utzinger, J., 2008, Tribendimidine and albendazole for treating soil-transmitted helminths, *Strongyloides stercoralis* and *Taenia spp.*: open-label randomized trial. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e322.
- Stiernagle, T., 2006, Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, 1-11.
- Suarez, V.H., Cristel, S.L., 2007, Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina. *Vet Parasitol* 144, 111-117.
- Sutherland, I.A., Leathwick, D.M., 2010, Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends Parasitol* 27, 176-181
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Tenter, A., 2006, Begriffserklärungen. In: Schnieder, T (Hrg.): *Veterinärmedizinische Parasitologie: Kapitel 1.1*, 1-26, Parey
- Terada, M., 1992, Neuropharmacological mechanism of action of PF1022A, an antinematode anthelmintic with a new structure of cyclic depsipeptide, on *Angiostrongylus cantonensis* and isolated frog rectus. *Jpn J Parasitol* 41, 108-117.
- Terunuma, M., Xu, J., Vithlani, M., Sieghart, W., Kittler, J., Pangalos, M., Haydon, P.G., Coulter, D.A., Moss, S.J., 2008, Deficits in phosphorylation of GABA(A) receptors by intimately associated protein kinase C activity underlie compromised synaptic inhibition during status epilepticus. *J Neurosci* 28, 376-384.
- Tusnady, G.E., Simon, I., 1998, Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *Journal of molecular biology* 283, 489-506.
- Tusnady, G.E., Simon, I., 2001, The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17, 849-850.
- Ungemach, F. R. 2002. Antiparasitika. In: Löschner, W., Ungemach, F.R., Kroker R., *Pharmakotherapie bei Haus-und Nutztieren: Kapitel O*, 247-288, Parey
- Van Wyk, J.A., Stenson, M.O., Van der Merwe, J.S., Vorster, R.J., Viljoen, P.G., 1999, Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort J Vet Res* 66, 273-284.

- Van Wyk, J.A., 2001, Refugia--overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J Vet Res* 68, 55-67.
- Vartiainen, S., Aarnio, V., Lakso, M., Wong, G., 2006, Increased lifespan in transgenic *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *Exp Gerontol* 41, 871-876.
- von Heijne, G., 1992, Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J of mol biol* 225, 487-494.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Harder, A., Schnieder, T., Kalbe, J., Mencke, N., 2000, In vivo activities of the new anthelmintic depsipeptide PF 1022A. *Parasitol Res* 86, 194-199.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Harder, A., Sangster, N.C., Coles, G.C., 2005, Efficacy of two cyclooctadepsipeptides, PF1022A and emodepside, against anthelmintic-resistant nematodes in sheep and cattle. *Parasitology* 130, 343-347.
- von Samson-Himmelstjerna, G., 2006, Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 136, 99-107.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Fritzen, B., Demeler, J., Schurmann, S., Rohn, K., Schnieder, T., Epe, C., 2007, Cases of reduced *cyathostomin* egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Vet Parasitol* 144, 74-80.
- Weiger, T.M., Hermann, A., Levitan, I.B., 2002, Modulation of calcium-activated potassium channels. *J Comp Physiol* 188, 79-87.
- Welz, C., Harder, A., Schnieder, T., Hoglund, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2005, Putative G protein-coupled receptors in parasitic nematodes-potential targets for the new anthelmintic class cyclooctadepsipeptides? *Parasitol Res* 97 Suppl 1, 22-32.
- Welz, C., Krueger, N., Schniederjans, M., Miltsch, S.M., Kruecken, J., Guest, M., Holden-Dye, L., Harder, A., von Samson-Himmelstjerna, G., 2011, SLO-1-Channels of Parasitic Nematodes Reconstitute Locomotor Behaviour and Emodepside Sensitivity in *Caenorhabditis elegans* slo-1 Loss of Function Mutants. *PLoS Pathog* 7, e1001330.
- World Health Organisation (WHO). World Malaria Report, 2010, In World Malaria Report, p. 238.
- Willson, J., Amliwala, K., Harder, A., Holden-Dye, L., Walker, R.J., 2003, The effect of the anthelmintic emodepside at the neuromuscular junction of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Parasitology* 126, 79-86.

