

**Die Rolle des Cytochrom P450-Systems bei der  
Resistenz von Wiederkäuernematoden gegen  
makrozyklische Laktone**

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. Bastian Gerst  
aus Berlin

2016

Die Dissertation wurde im Zeitraum von März 2011 bis Februar 2016 am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin an der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Betreut wurde die Dissertation von Frau Prof. Dr. Janina Demeler, Ph.D.

1. Gutachter: Prof. Dr. Janina Demeler, Ph.D,  
Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin,  
Freie Universität Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel,  
Institut für Biologie - Mikrobiologie,  
Freie Universität Berlin

Disputation am: 30.05.2016

Abbildung 1, Abbildung 2 und Abbildung 4 unterliegen sowohl in ihrer Ursprungs- als auch der in dieser Arbeit verwendeten Form der "Creative Commons Attribution (CC BY) license".

für den achtjährigen Bastian, der  
- aus welchem Antrieb auch immer -  
stets Naturforscher werden wollte

# Inhaltsverzeichnis

---

1	Einleitung .....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Nematoden .....	3
2.1.1	<i>Caenorhabditis elegans</i> .....	4
2.1.1.1	Biologie und Genetik .....	5
2.1.1.2	<i>C. elegans</i> als Modellorganismus.....	7
2.1.2	Trichostrongyloidea als parasitische Nematoden bei Wiederkäuern.....	9
2.2	Makrozyklische Laktone .....	10
2.2.1	Übersicht.....	10
2.2.1.1	Avermectine, mit besonderem Augenmerk auf Ivermectin.....	11
2.2.1.2	Milbemycine, mit besonderem Augenmerk auf Moxidectin .....	12
2.2.2	Wirkmechanismus .....	12
2.2.3	Biotransformation .....	14
2.2.4	Resistenzsituation .....	16
2.2.5	Resistenzmechanismen .....	17
2.3	P450 Cytochrome .....	19
2.3.1	Struktur und Funktion .....	19
2.3.1.1	P450 Cytochrome als Bestandteil der Biotransformationskaskade .....	23
2.3.2	P450 Cytochrome in <i>C. elegans</i> .....	24
2.3.3	P450 Cytochrome in parasitischen Nematoden.....	25
2.3.4	P450 Cytochrome in anderen parasitischen Organismen .....	26
2.3.5	<i>in silico</i> Modellierung von CYP-vermitteltem Xenobiotikametabolismus.....	28
2.4	Detektion von makrozyklischen Laktonen in biologischen Matrices .....	28
2.4.1	Nachweismethoden.....	29
2.4.2	Metabolite makrozyklischer Laktone in Nematoden.....	29
2.4.3	„Targeted Metabolomics“ und „Non-Targeted Metabolomics“ .....	30
3	Material & Methoden .....	31
3.1	Materialien .....	31

3.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	31
3.1.2	Reaktionskits.....	34
3.1.3	Anthelminthika- und Inhibitorstammlösungen .....	35
3.1.4	Reagenzien und Enzyme .....	35
3.1.5	Verwendete PCR-Primer und Primerpaarungen.....	37
3.1.5.1	Primer für die Suche nach <i>cyp-14A</i> -homologen Genen in parasitischen Nematoden .....	37
3.1.5.2	Primer für Etablierung und Durchführung der <i>cyp-14A5</i> -qPCR.....	38
3.1.5.3	Primer für die Überprüfung der Deletionsmutation.....	39
3.1.5.4	Primer für die Überprüfung der Auskreuzung der <i>C. elegans-cyp-14A5</i> -Deletionsmutation .....	39
3.1.6	Medien, Puffer und Lösungen .....	40
3.1.7	Chemikalien .....	41
3.1.8	Software.....	43
3.1.9	Verwendete <i>C. elegans</i> -Stämme.....	44
3.1.10	Isolate der parasitischen Nematoden .....	45
3.2	Methoden .....	46
3.2.1	Kultivierung und <i>in vitro</i> -Assays mit <i>C. elegans</i> .....	46
3.2.1.1	Kultivierung von <i>C. elegans</i> .....	46
3.2.1.2	<i>C. elegans</i> Entwicklungsassay .....	48
3.2.1.2.1	<i>C. elegans</i> Entwicklungsassay unter Zugabe von Piperonylbutoxid .....	52
3.2.1.3	Auskreuzen der <i>cyp-14A5</i> -Deletionsmutation in den Bristol-N2-Wildtypstamm.....	52
3.2.1.4	Inkubation und Aufarbeitung des Bristol-N2-Wildtypstammes mit Makrozyklischen Laktonen für die <i>cyp-14A5</i> -Expressionsuntersuchung...57	
3.2.2	Kultivierung und <i>in vitro</i> -Assays parasitische Nematoden .....	58
3.2.2.1	Lagerung der parasitischen Nematoden.....	58
3.2.2.2	Inkubation und Aufarbeitung von <i>C. oncophora</i> Drittlarven mit Makrozyklischen Laktonen zur Detektion von <i>cyp-14A</i> -homologen Genen mittels PCR mit degenerierten Primern .....	59

3.2.2.3	Inkubation und Aufarbeitung der <i>C. oncophora</i> Isolate mit Makrozyklischen Laktone für die massenspektrometrische Metabolitdetektion.....	60
3.2.3	Molekularbiologische Methoden .....	61
3.2.3.1	DNA- und RNA-Isolation .....	61
3.2.3.1.1	DNA-Isolation mit Maxwell® 16 System DNA Purification Kit (Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit) .....	61
3.2.3.1.2	DNA-Isolation mit Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue XS Kit .....	62
3.2.3.1.3	Plasmid-Isolation mit Biozym EasyPrep Pro Plasmid Miniprep Kit.....	62
3.2.3.1.4	Plasmid-Isolation mit Promega PureYield™ Plasmid Midiprep System ..	62
3.2.3.1.5	RNA-Isolation mit Maxwell® 16 LEV simplyRNA Kit (Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit).....	63
3.2.3.1.6	RNA-Isolation mit Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA Kit .....	64
3.2.3.1.7	RNA-Isolation mit Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA XS Kit .....	64
3.2.3.1.8	DNA-Extraktion aus Agarosegel mit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit .....	64
3.2.3.1.9	Aufreinigung von DNA mit Zymo Research DNA Clean & Concentrator™-5 Kit.....	65
3.2.3.1.10	DNA/RNA Konzentrationsbestimmung .....	65
3.2.3.2	cDNA-Synthese.....	65
3.2.3.2.1	cDNA-Synthese mittels Thermo Scientific Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit .....	65
3.2.3.2.2	cDNA-Synthese mittels Qiagen QuantiTect® Reverse Transcription Kit	65
3.2.3.2.3	cDNA-Synthese mittels Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit .....	66
3.2.3.3	Konventionelle PCR-Methoden .....	66
3.2.3.3.1	PCR unter Verwendung von Invitrogen AccuPrime™ Taq DNA Polymerase .....	66
3.2.3.3.2	PCR unter Verwendung von Thermo Scientific Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase .....	67
3.2.3.3.3	PCR unter Verwendung von Thermo Scientific Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase .....	68
3.2.3.4	Gelelektrophorese.....	69

3.2.3.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel ....	69
3.2.3.6	Ausschneiden von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	70
3.2.3.7	Klonierung.....	70
3.2.3.7.1	Agilent Technologies StrataClone Blunt PCR Cloning Kit.....	70
3.2.3.7.2	Agilent Technologies StrataClone PCR Cloning Kit.....	71
3.2.3.7.3	Invitrogen™ TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing, with One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i> .....	71
3.2.3.7.4	Restriktionsverdau .....	72
3.2.3.7.5	Anlage von Bacto-Stocks .....	72
3.2.3.8	DNA-Sequenzierung .....	72
3.2.3.9	Quantitative Real-Time-PCR .....	72
3.2.3.9.1	Vorarbeiten .....	72
3.2.3.9.2	Etablierung und Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR unter Verwendung von Promega GoTaq® qPCR Master Mix .....	73
3.2.4	Massenspektrometrische Methoden.....	74
3.2.5	Bioinformatische Methoden .....	75
3.2.5.1	Sammlung der CYP-Sequenzen .....	75
3.2.5.2	Sequenzalignment, phylogenetische Berechnung und Darstellung des phylogenetischen Baumes .....	76
3.2.5.3	Berechnung möglicher Ivermectin-/Moxidectinmetabolite.....	77
3.2.5.3.1	Das SMILES-Dateiformat.....	77
3.2.5.3.2	Vorhersage der bevorzugten Metabolisierungspositionen von IVM und MOX mittels SMARTCYP und MetaPrint2D .....	77
3.2.5.3.3	Berechnung theoretisch möglicher Metabolite mittels Metabolizer (Chemaxon) .....	78
3.2.5.3.4	Berechnung der Massen der berechneten und in der Literatur gefundenen Metabolite unter Berücksichtigung der Addukte.....	79
3.2.5.4	Aufarbeitung der massenspektrometrisch gewonnenen Daten für eine Analyse mit XCMS_online .....	79
3.2.5.5	Analyse der Daten mit XCMS_online .....	79
4	Ergebnisse .....	82