- Willson, J., Amliwala, K., Davis, A., Cook, A., Cuttle, M.F., Kriek, N., Hopper, N.A., O'Connor, V., Harder, A., Walker, R.J., Holden-Dye, L., 2004, Latrotoxin receptor signaling engages the UNC-13-dependent vesicle-priming pathway in *C. elegans*. *Curr Biol* 14, 1374-1379.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2004, Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitology* 20, 469-476.
- Xiao, S.H., Hui-Ming, W., Tanner, M., Utzinger, J., Chong, W., 2005, Tribendimidine: a promising, safe and broad-spectrum anthelmintic agent from China. *Acta tropica* 94, 1-14.
- Yamamoto, I., Kyomura, N., Takahashi, Y., 1993, Negatively correlated cross resistance: Combinations of N-Methylcarbamate with N-Propylcarbamate or Oxadiazolone for green rice leafhopper. *Archives of insect biochemistry and physiology* 22, 277-288.
- Yamazaki, M., Okuyama, E., 1981, The Structure of Paraherquamide, a Toxic Metabolite from *Penicillium Paraherquei* *Tetrahedron Letters* 22, 135 -136.
- Zinser, E.W., Wolf, M.L., Alexander-Bowman, S.J., Thomas, E.M., Davis, J.P., Groppi, V.E., Lee, B.H., Thompson, D.P., Geary, T.G., 2002, Anthelmintic paraherquamides are cholinergic antagonists in gastrointestinal nematodes and mammals. *J Vet Pharmacol Ther* 25, 241-250.

9. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
bidest. H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
as	Aminosäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
BLAST	basic local alignment search tool
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
et al.	Lat.: et alii (und andere)
Fw	vorwärts (forward)
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
G	Guanidin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein von <i>Aequorea victoria</i>
GIT	Guanidin-Isothiocanat
h	Stunde
kb	Kilobase
kg	Kilogramm
L	Liter
LB	Luria broth
L1	erste Larve
L2	zweite Larve
L3	dritte Larve

Abkürzungsverzeichnis

L4	vierte Larve
M	Mol/L
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Boten-RNA ("messenger" RNA)
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
nM	nanomolar
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
RACE	"Rapid Amplification of cDNA Ends"
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute ("rounds per minute")
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
Rv	rückwärts (reverse)
s	Sekunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U	unit
UPM	Universal Primer
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
µg	Mikrogramm

10. Anhang

10.1 Verwendete Primer

Internationales Buchstabensystem, der IUPAC-Code für Nukleotide zur Herstellung von Primergemischen.

Basenkombination	Code
A+C+G+T	N
A+C+G	V
A+T+G	D
T+C+G	B
A+T+C	H
A+T	W
C+G	S
T+G	K
A+C	M
C+T	Y
A+G	R

Tab. 10.1: IUPAC-Code für Nukleotide

In den folgenden Tabellen sind angegeben: Primernamen, Primersequenzen, die Orientierung des Primers in der Sequenz, die Produktgröße, die sich aus dem Primerpaar ergeben hat und das PCR-Temperaturprofil bestehend aus der Anlagerungstemperatur (AT), der Elongationszeit (EZ) und dem benutzten Enzym. Es wurde entweder das "Accu Prime Taq DNA Polymerase System" (abgekürzt als AccuPrime) oder das "Accu Prime Taq DNA Polymerase System High Fidelity" (abgekürzt als HighFid) von Invitrogen benutzt.

Primernamen	Primersequenz	Orientierung	Produktgröße	AT	EZ	Enzym
Unc49B2Fw	CCA AAT GAR AAR AAA TCA T	→Fw	ca.160 bp	49 °C	1 min	HighFid
Unc49B2Rv	TGA GAR TCC	→Rv				

	ATT GGG AAY AG					
PCR Anker- primer (Roche)	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TTV	→ Fw	ca. 750 bp	70 °C	2 min	HighFid
T.c.unc5-2	TTG CAA CTT CAT CGG ACA AGT AGC TG	→ Rv				
Unc49B2Fw	CCA AAT GAR AAR AAA TCA T	→ Fw	ca. 500 bp	53 °C	2 min	HighFid
Unc49B7Rv	AGY AAY GAG GCG AAT ACC ATD ACR AA	→ Rv				
Test F1 Fw	TGT TGC CAC AAC GCA TAA CT	→ Fw	ca. 1000 bp	49 °C	2 min	Accu Prime
Unc49B9Rv	TTG AAG AHA GAG VAA GAD WAT GG	→ Rv				
T.c. unc 3-20	CTC CCG ATA CGT TTT TCC ATT GCT CT	→ Fw	ca. 250 bp	55 °C	2 min	Accu Prime
PCR Anker- primer (Roche)	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C	→ Rv				
T.c. unc49FL2.F w	AGC GGC TGC ATA GAG TGA AT	→ Fw	ca. 1600 bp	64 °C	2 min	Accu Prime
T.c.unc49 FL2.Rv	GTG GAG TTA TGA GAG TTG AGG AA	→ Rv				

Tab. 10.2: Verwendete Primer zur Identifikation der *T. canis* unc-49B cDNA Sequenz.

Anhang

Primername	Primersequenz	Orientierung	Produktgröße	AT	EZ	Enzym
Prom 3000 1	TGC ATT TTT CAG CTC ACT CG	→Fw	ca. 3000 bp	60 °C	3 min	Accu Prime
Prom-nhe-1Rv1	GCT AGC TTC TCG AGA ATG GAG CTT CT	→Rv				

Tab. 10.3: Verwendete Primer zur Amplifikation des *C. elegans unc-49* Promotors.

Primername	Primersequenz	Orientierung	Produktgröße	AT	EZ	Enzym
3' UTR PST1.1Fw	CTG CAG CAT CTC GCG CCC GTG CCT CT	→Fw	ca. 750 bp	60 °C	2 min	Accu Prime
3' UTR sbf1.Rv	CCT GCA GGA AAC AGT TAT GTT TGG TAT ATT GGG AAT	→Rv				

Tab. 10.4: Verwendete Primer zur Amplifikation der *C. elegans unc-54* 3' UTR.

Primername	Primersequenz	Orientierung	Produktgröße	AT	EZ	Enzym
RT Fw3	GCT CCA GTT GAA ATG CCA AT	→Fw	ca. 220 bp	60 °C	1 min	Accu Prime
RT Rv3	CGG GAG CAT TTG TCA ATC TT	→Rv				
T.c.unc49.nh e-1Fw1	GCT AGC AAA ATG CAT CTC GCT AAG AAC GG	→Fw	ca. 1500	65 °C	2 min	Accu Prime
T.c.unc49.P ST-1.1Rv	CTG CAG TCA CTC GAA AGA TAT	→Rv				

Tab 10.5: Verwendete Primer zur Amplifikation der *T. canis unc-49B* cDNA Sequenz und des Fragmentes der *T. canis unc-49B* cDNA Sequenz in der RT-PCR.

10.2 Verwendete Sequenzen

Organismus	Gen	"accession number"
<i>H. contortus</i>	unc-49B	EU939734
<i>H. contortus</i>	unc-49C	EU049602
<i>C. elegans</i>	unc-49A	AF151640
<i>C. elegans</i>	unc-49B	AF151642
<i>C. elegans</i>	unc-49C	AF151644
<i>A. suum</i>	unc-49B	JI173655
<i>B. malayi</i>	unc-49B	XP_001894065

Tab. 10.6: Verwendete Sequenzen anderer Organismen mit "accession numbers".

10.3 Verwendete Vektoren

10.3.1 pPD 118.33 (Adgene plasmid: 1595)