4.1	Sammlung der CYP-Sequenzen.....	82
4.1.1	Sammlung der <i>C. elegans</i> -CYP-Sequenzen .....	82
4.1.2	Sammlung von CYPs, die in ihrer biologischen Funktion mit makrozyklischen Laktonen interagieren, aus anderen Organismen.....	83
4.2	Entwicklungsassays mit <i>C. elegans</i> .....	87
4.2.1	Entwicklungsassays unter Verwendung von makrozyklischen Laktonen und Piperonylbutoxid.....	87
4.2.2	Screening der <i>C. elegans</i> -CYP-loss-of-function-Mutantenstämme .....	90
4.2.3	Weiterführende Untersuchung ausgewählter Stämme sowie des VC249- Stammes.....	92
4.2.4	Entwicklungsassay mit vierfach ausgekreuztem VC249-Stamm (VC249_X4) .	94
4.3	Auskreuzung der <i>cyp-14A5</i> -Deletionsmutation in den Bristol-N2-Wildtyp .....	99
4.4	<i>cyp-14A5</i> -Expressionsanalyse in <i>C. elegans</i> .....	100
4.4.1	Etablierung und Durchführung.....	100
4.4.1.1	Klonierung der Ziel- und Referenzgenfragmente .....	100
4.4.1.2	Etablierung und Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR.....	106
4.4.2	Ergebnis der <i>cyp-14A5</i> -Expressionsanalyse .....	108
4.5	Phylogenetische Untersuchungen: <i>cyp-14A</i> -homologe Gene in parasitischen Nematoden .....	109
4.5.1	<i>In silico</i> -Suche nach <i>cyp-14A</i> -Homologen .....	109
4.5.1.1	Local-BLAST gegen das <i>H. contortus</i> Genom (PRJEB506) .....	109
4.5.1.2	NCBI-BLAST .....	111
4.5.1.3	<i>cyp-14A5</i> -Homologe nach wormbase.org.....	112
4.5.1.4	NemaBLAST .....	114
4.5.1.5	Alignment der beiden <i>A. suum</i> -Sequenzen aus wormbase.org und NemaBLAST .....	115
4.5.2	Detektion von <i>cyp-14A</i> -homologen Genen in parasitischen Nematoden mittels PCR mit degenerierten Primern .....	116
4.5.2.1	Detektion in nicht-induzierten parasitischen Nematoden .....	116
4.5.2.2	Detektion in Ivermectin-induzierten <i>C. oncophora</i> .....	119



4.6	Massenspektrometrische Detektion von Ivermectin- und Moxidectinmetaboliten in <i>C. oncophora</i> .....	122
4.6.1	Metabolite und Metabolitkandidaten von Ivermectin und Moxidectin .....	122
4.6.1.1	Bevorzugte Metabolisierungspositionen von Ivermectin und Moxidectin nach MetaPrint2D .....	122
4.6.1.2	In der Literatur beschriebene Ivermectin- und Moxidectinmetabolite .....	123
4.6.1.3	Berechnete Metabolite von Ivermectin und Moxidectin.....	125
4.6.1.3.1	Per Metabolizer (Chemaxon) berechnete Metabolite von Ivermectin und Moxidectin.....	125
4.6.1.3.2	Auf Vorhersage von MetaPrint2D-React berechnete Metabolite von Moxidectin.....	128
4.6.2	Untersuchung der LC/MS-Messläufen der mit Makrozyklischen Laktone inkubierten <i>C. oncophora</i> -Ansätze auf bekannte und berechnete Ivermectin- und Moxidectinmetabolite.....	131
4.6.2.1	Evaluierung der Genauigkeit der LC/MS-Messung.....	131
4.6.2.2	Mit den ML-Metabolitkandidat-Adduktmassen übereinstimmende experimentell ermittelte m/z-Werte .....	134
4.6.3	Meta-Analyse zur Identifikation von Massen, die einzig im Inkubationsansatz „ML und <i>C. oncophora</i> “ vorhanden sind .....	139
5	Diskussion.....	140
5.1	Das CYPom von <i>C. elegans</i> und ML-assoziierte CYPs anderer Organismen.....	140
5.2	Das Screening der <i>C. elegans</i> -CYPs im Entwicklungsassay und die Auswirkung der CYP-Inhibierung auf die ML-Empfindlichkeit von <i>C. elegans</i> .....	142
5.3	Auskreuzung der <i>cyp-14A5</i> -Deletionsmutation in den Bristol-N2-Wildtyp .....	148
5.4	Die Untersuchung der Expression des <i>cyp-14A5</i> -Gens in Antwort auf ML-Vorinkubation mit Hilfe von quantitativer Real-Time-PCR.....	149
5.5	Die Suche nach <i>cyp-14A</i> -homologen Genen in parasitischen Nematoden .....	150
5.6	Massenspektrometrische Detektion.....	151
5.7	Fazit .....	154
6	Zusammenfassung.....	156
7	Summary.....	158
8	Literaturverzeichnis .....	160

9	Anhang.....	184
10	Publikationen.....	190
	Selbstständigkeitserklärung.....	ii
	Danksagung .....	iii

## Abkürzungsverzeichnis

---

µl	Mikoliter
Å	Ångström
A. dest	Aqua destillata
AA	Aminosäure
AUC	area under the curve
AVM	Abamectin
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
CGC	Caenorhabditis Genetics Center, University of Missouri, Columbia
cm	Zentimeter
CPR	Cytochrome P450 Reduktase
CYP	P450 Cytochrom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EST	expressed sequence tag
F0	Parentalgeneration
F1	erste filiale Generation
F2	zweite filiale Generation
FLD	fluorometrische Detektion
GFP	green fluorescent protein
GluCl	Glutamat-gesteuerte-Chloridkanäle
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-FLD	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit fluorometrischer Detektion
IVM	Ivermectin
k.A.	keine Angaben
L3	Drittlarve
LC-HRMS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit anschließender hochauflösender Massenspektrometrie
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LGCC	Liganden-gesteuerte-Chloridkanäle
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MEM-H <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	22,23-dihydro-13-O-[(2-methoxyethoxy)methyl]-avermectin B aglycone
min	Minute
ML	makrozyklische Laktone
ml	Milliliter
MOX	Moxidectin
MW	Molekulargewicht
ng	Nanogramm
OTU	operational taxonomic unit
PBO	Piperonylbutoxid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Retentionszeit
S	Siemens

SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SOM	site of metabolism
T <sub>HYB</sub>	Hybridisierungstemperatur
U*	modifiziertes Uridin

## 1 Einleitung

Die Fähigkeit von Populationen von Organismen sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen - bzw. angepasst zu werden - ist ein Schlüsselement der Evolution. Aus anthropozentrischer Sicht kann diese Fähigkeit zu negativen Folgen führen, etwa wenn bei Populationen von Pathogenen Anpassung an gegen sie eingesetzte Wirkstoffe auftritt und es zur Ausbildung von Resistenzen kommt. In der Human- und Veterinärmedizin ist die Ausbildung von Resistenzen ein bedeutendes Problem und vielfach für verschiedene Pathogene und Wirkstoffgruppen nachgewiesen. Von großer Bedeutung in der Veterinärmedizin sind parasitische Krankheitserreger, darunter viele Vertreter der Nematoden (Fadenwürmer). Zur Behandlung dieser Krankheitserreger werden u.a. Wirkstoffe aus der Gruppe der makrozyklischen Laktone (ML) verwendet: So auch bei Wiederkäuern, bei denen Infektionen mit gastrointestinal parasitierenden Nematoden zu gravierenden gesundheitlichen und wirtschaftlichen Schäden führen können. Die Wirkmechanismen der ML bei Nematoden sind relativ gut verstanden und beruhen auf einer irreversiblen Öffnung von Vertretern der Cys-Loop ligandengesteuerten Ionenkanälen, den Glutamat-gesteuerten Chloridkanälen (GluCl<sub>s</sub>), im Nervensystem der Parasiten, was zu deren Absterben führt (Geary and Moreno 2012). Hingegen sind die der Resistenz zugrundeliegenden Mechanismen noch weitestgehend unklar. Es zeichnet sich eine Beteiligung von Transmembranproteinen (u.a. P-Glykoproteinen) am Resistenzgeschehen ab (Lespine, Menez et al. 2012), doch wird auch das Beteiligtsein von Detoxifikationsenzymen wie den P450 Cytochromen (CYPs) diskutiert (AlGusbi, Krucken et al. 2014). Diese sind bei Wirbeltieren nachgewiesenermaßen am ML-Metabolismus beteiligt (Zeng, Andrew et al. 1996, Zeng, Andrew et al. 1998), darüber hinaus ist bekannt, dass sie bei Insekten in der Resistenz gegen Wirkstoffe aus anderen Gruppen wie z.B. den Pyrethroiden involviert sind (Ffrench-Constant, Daborn et al. 2004, Bariami, Jones et al. 2012). Für Nematoden ist die Nachweislage für die Beteiligung von CYPs am ML-Metabolismus noch sehr spärlich, in einer Arbeit konnte ein Moxidectin-Metabolit bei dem Schafparasiten *Haemonchus contortus* nachgewiesen werden, allerdings erfolgte keine genaue Identifizierung des Metaboliten (Alvinerie, Dupuy et al. 2001). Andere Versuche ML-Metabolite bei Nematoden nachzuweisen schlugen fehl (Laing 2010, Vokřál, Jedličková et al. 2013). Allerdings konnte gezeigt werden, dass durch Verwendung des allgemeinen CYP-Inhibitors Piperonylbutoxid sowohl ML-resistente als auch ML-suszeptible Stämme parasitischer Wiederkäuernematoden deutlich empfindlicher gegen ML wurden (AlGusbi, Krucken et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit sollten CYPs von Nematoden auf ihre mögliche Beteiligung am ML-Metabolismus und an ML-Resistenz überprüft werden. Hierzu wurde aufgrund seiner einfachen Haltung und experimentellen Zugänglichkeit primär mit dem Modellnematoden