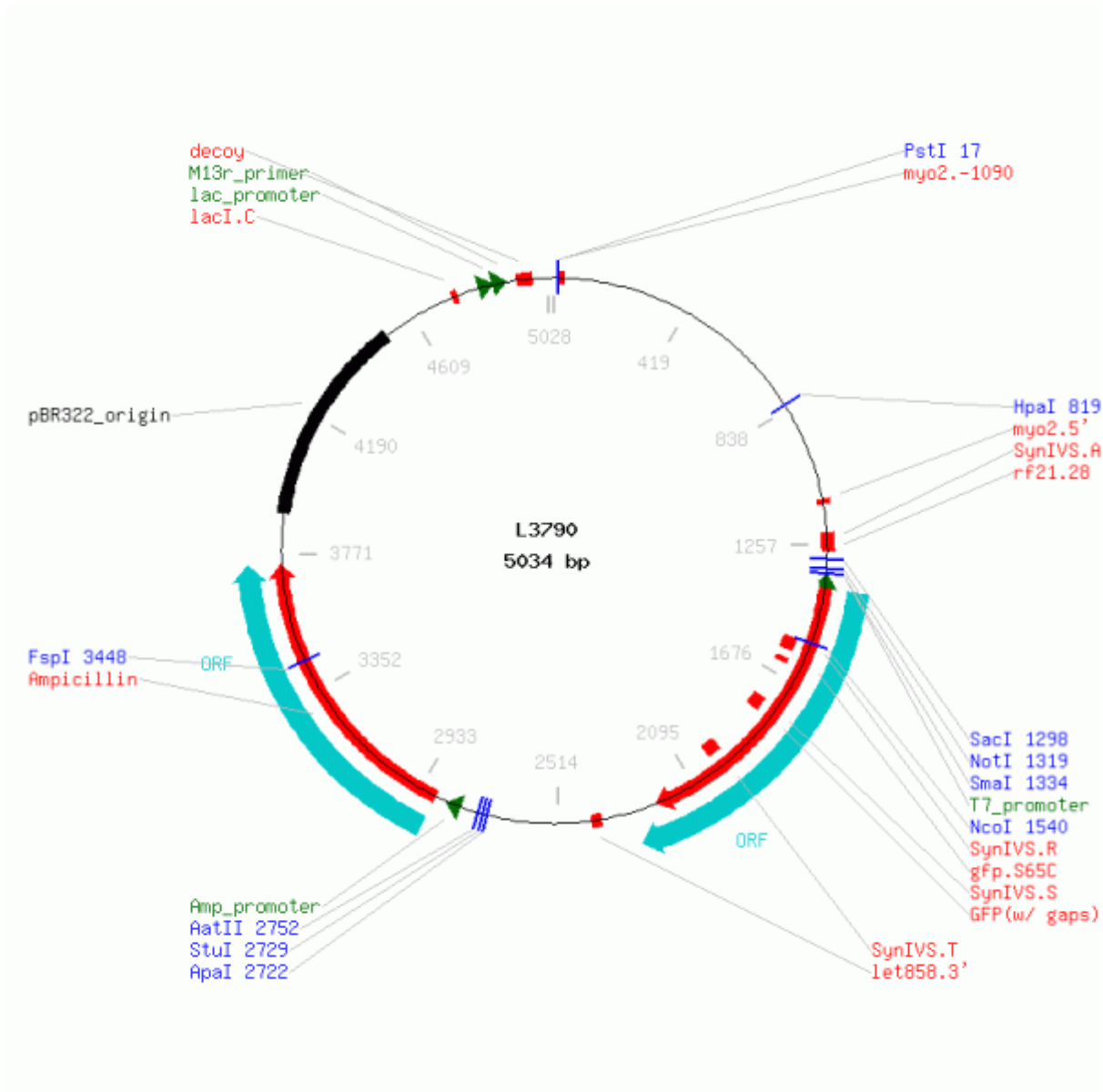


Abb. 10.1 Von www.addgene.org.

10.3.2 PCR[®]4-Topo[®] Vektor (Invitrogen)

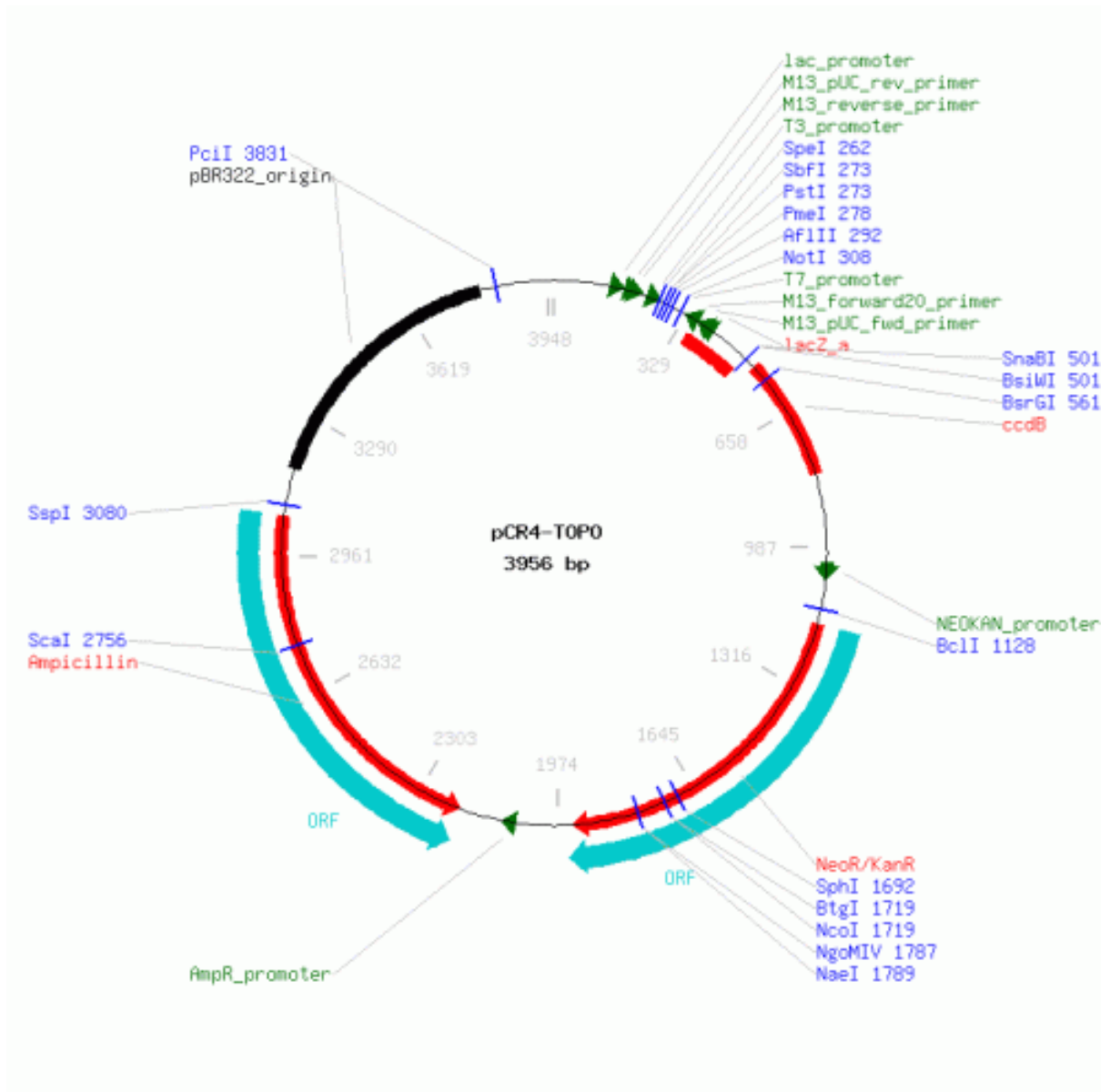


Abb.10.2 Von www.invitrogen.com.

11. Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten.

12. Publikationsliste

Paper

Claudia Welz, Nina Krüger, Monika Schniederjans, **Sandra M. Miltsch**, Jürgen Krücken, Marcus Guest, Lindy M. Holden-Dye, Achim Harder, Georg von Samson-Himmelstjerna, (2011) "*SLO-1-channels of parasitic nematodes reconstitute locomotor behaviour and emodepside sensitivity in Caenorhabditis elegans slo-1 loss of function mutants*", Plos Pathog, 7 (4)

Wissenschaftliche Vorträge:

21. bis 25. August 2011

The 23st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology; Parasites in a changing landscape, Buenos Aires,

S. Miltsch, J. Krücken, J. Demeler, N. Krüger, A. Harder, G. von Samson-Himmelstjerna
„*Emodepside potentially interacts with the γ -Aminobutyric acid (GABA) receptor and the acetylcholine receptor in Caenorhabditis elegans*”

14. bis 16. März 2010

Young Parasitologists Meeting, Düsseldorf

S. Miltsch, N. Krüger, J. Krücken, A. Harder, G. von Samson-Himmelstjerna
“*Analysis of the involvement of neuronal receptors from parasitic nematodes and Caenorhabditis elegans in the mode of action of the anthelmintic Emodepside*”

17. bis 19. Juni 2009

Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft – Fachgruppe Parasitologie; Diagnostik, Epidemiologie und Bekämpfung von Parasitosen bei Nutz-, Haus- und Heimtieren, Leipzig