*Caenorhabditis elegans* gearbeitet (Corsi 2006), da die Haltung von parasitischen Nematoden über ihren gesamten Lebenszyklus im Labor nicht möglich und auch das Maß an verfügbaren Arbeitsmethoden und biologischen Informationen für die vorliegende Fragestellung unzureichend ist. In einigen Teilprojekten konnte jedoch mit Drittlarven des Rindernematoden *Cooperia oncophora* gearbeitet werden.

Im Einzelnen umfasste der experimentelle Rahmen folgende Teilprojekte: Die Zusammenstellung aller bekannten CYPs von *C. elegans* und die Sammlung von CYPs, für die in der Literatur bei anderen Organismen Wechselwirkung mit ML gezeigt wurden. Ziel dieser Analyse sollte die mögliche Aufdeckung von CYP-Kandidaten bei *C. elegans* sein, die am ML-Metabolismus beteiligt sein könnten. In Entwicklungsassays sollten verschiedene *C. elegans*-CYP-Loss-of-function-Mutantenstämme hinsichtlich ihrer Entwicklungsfähigkeit in Gegenwart von definierten ML-Konzentrationen mit dem *C. elegans*-Wildtyp verglichen werden (gearbeitet wurde mit den ML Ivermectin und Moxidectin). Anhand dieser Daten sollen CYPs ausfindig gemacht werden, deren Funktionsverlust zu einer signifikant anderen Entwicklung des betreffenden Mutantenstammes im Vergleich zum Wildtyp führt und die als Kandidaten für weitere Analysen dienen könnten. Derart ermittelte *C. elegans*-CYP-Kandidaten sollten phylogenetischen Vergleichen mit bekannten Genomsequenzen parasitischer Nematoden unterzogen werden. Im Anschluss sollten auf Basis dieser Informationen degenerierte Primer entwickelt und mit diesen PCR-Detektion von homologen Genen in der cDNA von gastrointestinal-parasitischen Wiederkäuernematoden durchgeführt werden. Außerdem sollte der Einfluss der beiden verwendeten ML auf die Expression der ermittelten *C. elegans-cyp*-Kandidaten per quantitativer Real-Time-PCR untersucht werden. Abschließend sollte die Fähigkeit von parasitischen Nematoden zum ML-Stoffwechsel mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen untersucht werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Nematoden

Die Nematoden - zu Deutsch Fadenwürmer – stellen eine facettenreiche Tiergruppen innerhalb der Eumetazoa mit einer Verbreitung in Süß- und Salzwasser, in Erdboden und Moospolstern sowie in anderen terrestrischen Habitaten dar und haben außerdem außerordentliche Bedeutung als Parasiten von Menschen, Tieren und Pflanzen; sie sind die individuen-, nicht aber artenreichste Gruppe der Metazoa (Westheide, Rieger et al. 2004). Es handelt sich um langgestreckte, drehrunde Tiere, die sich durch das Vorhandensein von Hydroskelett und Hautmuskelschlauch (bestehend aus Cuticula, Epidermis und Längsmuskulatur) auszeichnen, sich schlängelnd fortbewegen und außer Papillen und Borsten keine Körperanhänge aufweisen (Westheide, Rieger et al. 2004). Nematoden sind überwiegend getrenntgeschlechtliche Organismen, allerdings sind auch Parthenogenese sowie Fortpflanzung über Hermaphroditen beschrieben. Die Entwicklung verläuft direkt über vier Juvenilstadien zum Adultus, zwischen den Stadien finden Häutungen statt. Die Männchen einiger Arten zeigen am Hinterende eine zum Festhalten des Weibchens während der Paarung genutzte Cuticulaausbildung, die Bursa copulatrix (Mehlhorn and Piekarski 2002). Freilebende Nematoden erreichen Längen von 0,2 – 50 mm, parasitische Vertreter können deutlich größer werden; den Rekord halten weibliche Individuen des Pottwalparasiten *Placentonema gigantissimum* mit einer Länge von bis zu 8,4 m (Westheide, Rieger et al. 2004). Bisher sind ungefähr 23000 Arten beschrieben, die Gesamtartenzahl wird aber auf > 1000000 geschätzt (Blaxter and Koutsovoulos 2015). Nematoden gehören systematisch zum Taxon der Ecdysozoa und werden gewöhnlich in fünf Untergruppen, sog. Clades unterteilt (Abbildung 1) (Blaxter, De Ley et al. 1998). Andere Autoren schlagen eine Unterteilung in zwölf Clades vor (van Megen, van den Elsen et al. 2009).

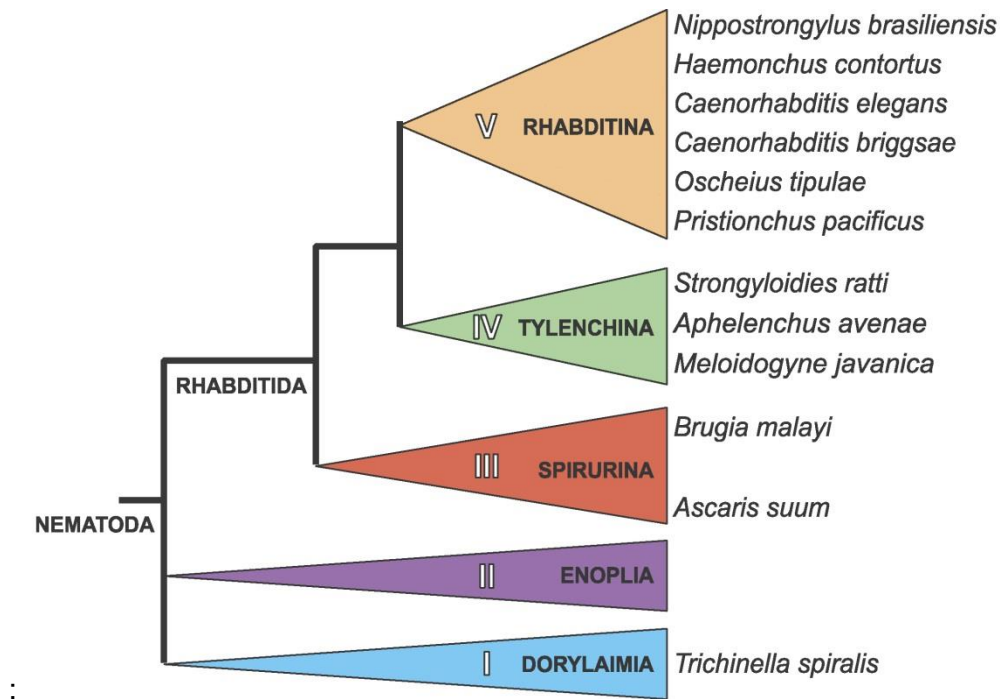


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der Nematoda. Dargestellt sind die fünf Clades mit ausgewählten Beispielarten (Abbildung modifiziert aus (Guiliano and Blaxter 2006))

### 2.1.1 *Caenorhabditis elegans*

Der Nematode *C. elegans* ist der bekannteste und am besten untersuchte Vertreter der nichtparasitischen Gattung *Caenorhabditis*, die zum fünften Clade, den sog. Rhabditina gehört (Abbildung 1).

Die Beantwortung der Frage hinsichtlich der Anzahl der Arten innerhalb der Gattung gestaltet sich etwas schwierig: 2010 wurde diese mit maximal 38 bekannten Arten angegeben (Kiontke, Félix et al. 2011). Da einige dieser Arten nur ein einziges Mal gefunden wurden und ihre wissenschaftliche Beschreibung unzureichend ist (Kiontke and Sudhaus 2006), ist hier die Gefahr von Doppelbeschreibung gegeben. Die tatsächliche Anzahl der existierenden *Caenorhabditis*-Arten wird deutlich höher geschätzt. Problematisch für die Artbestimmung ist das oftmals auftretende Fehlen von differenzierbaren morphologischen Merkmalen bei verschiedenen *Caenorhabditis*-Arten. Aktuell wird die Artbestimmung bzw. -abgrenzung mittels Untersuchungen zur reproduktiven Isolation kombiniert mit molekularbiologischen Sequenzanalysen durchgeführt (Felix, Braendle et al. 2014). Allen beschriebenen Arten ist gemein, dass sie auf nährstoff- und bakterienreichen Substraten in unterschiedlichen Habitaten siedeln (Kiontke and Sudhaus 2006). Entgegen der geläufigen Bezeichnung in der Literatur als Bodennematoden („soil nematodes“) handelt es sich bei keiner Art um reine bodenbewohnende Organismen (einzig das sog. Dauerstadium wird gelegentlich im Erdboden gefunden) (Kiontke, Félix et al. 2011).