S. Miltsch, N. Krüger, J. Krücken, A. Harder, G. von Samson-Himmelstjerna
„*Überprüfung neuronaler Rezeptoren bei parasitischen Nematoden und Caenorhabditis elegans auf ihre Beteiligung am Wirkmechanismus des Anthelminthikums Emodepsid*“

Posterpräsentationen:

21. bis 25. August 2011

The 23st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology; Parasites in a changing landscape, Buenos Aires,

S. Miltsch, J. Krücken, J. Demeler, N. Krüger, A. Harder, G. von Samson-Himmelstjerna
„*Interactions of new anthelmintic drugs in Caenorhabditis elegans neuronal receptor mutants*”

4. bis 6. Juli 2011

Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft – Fachgruppe Parasitologie; Diagnostik, Epidemiologie und Bekämpfung von Parasitosen bei Nutz-, Haus- und Heimtieren, Berlin,

S. Miltsch, J. Krücken, J. Demeler, A. Harder, G. von Samson-Himmelstjerna
„*Untersuchungen von Wechselwirkungen neuer anthelminthischer Wirkstoffe an Caenorhabditis elegans Stämmen mit Veränderungen in verschiedenen neuronalen Rezeptoren.*“

17. bis 19. März 2010

The German Society for Parasitology, 24rd Annual Meeting, Düsseldorf

S. Miltch, N. Krüger, J. Krücken, A. Harder, G. von Samson-Himmelstjerna

„The nematode gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor and its relevance for the anthelmintic action of Emodepside “

8. bis 13. August 2009

The 22st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology; Parasites in a changing landscape, Calgary

S. Miltch, N. Krüger, J. Krücken, A. Harder, G. von Samson-Himmelstjerna

„Analysis of the involvement of neuronal receptors from parasitic nematodes and Caenorhabditis elegans in the mode of action of the anthelmintic Emodepside“

13. Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt zu haben. Außerdem versichere ich, dass die zugrunde liegenden Ergebnisse nicht für eine andere Prüfungsarbeit verwendet wurden.

Sandra Miltsch

Berlin im November 2011

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Außerdem möchte ich mich für die stets begeisterte und freundliche Unterstützung bedanken, sowie für das große in mich gesetzte Vertrauen auch im Hinblick auf die Möglichkeit meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Fachtagungen vorzustellen.

Ich danke PD. Dr. Jürgen Krücken und Prof. Dr. Janina Demeler für ihre unermüdliche kompetente Hilfe und für die vielen Anregungen zu neuen Lösungsansätzen und Experimenten, sowie dafür dass sie selbst im größten Stress stets ein offenes Ohr hatten.

Ich danke der Bayer HealthCare AG für ihre freundliche Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit, sowie die finanzielle Förderung des Projektes. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Achim Harder für seine Begeisterungsfähigkeit und fachliche Unterstützung.

Nina Krüger und Claudia Welz gilt mein besonderer Dank vor allem für die Anfangszeit des Projektes, in der sie mich unterstützt und stets mit nützlichen Anregungen versorgt haben.

Ich danke der gesamten Belegschaft des Instituts für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover für die wundervolle Anfangszeit meiner Doktorarbeit, für viel kompetente Hilfe und Anregungen und für ein angenehmes und konstruktives Arbeitsklima.

Ich danke Stefan, Daniela, Petra und Jana für viele fachliche und nicht-fachliche Gespräche, aufbauende Worte und Burger nach Feierabend. Petra und Jana danke ich besonders für ihre Freundschaft und ihre Herzlichkeit. Ohne euch und "Was bin ich?" wäre es sehr viel schwerer gewesen.

Danksagung

Ich danke allen Doktoranden des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin für ein angenehmes Arbeitsumfeld, nette Treffen auch nach Feierabend und die freundschaftliche Atmosphäre.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin für die Unterstützung und freundliche Aufnahme.

Ich danke Bertram Uecker für sein sonniges Gemüt, seine stets aufbauenden Worte und dafür dass er immer an meiner Seite ist, was auch kommen mag.

Ich danke meinen Eltern für ihren Glauben an mich, ihre unendliche Liebe und für ihre bedingungslose Unterstützung all meiner Pläne.