### 2.1.1.1 Biologie und Genetik

Die Erstbeschreibung von *C. elegans* erfolgte 1900 durch den französischen Zoologen Emile Maupas, damals noch als *Rhabditis elegans* (Maupas 1900). Es handelt sich um einen im Adultstadium 1-2 mm langen Nematoden mit kosmopolitischer, die meisten Kontinente und viele isolierte Inseln umfassender Verbreitung (Félix and Braendle 2010). Dort findet er sich auf verfaulenden Früchten, Blüten und anderem verrottenden Pflanzenmaterial, wo er sich von Bakterien und kleinen Eukaryoten ernährt.

Wie bei allen Nematoden verläuft die Entwicklung über vier Larvalstadien (L1 – L4) zum Adultus (Abbildung 2), bemerkenswert ist die kurze Generationszeit von drei Tagen bei Raumtemperatur (Corsi 2006). Neben der direkten Entwicklung ist bei ungünstigen Umweltbedingungen (z.B. Nahrungsknappheit, stark erhöhte Populationsdichte, Temperaturerhöhung) der Eintritt in das sog. Dauerstadium möglich, welches ein Überdauern der ungünstigen Bedingungen für mehrere Monate ohne Nahrungsaufnahme ermöglicht (Riddle 1988). Es handelt sich dabei um ein bewegliches, alternatives L3-Stadium, welches entsteht wenn das L1-Stadium ungünstigen Umweltbedingungen ausgesetzt ist. Die L1 entwickelt sich dabei zu einem speziellen L2-Stadium (L2d), aus dem je nach Umweltbedingungen die Dauerlarve oder eine normale L3 entstehen kann (Altun 2016). Erfährt eine Dauerlarve günstige Umweltbedingungen, entwickelt sie sich zu einer normalen L4 weiter. Allerdings erfordert die Entwicklung zur Dauerlarve ein Mindestmaß an Nahrungsaufnahme während des L1-Stadiums. Ist diese nicht möglich, kommt es bereits in diesem Stadium zu einem reversiblen Entwicklungsstopp (L1-Arrest) (Baugh 2013). Die Dauerstadien zeigen ein als „Nictation“ bezeichnetes Verhalten, bei dem sie auf ihrer Schwanzspitze stehen und mit dem Körper schaukeln. Dies dient dem Anheften an einen Transportwirt, um auf diesem Wege Habitate mit besseren Umweltbedingungen erreichen zu können (Phoresie) (Félix and Braendle 2010, Lee, Choi et al. 2012).

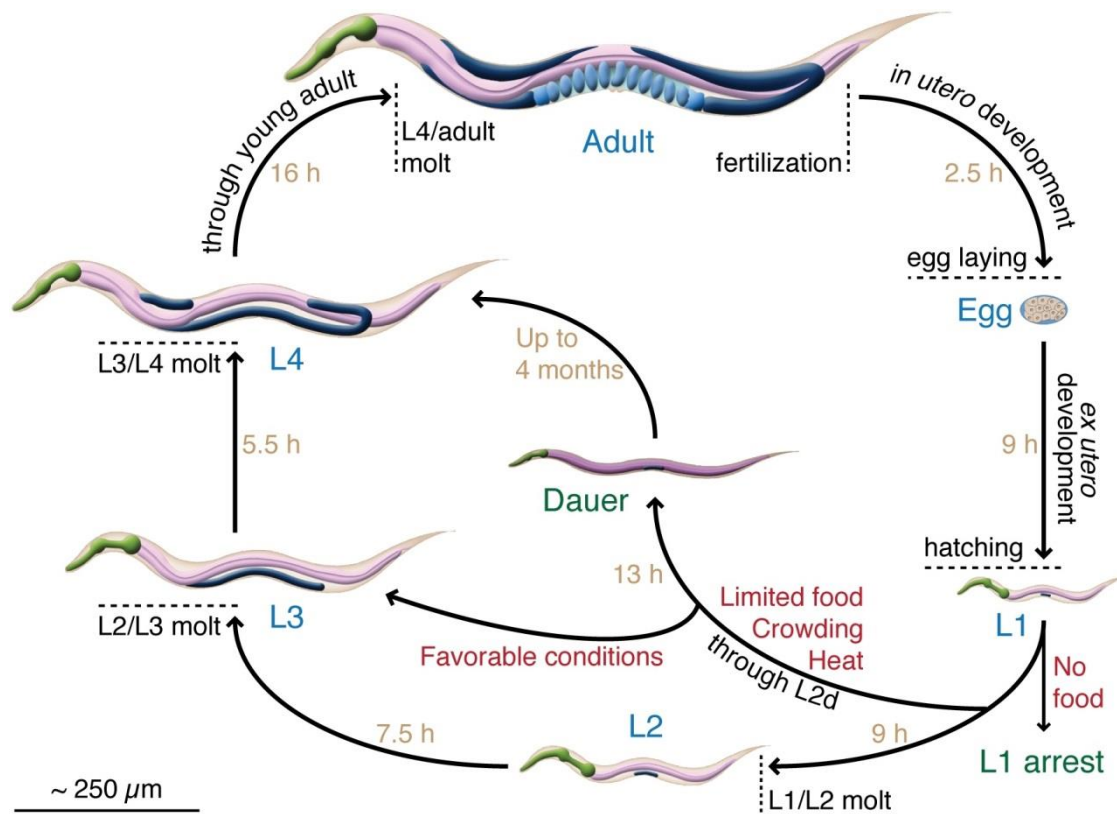


Abbildung 2: Entwicklungszyklus von *C. elegans* (Hermaphrodit) unter Berücksichtigung aller Entwicklungsmöglichkeiten (außer Männchen). Entwicklungszeiten beziehen sich auf 25 °C Temperatur. (Abbildung modifiziert aus (Cihan 2014))

Populationen von *C. elegans* setzen sich aus Hermaphroditen und Männchen zusammen (Androdiözie), wobei Männchen in einer gewöhnlichen *C. elegans* Population nur zu etwa 0,2 % vertreten sind (Hodgkin, Horvitz et al. 1979). Die Fortpflanzung geschieht daher überwiegend über die selbstbefruchtenden Hermaphroditen, alternativ ist eine Befruchtung der Hermaphroditen durch Männchen möglich. Ein selbstbefruchteter Hermaphrodit produziert in seinem Leben ca. 300 Eier, ein mit einem Männchen verpaarter ca. 1000 (Corsi 2006). Hermaphroditen und Männchen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Chromosomenausstattung: Neben den fünf Autosomenpaaren, die beiden Geschlechtern gemeinsam sind, verfügt der Hermaphrodit über zwei X-Chromosomen, das Männchen nur über ein X-Chromosom (Corsi, Wightman et al. 2015). Voraussetzung für die Entstehung von Männchen ist eine unter natürlichen Bedingungen spontan auftretende Fehlseggregation der X-Chromosomen während der Meiose (Hodgkin, Horvitz et al. 1979), dies führt zur Entstehung von Null-X-Gameten.

*C. elegans* weist Zellkonstanz (sog. Eutelie) auf, d.h. die Anzahl und Entwicklungsabfolge aller Körperzellen ist in allen Individuen der Art identisch: Hermaphroditen weisen 959 Körperzellen auf (wobei ursprünglich 1090 somatische Zellen gebildet werden, von denen 131 durch Apoptose absterben) und Männchen 1031 Körperzellen (die höhere Anzahl Zellen ist hierbei

durch die Ausbildung geschlechtsspezifischer Strukturen bedingt) (Sommer and Bumbarger 2012).

Bei *C. elegans* handelt es sich um einen diploiden Organismus. Sein Genom hat eine Größe von 100 MB und weist 20444 proteinkodierende Gene auf (Corsi, Wightman et al. 2015), die Basensubstitutionsmutationsrate ist mit  $2,7 (\pm 0,4) \times 10^{-9}$  pro Nukleotideinheit und Generation angegeben (Denver, Dolan et al. 2009). Zwei Besonderheiten zeichnen das Genom aus: die meisten proteinkodierenden mRNAs erfahren posttranskriptionale Modifikation durch „trans-splicing“ und einige Gene sind in Form von Operons organisiert (Blumenthal 2005).

### 2.1.1.2 *C. elegans* als Modellorganismus

Im Jahr 1965 erwähnte Sydney Brenner *C. elegans* als Tiermodell für die genetische, ultrastrukturelle und verhaltenswissenschaftliche Forschung zur Neuro- und Entwicklungsbiologie vielzelliger Organismen (Wood 1987). Er verwendete damals den ursprünglich in Bristol isolierten Stamm N2 (Brenner 1974), der bis heute als Wildtyp angesehen wird. Seit dieser Zeit war und ist *C. elegans* Gegenstand intensiver und vielschichtiger Forschung und ist heute einer der - wenn nicht der - am besten verstandenen Organismen. Ideal für einen Modellorganismus machen ihn die folgenden Eigenschaften (Blaxter 2011): Die einfache Kultivierung im Labor auf Agarplatten mit *Escherichia coli* als Nahrungsquelle bei Raumtemperatur. Die geringe Größe und die rasche Generationszeit, die platz- und zeitsparendes Arbeiten ermöglichen. Die Transparenz des Körpers durch alle Stadien hindurch erlaubt dabei das unkomplizierte Beobachten innerer Strukturen. Die Vermehrung ist dank der überwiegenden Selbstbefruchtung der Hermaphroditen einfach, die daraus resultierende genetische Konstanz erleichtert die stabile Aufrechterhaltung homozygoter Mutantenstämme. Trotzdem sind genetische Kreuzungen aufgrund der Existenz der Männchen möglich. *C. elegans* kann bei  $-80\text{ °C}$  cryokonserviert werden. Im Internet ist ein breites Spektrum an Informationen verfügbar und *C. elegans*-Stämme können online bestellt werden. Über die Jahre wurde ein beeindruckendes Arsenal an Methoden für Arbeit und Forschung mit *C. elegans* entwickelt (Corsi 2006).

*C. elegans* war der erste vielzellige Organismus, dessen Genom komplett sequenziert wurde (1998). Darüber hinaus wurden zahlreiche bahnbrechende Erkenntnisse durch Forschung an *C. elegans* gewonnen, beispielsweise die erste und bisher einzige komplette Beschreibung der Zellabstammung eines Metazoen, das Verständnis des kompletten Aufbaus seines Nervensystems, die Aufklärung des RNAi-Mechanismus, das Erkennen der Nutzbarkeit des „green fluorescent protein“ (GFP) als biologischer Marker sowie die Entdeckung des ersten Nematodenvirus (Corsi, Wightman et al. 2015). Online sind umfassende Ressourcen zu *C. elegans* verfügbar, neben detaillierten Informationen zur Genetik ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)), Anatomie ([www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org)) sowie der Gesamtbiologie ([www.wormbook.org](http://www.wormbook.org)) lassen sich

verschiedenste Stämme unkompliziert für Forschungszwecke über das Internet beziehen, etwa über das Caenorhabditis Genetics Center (<http://cbs.umn.edu/cgc/home>). Überwiegend handelt es sich dabei um Stämme mit definierten Mutationen, die ein zielgerichtetes Bearbeiten von wissenschaftlichen Fragestellungen ermöglichen. Natürlich ist auch die eigenständige genetische Manipulation von *C. elegans* im Labor auf verschiedenste Weisen möglich (Fay 2013).

Neben den klassischen Forschungsfeldern Genetik, Neuro- und Entwicklungsbiologie wird *C. elegans* heute in verschiedenen Forschungsbereichen verwendet, etwa als Modell für experimentelle Evolution (Gray and Cutter 2014), Alterungsforschung (Murakami 2007, Lan, Zhang et al. 2015), Radiobiologie (Sakashita, Takanami et al. 2010), Pathogenese (Silverman, Luke et al. 2009), Weltraumbiologie (Johnson and Nelson 1991), Immunologie (Marsh and May 2012), Epigenetik (Padilla, Garcia et al. 2014), regenerative Medizin (Aitlhadj and Sturzenbaum 2014) sowie Wirkstoff- (Kaletta and Hengartner 2006) und Anthelminthikaentwicklung (Burns, Luciani et al. 2015). Letzterer Punkt zeigt, dass *C. elegans* auch in der parasitologischen Forschung als Modell für parasitische Nematoden Verwendung findet. Aber obwohl die einfache, oben geschilderte experimentelle Zugänglichkeit sowie die phylogenetische Nähe zu den parasitischen Nematoden ihn als perfektes Modell erscheinen lassen möchten, gibt es doch einige Punkte zu beachten: *C. elegans* weist als freilebender Nematode eine andere Ökologie auf als parasitische Nematoden. Tier- und humanparasitische Nematoden weisen häufig komplexe Lebenszyklen auf, welche im Labor meist nur schwer bis gar nicht durchlaufen werden; hier spielt *C. elegans* deutlich seine Überlegenheit als einfach zu handhabender Organismus aus. Innerhalb der Nematoda existiert Diversität bezüglich Physiologie (Geary and Thompson 2001) und Entwicklung, so zeigen *C. elegans* und seine nächsten Verwandten eine extreme Mosaikentwicklung, die nicht allen Nematodenarten gemein ist (Blaxter 2011). Unabhängig davon wird *C. elegans* aber als gutes Modell für die Entwicklung von Breitspektrumanthelminthika angesehen, da ein solches gegen Vertreter aus allen Clades Wirkung zeigen muss (Geary and Thompson 2001). Da *C. elegans* den höchsten Grad an Sequenzübereinstimmung mit den anderen Vertretern aus Clade V zeigt, wird diskutiert, ob *C. elegans* ein besseres Modell für parasitische Nematoden dieses Clades darstellt als für die der anderen Clades (Gregory and Parkinson 2003, Britton and Murray 2006). Auf der anderen Seite gibt es auch Strukturen, die bei *C. elegans* und entfernten verwandten Arten große Ähnlichkeiten aufweisen, so etwa der Aufbau des Nervensystems sowie die beteiligten Neurotransmitter bei *C. elegans* und *Ascaris suum* (Clade III) (Holden-Dye and Walker 2014). *C. elegans* kann als Expressionssystem für parasitische Proteine genutzt werden, was genauere Untersuchungen ihrer Funktion zulässt (Britton and Murray 2006). Dieses Vorgehen konnte beispielsweise auf die Untersuchung von Ionenkanälen (Welz, Kruger et al. 2011, Miltsch, Krucken et al. 2012, Sloan, Reaves et al. 2015),

Transkriptionsfaktoren (Couthier, Smith et al. 2004), P-Glykoproteinen (Janssen, Krucken et al. 2015) oder Wachstumsfaktoren (Massey, Castelletto et al. 2005) angewendet werden. Große Erfolge in der parasitologischen Forschung konnten mit *C. elegans* bei der Aufklärung des Wirkmechanismus der ML (Martin, Robertson et al. 2002) sowie beim Verstehen von Ivermectinresistenzfaktoren (Dent, Smith et al. 2000) gemacht werden. *C. elegans* findet auch Anwendung als Modell für pflanzenparasitische Nematoden (Jones, Giorgi et al. 2011).

Die Frage, inwiefern *C. elegans* als Modell für parasitische Nematoden genutzt werden kann, ist also von der Art und Fragestellung des jeweiligen Forschungsansatzes abhängig. Interessant für die Forschung an parasitische Nematoden ist der Ansatz, für *C. elegans* etablierte Techniken auf ebendiese zu übertragen (Ward 2015).

### **2.1.2 Trichostrongyloidea als parasitische Nematoden bei Wiederkäuern**

Bei den Trichostrongyloidea handelt es sich um eine Gruppe von parasitischen Clade-V-Nematoden, von denen einige Arten als Erreger von „parasitischer Gastroenteritis“ bei Hauswiederkäuern von großer veterinärmedizinischer und wirtschaftlicher Bedeutung sind. Vom Habitus her sind dies haarfeine bis etwas dickere Würmer mit einer Länge von 5 – 30 mm und stark reduzierter Mundkapsel (Eckert, Friedhoff et al. 2005). Bei den Männchen ist eine Bursa copulatrix vorhanden und kann zur morphologischen Artbestimmung herangezogen werden. Bedeutsame Vertreter sind *Teladorsagia circumcincta*, *Cooperia curticei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *H. contortus* und andere *Haemonchus*-Arten als Parasiten von Schaf und Ziege sowie *Cooperia oncophora* und *Ostertagia ostertagi* als Parasiten beim Rind, die als Adulte artspezifisch den Labmagen oder Dünndarm ihrer Wirte besiedeln (Eckert, Friedhoff et al. 2005). Diesen Vertretern ist ein monoxener Lebenszyklus gemein: Die Eier werden mit dem Kot vom Wirt ausgeschieden, die Erstlarven (L1) schlüpfen und es findet eine Entwicklung von freilebenden Stadien bis zur infektiösen Drittlarve (L3) statt, welche wiederum vom Wirt aufgenommen wird. Im Wirt findet die weitere Entwicklung im Zielorgan bis zum Adultstadium statt. Die während dieser Lebensphase auftretende Schädigung am Wirt geht auf mit der Parasiteninfestation einhergehende Entzündungsvorgänge an Labmagen und Dünndarm zurück, was zur Störung der Magen-/Darmphysiologie mit einhergehenden Verdauungsstörungen und verminderter Futteraufnahme führt (Lucius and Loos-Frank 1997). Ein weiterer Faktor bei Infektionen mit *H. contortus* ist die blutsaugende Tätigkeit der Viertlarven und Adulten, die bei infizierten Lämmern zu lebensbedrohlicher Anämie führen kann (Lucius and Loos-Frank 1997).

Mischinfektionen mit verschiedenen Arten in einem Wirt sind häufig, zur Bekämpfung stehen Medikamente verschiedener Wirkstoffklassen zur Verfügung (Holden-Dye and Walker 2014). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die einzelnen Arten auch unabhängig von möglichen Resistenzen unterschiedliche Empfindlichkeit gegen Breitspektrumswirkstoffe

zeigen. So spricht man bei einigen Arten auch von Dosis-limitierenden Arten (Shoop, Mrozik et al. 1995). Aufgrund ihrer großen veterinärmedizinischen Bedeutung waren und sind Trichostrongyloidea und insbesondere *H. contortus* Gegenstand intensiver Forschung und Bekämpfungsmaßnahmen. Im Rahmen der letzteren führte insbesondere der hochfrequente Einsatz von Anthelminthika weltweit zur Ausbildung von verschiedenen Wirkstoffresistenzen (Kaplan 2004), welche dann wiederum in den Fokus der Forschung rückten.

Mit den großen Fortschritten, die in letzter Zeit auf dem Gebiet der Komplettssequenzierung von Nematodengenomen erzielt wurden, sind auch die Genomsequenzen von *H. contortus* verfügbar geworden (Laing, Kikuchi et al. 2013, Schwarz, Korhonen et al. 2013). An der Sequenzierung der Genome von *C. oncophora*, *O. ostertagi* und *T. circumcincta* wird aktuell gearbeitet, Informationen zum Stand der jeweiligen Projekte sind auf der Website <http://nematode.net> zu finden (Martin, Rosa et al. 2015). Informationen zu abgeschlossenen Genomsequenzierungen sind der Website <http://parasite.wormbase.org> zu entnehmen (Howe, Bolt et al. 2016).

## 2.2 Makrozyklische Laktone

### 2.2.1 Übersicht

Bei den ML handelt es sich um eine Wirkstofffamilie mit breitem Anwendungsspektrum gegen Ecdysozoa (Geary and Moreno 2012). Allen Vertretern der ML ist eine starke Lipophilie gemein (Hennessy and Alvinerie 2002). Besondere Bedeutung kommt ihnen dabei wegen ihrer Wirksamkeit gegen endoparasitische Nematoden und ektoparasitische Arthropoden zu, aber auch in der Bekämpfung von Pflanzenschädlingen finden sie Verwendung (Geary and Moreno 2012). Chemisch charakterisiert ist diese Familie durch das Vorhandensein eines 16-gliedrigen Makrolids mit einer 6,6-spiroketalen sowie einer Hexahydrobenzofuran-Gruppe (Sun, Zhao et al. 2013). Es handelt sich in der Grundform um mikrobielle Sekundärmetaboliten von Vertretern des Taxons *Streptomyces*, Gram-positiven, bodenbewohnenden Bakterien (Ikeda, Ishikawa et al. 2003), wobei auch semisynthetische Varianten existieren. Allen ML ist gemein, dass sie mit Liganden-gesteuerten Chloridkanälen im Nervensystem ihrer Zielorganismen interagieren (Pitterna 2008), für detaillierte Informationen sei auf 2.2.2 verwiesen. Innerhalb der ML existieren verschiedene Formen, die sich in ihrer chemischen Struktur sowie ihren pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden. Die Einteilung mit Blick auf die chemische Struktur unterscheidet die Gruppe der Avermectine – charakterisiert durch das Vorhandensein einer Disaccharid-Gruppe an der C13-Position sowie eines sekundären Butyl- oder Isopropyl-Substituenten an der C25-Position – und die Gruppe der Milbemycine, welche an der C13-Position protoniert sind und an der C25-Position eine Ethyl- oder Methyl-Gruppe aufweisen (Lespine 2013).

### 2.2.1.1 Avermectine, mit besonderem Augenmerk auf Ivermectin

Bei den Avermectinen handelt es sich um das natürliche Fermentationsprodukte von *Streptomyces avermitilis* sowie semi-synthetische Derivate davon, an deren Biosynthese auch ein CYP beteiligt zu sein scheint (Yoon, Kim et al. 2004). Im Jahr 1976 wurden die ersten acht Avermectine isoliert, bei denen es sich um vier Paar homologe Strukturen handelte: Jedes Paar bestand dabei aus einer mehrheitlich (a-Komponente) und einer geringfügig gebildeten Komponente (b-Komponente), häufig im Verhältnis zwischen 80:20 und 90:10 (Pitterna 2008). Von diesen vier Paaren erwies sich eines (Avermectin B<sub>1</sub>, bzw. das Gemisch aus B<sub>1a</sub> und B<sub>1b</sub>) als wirksam gegen Nematoden, Insekten und Milben und wurde fortan unter dem Namen Abamectin vermarktet (Campbell, Burg et al. 1984). Ausgehend von Abamectin wurden chemische Modifikationen durchgeführt, die zur Entdeckung weiterer Avermectine wie Emamectin, Ivermectin (IVM), Eprinomectin oder Doramectin führten (Pitterna 2008), für eine detaillierte Beschreibung der Synthesewege sei auf (Awasthi, Razzak et al. (2012)) verwiesen. Bei IVM handelt es sich um ein semi-synthetisches Avermectin, das 1981 als Wirkstoff für die Tiermedizin auf den Markt kam (Crump and Omura 2011). Aus chemischer Sicht stellt IVM das 22,23-Dihydro-Derivat des Avermectin B<sub>1</sub> (Abamectin) da (Campbell, Fisher et al. 1983), die beiden Komponenten unterscheiden sich dabei wie folgt: die zu  $\geq 80\%$  gebildete B<sub>1a</sub>-Komponente trägt an der C25-Position eine Isopropyl-Gruppe, die zu  $\leq 20\%$  gebildete B<sub>1b</sub>-Komponente eine sekundäre Butyl-Gruppe (Campbell 1993).

IVM wurde und wird vorrangig in der Tiermedizin eingesetzt, zwei Jahre nach seiner Einführung erreichte es die Marktführung unter den Breitbandantiparasitika und erzielte Umsätze im Bereich von 1 Milliarde US-Dollar pro Jahr; fünf Jahre nach seiner Einführung war es in 46 Ländern als Medikament zugelassen (Omura and Crump 2004). Aber auch in der Humanmedizin findet IVM Anwendung und war u. a. für die Ausrottung der durch Filarien verursachten Flußblindheit (Onchozerkose) in Mexiko und Ecuador, bzw. die Eindämmung dieser Krankheit in vielen Teilen Afrikas sowie Mittel- und Südamerikas verantwortlich (Campbell 2015). Aber auch gegen andere humanpathogene Parasiten wie gastrointestinale Nematoden, Krätzmilben, Läuse oder Myiasis-Erreger wird IVM eingesetzt (Crump and Omura 2011).

Der Nobelpreis im Fachbereich Physiologie oder Medizin im Jahr 2015 wurde u.a. für die Entdeckung der Avermectine vergeben (Callaway and Cyranoski 2015).

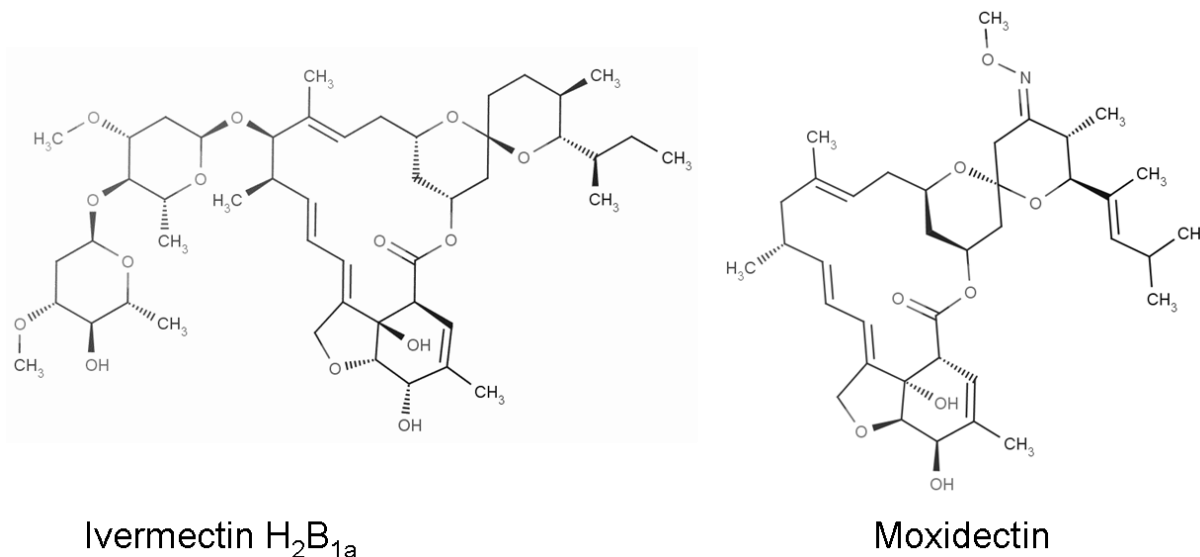


Abbildung 3: Strukturformel von IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> und MOX

### 2.2.1.2 Milbemycine, mit besonderem Augenmerk auf Moxidectin

Die Milbemycine wurden erstmals 1974 unter den Fermentationsprodukten von *Streptomyces hygroscopicus subsp. aureolacrimosus* gefunden (Pitterna 2008). Während der Wildtypstamm u.a. 13 Milbemycine mit bekannter insektizider und acarizider Wirkung produziert, gibt es noch weitere, von mutierten Stämmen produzierte Milbemycine (Takiguchi, Ono et al. 1983). Aber auch andere Streptomycceten produzieren Milbemycine und es wurden weitere antiparasitisch wirksame ML in *Streptomyces cyaneogrisus sp. noncyanogenus* gefunden (Carter, Nietsche et al. 1988). Eines dieser Milbemycine – F-28249 $\alpha$  – wurde unter dem Namen Nemadectin als Antiparasitikum auf den Markt gebracht (Ahmed, Fiala et al. 1993). Bei Moxidectin (MOX) handelt es sich um das daraus entwickelte semi-synthetische 23-Methoxim-Derivat (Awasthi, Razzak et al. 2013). Als erstes MOX-haltiges Produkt erlebte 1989 in Argentinien eine Injektionsrezeptur für Rinder seine Markteinführung (Cobb and Boeckh 2009). Es folgten weltweit weitere Produkte in verschiedenen Formulierungen zur Bekämpfung von Endo- und Ektoparasiten bei Rindern, Schafen, Ziegen, Hirschen, Pferden, Schweinen, Hunden und Katzen (Prichard, Ménez et al. 2012). Für den Einsatz von MOX in der Humanmedizin erfolgten bislang Phase-I-und-II-Studien für die potentielle Anwendung im Rahmen der Behandlung der Flußblindheit (Onchozerkose) (Mounsey and McCarthy 2013, Awadzi, Opoku et al. 2014).

### 2.2.2 Wirkmechanismus

ML binden spezifisch an Vertreter der sog. Cys-Loop ligandengesteuerten Ionenkanäle (CLGIC) im Nervensystem ihrer Zielorganismen (Williamson, Walsh et al. 2007). Diesen Kanälen ist gemein, dass die Bindung des natürlichen Liganden an den extrazellulären Teil des Kanals zu einer Konformationsänderung führt, durch welche die Kanäle geöffnet werden und die Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten die Membran passiv überqueren können (Wolstenholme 2011). Die ML binden allosterisch an die Kanäle und bewirken das



eben beschriebene Öffnen. Für Glutamat-gesteuerte-Chloridkanäle (GluCl), der Hauptzielstruktur der ML, konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um einen langanhaltenden, nahezu irreversiblen Effekt handelt (McCavera, Rogers et al. 2009), der zu einer Hyperpolarisation der Zelle führt (Lespine, Menez et al. 2012). Allerdings ist zumindest für IVM bekannt, dass dessen Bindestelle dabei nicht an der für Neurotransmitter klassischen Position an der extrazellulären Domäne liegt, sondern im Transmembranbereich des GluCl (Hibbs and Gouaux 2011): die Bindung des IVM verursacht Konformationsänderungen in der Transmembrandomäne sowie im Gesamtprotein und bewirkt eine Umordnung der Agonistenbindestelle um  $\sim 30 \text{ \AA}$  sowie die Öffnung des Ionenkanals.

In Nematoden führt dieser Vorgang zu drei Folgeerscheinungen: einer rasch erfolgenden, schlaffen Paralyse der Fortbewegung und der pharyngealen Pumpbewegung sowie einer lang anhaltenden Reproduktionsverminderung (Shoop and Soll 2002, Wolstenholme and Rogers 2005). Die Hemmung des Pharynx bewirkt dabei eine Störung der Nahrungsaufnahme bis hin zum Hungertod und die Paralyse der Fortbewegung führt bei vielen Nematoden zu einer Ausscheidung aus dem Wirt.

Neben den GluCls, denen als Hauptziel der ML eine besondere Bedeutung zukommt, finden auch Interaktionen mit GABA<sub>A</sub>- und Glycin-Rezeptoren von Nematoden und Säugern statt, darüber hinaus mit  $\alpha 7$ -nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren und P2X<sub>4</sub>-Rezeptoren (McCavera, Walsh et al. 2007). Mit der Ausnahme der P2X<sub>4</sub>-Rezeptoren gehören all diese Rezeptoren zur Gruppe der CLGIC ((Jones and Sattelle 2008), [www.cys-loop.org](http://www.cys-loop.org) (abgerufen am 09.12.2015; 15:22 Uhr)). Charakteristisch für die CLGIC ist ein Aufbau aus fünf homologen Untereinheiten, welche um den zentralen Ionenkanal angeordnet sind (Sine and Engel 2006). Das Cys-Loop-Motiv befindet sich im extrazellulären N-terminalen Bereich einer jeden Untereinheit und besteht aus zwei, eine Disulfidbrücke bildenden Cysteinen, welche durch 13 oftmals hochkonservierte Aminosäuren getrennt sind und zusammen den namensgebenden „Cys-Loop“ bilden (Jones and Sattelle 2008). Die „Cys-Loops“ spielen eine Rolle bei der Assemblierung des Kanals sowie bei dessen „gating“-Mechanismus.

Die Wirksamkeit verschiedener ML im Parasiten ist vom Zielorganismus und Ziel-CLGIC abhängig, darüber hinaus spielt die Art/Physiologie der Wirtsorganismen eine Rolle: IVM und MOX unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit gegen *C. elegans* (Ardelli, Stitt et al. 2009), *H. contortus* (Paiement, Leger et al. 1999) sowie ihrer Toxizität für *Anopheles gambiae* (Butters, Kobylinski et al. 2012). Elektrophysiologische Untersuchungen mit IVM und MOX an verschiedenen Liganden-gesteuerten-Ionenkanälen zeigten, dass die Frage, welches ML potenter sei, nicht pauschal beantwortet werden kann sondern rezeptorabhängig ist (Prichard, Ménez et al. 2012). Pharmakokinetisch zeichnen sich ML durch ihr langes Verbleiben im Wirtsorganismus aus, wobei MOX allgemein höhere „area under the curve“-Werte (AUC-Wert:

gibt Auskunft über die Aufnahme und damit Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes), ein größeres Verteilungsvolumen und eine längere Halbwertszeit als IVM aufweist (Lespine 2013). Des Weiteren gibt es wirtsartsspezifische Unterschiede, so ist die Halbwertszeit der Ausscheidung von IVM und MOX in Schafen höher als in Ziegen (Hennessy and Alvinerie 2002). Untersuchungen zur Bedeutung des Körperfettanteils in Schweinen und Hunden auf die Kinetik der ML zeigte höhere Auswirkung für MOX als für IVM (Lespine 2013). Für vertiefende Informationen sei auf (McKellar and Gokbulut 2012) verwiesen.

In *Schistosoma mansoni* wurden unlängst GluCl<sub>s</sub> gefunden, die sich allerdings als unempfindlich gegenüber IVM erwiesen und einem anderen Subtyp als den IVM-empfindlichen GluCl<sub>s</sub> der Nematoden und Arthropoden (GluCl<sub>α</sub>) zugerechnet werden (Dufour, Beech et al. 2013).

Interessanterweise zeigt IVM antivirale Aktivität gegen HIV-1 und das Dengue Virus in humanen Zelllinien (wobei der Wirkmechanismus hierbei auf Inhibition von Kerntransportproteinen beruht) (Wagstaff, Sivakumaran et al. 2012). Des Weiteren zeigen IVM, MOX und Selamectin bakterizide Wirkung gegen auch antibiotikaresistente Stämme von *Mycobacterium tuberculosis* (Lim, Vilcheze et al. 2013).

### **2.2.3 Biotransformation**

ML erfahren sowohl im Wirtsorganismus als auch im Nematoden wenig metabolische Modifikation, der Großteil wird vom Wirt unverändert über Kot und ggf. über Milch ausgeschieden, Urin als Ausscheidungsweg spielt dabei nur eine untergeordnete (Lespine, Dupuy et al. 2009). Für IVM konnte bei Rindern gezeigt werden, dass bei subkutaner Verabreichung innerhalb von sieben Tagen nach der Behandlung  $62 \pm 9,7$  % über Kot und  $1,51 \pm 0,1$  % über Urin ausgeschieden wurden, bei intraruminaler Verabreichung wurden  $79,7 \pm 4,8$  % über Kot und  $0,46 \pm 0,1$  % über Urin ausgeschieden (Chiu, Green et al. 1990). Bei Ratten zeigte sich ein ähnliches Bild, hier wurden  $83 - 91,7$  % IVM über den Kot und  $0,3 - 0,4$  % über den Urin ausgeschieden. Der Anteil der unmetabolisierten Form am Gesamtivermectinanteil im Kot von Rindern betrug  $39 - 45$  % bei subkutaner Verabreichung, beim Schaf mit intraruminaler Verabreichung waren es  $61 - 69$  % (Steel 1993). An anderer Stelle werden für das Rind die Anteile der metabolisierten Fraktionen für IVM mit  $8$  % und für MOX mit  $13$  % angegeben (Prichard, Ménez et al. 2012). Für MOX konnte im Pferd gezeigt werden, dass  $77$  % von oral verabreichten Dosen unverändert mit dem Kot ausgeschieden wurden (Cobb and Boeckh 2009), eine andere Studie hat gezeigt, dass im Pferd MOX zu  $44,3 \pm 18,0$  % und IVM zu  $74,3 \pm 20,2$  % unverändert über den Kot ausgeschieden werden (Perez, Cabezas et al. 2001). IVM und MOX unterscheiden sich aufgrund der höheren Lipophilität von MOX in ihrer Pharmakokinetik; für weiterführende Information sei auf (Lespine, Dupuy et al. 2009, McKellar and Gokbulut 2012, Prichard, Ménez et al. 2012) verwiesen.

Nichtsdestotrotz findet eine Biotransformation der ML statt, vor allem in den Säugetierwirtsorganismen. Am Metabolismus von IVM und MOX sind vorrangig Vertreter der Cytochrome P450 Enzymfamilie beteiligt, im Schaf konnte für IVM auch die Beteiligung von Enzymen der Phase-II-Biotransformation gezeigt werden (Dupuy, Escudero et al. 2001, Vokřál, Jedličková et al. 2013). Es folgt eine Auflistung der bekannten Metabolite sortiert nach Wirkstoff; die Metabolite wurden in verschiedenen Geweben des Tieres und/oder dessen Ausscheidungsprodukten und/oder durch *in vitro* Untersuchungen mit Lebermikrosomen nachgewiesen:

**IVM:** 4-Hydroxymethyl-IVM\_H2B1a (Mensch) , 24-Hydroxymethyl-IVM\_H2B1a (Rind, Schaf, Ratte, Mensch), 26-Hydroxymethyl-IVM\_H2B1a (Ratte, Mensch), 4,26-Dihydroxymethyl-IVM\_H2B1a (Mensch), Monosaccharid von 24-Hydroxymethyl-IVM\_H2B1a (Rind, Schaf, Ratte), Monosaccharid von 26-Hydroxymethyl-IVM\_H2B1a (Mensch), 3“-O-Desmethyl-IVM\_H2B1a (Schwein, Ratte, Mensch), 3“-O-Desmethyl-4-Hydroxymethyl-IVM\_H2B1a (Mensch), 3“-O-Desmethyl-26-Hydroxymethyl-IVM\_H2B1a (Mensch), 24-Hydroxymethyl-IVM\_H2B1b (Rind, Ratte), 3“-O-Desmethyl-IVM\_H2B1b (Schwein) (Lee Chiu, Taub et al. 1987, Zeng, Andrew et al. 1996, Zeng, Andrew et al. 1998). Des Weiteren sind nonpolare Metabolite aus dem Fettgewebe von Rindern, Schafen und Ratten bekannt, dabei soll es sich um Fettsäureveresterungen der 24-Hydroxymethyl-Metabolite handeln (Danaher, Howells et al. 2006). Im Schaf konnte mit dem Nachweis von sulfatiertem und glucuronidiertem IVM die Existenz von Biotransformation-Phase-II-Metaboliten gezeigt werden (Vokřál, Jedličková et al. 2013).

**Abamectin:** 24-Hydroxymethyl-B1a (Ratte, Ziege), 26-Hydroxymethyl-B1a (Ratte), 3“-O-Desmethyl-B1a (Ratte, Ziege) (Maynard, Wislocki et al. 1989, Zeng, Andrew et al. 1996). Die Bohnen spinmilbe *Tetranychus urticae* metabolisiert Abamectin zu einem Hydroxymethylmetaboliten, bei dem es sich wahrscheinlich entweder um die 24- oder die 26-Hydroxymethylvariante handelt (Riga, Tsakireli et al. 2014).

**Doramectin:** 3“-O-Desmethyl-Doramectin (Rind, Schwein), 24-Hydroxymethyl-Doramectin (Rind), 24-Hydroxymethyl-3“-O-Desmethyl-Doramectin (Rind) (Danaher, Howells et al. 2006)

**MOX:** Für das Rind sind verschiedene Monohydroxy- und Dihydroxymetabolite sowie ein Monohydroxy-Demethylmetabolit bekannt (Zulalian, Stout et al. 1994). Im Schaf sind verschiedene Monohydroxy- und Dihydroxymetabolite beschrieben, des Weiteren ein Keto- und ein Keto-Monohydroxymetabolit sowie ein Monohydroxy-Demethylmetabolit (Afzal, Stout et al. 1994, Stout, Dacunha et al. 1994). Im Pferd wurden verschiedene Monohydroxy- und Dihydroxymetabolite gefunden (Afzal, Burke et al. 1997). Für die Ratte sind verschiedene Monohydroxymetabolite sowie ein Monohydroxy-Demethyl- und ein Ketometabolit

beschrieben (Stout, Dacunha et al. 1994). Für *H. contortus* konnte ein nicht näher spezifizierter Moxidectinmetabolit nachgewiesen werden (Alvinerie, Dupuy et al. 2001).

Die Elimination der ML durch Metabolismus spielt nur eine kleine Rolle im Vergleich zu der Elimination der nicht-metabolisierten ML über Efflux-Transporter (Prichard, Ménez et al. 2012):

Der Transport von ML aus der Zelle wird von Membran-Efflux-Pumpen der ABC-Transporter-Familie durchgeführt, hauptsächlich von P-Glykoproteinen (Pgp, MDR1/ABCB1) oder Breast Cancer Resistance Proteinen (BCRP, ABCG2) (Lespine 2013). Diese Transmembranproteine spielen eine wichtige Rolle in der Detoxifikation, indem sie eine Vielzahl von chemisch unterschiedlichen Xenobiotika aktiv über die Membran aus der Zelle transportieren; sie bilden eine Permeabilitätsbarriere (Lespine, Dupuy et al. 2009). Durch diese Eigenschaft haben sie großen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Medikamenten und können für Wirkstoffresistenzen verantwortlich sein. Nematoden verfügen über eine breites Spektrum an ABC-Transportern (Lespine, Menez et al. 2012) und es konnte gezeigt werden, dass ML von Nematoden-Pggs transportiert werden (Godoy, Che et al. 2015, Godoy, Lian et al. 2015, Kaschny, Demeler et al. 2015).

#### **2.2.4 Resistenzsituation**

Wirkstoffresistenzen bei parasitischen Krankheitserregern sind von großer Bedeutung für die Veterinär- und Humanmedizin; sei es auf Ebene der Individualgesundheit der betroffenen Wirte oder der ggf. daraus resultierenden wirtschaftlichen Konsequenzen. Anthelminthikaresistenz bei Nematoden ist von großer ökonomischer Bedeutung, Untersuchungen an Schafen ergaben, dass die Behandlung mit einem Wirkstoff, gegen den auf Seite der Nematoden Resistenz gegeben war, zu einem Verlust von 9 kg Lebendgewicht pro Tier, respektive 10,4 % Verlust an Schlachtkörperwert führte (Miller, Waghorn et al. 2012). Eine andere Untersuchung zeigte, dass eine misslungene Behandlung resistenter *C. oncophora* zu einem Unterschied und Verlust von 14 kg Lebendgewicht pro Tier bei einjährigen Fleischrindern führen kann (Sutherland and Leathwick 2011).

Die ersten Resistenzen gegen IVM und MOX bei Nematoden wurden jeweils wenige Jahre nach der Markteinführung der Wirkstoffe beschrieben: Im Jahr 1988 wurde das erste IVM-resistente Feldisolat von *H. contortus* in Südafrika beschrieben (van Wyk and Malan 1988), 1996 ein u.a. gegen MOX resistentes *Ostertagia*-Isolat (Watson, Hosking et al. 1996). In der Veterinärmedizin wird dann von Anthelminthikaresistenz bei gastrointestinalen Nematoden gesprochen, wenn die Behandlung mit dem Wirkstoff die Wurmbürde der untersuchten Wirte um < 95 % vermindert (Coles, Jackson et al. 2006). Resistenzen gegen ML sind weltweit für parasitische Nematoden von Ziegen, Schafen, Rindern und Pferden beschrieben (Kaplan 2004, Jabbar, Iqbal et al. 2006, Prichard, Ménez et al. 2012, Wolstenholme and Kaplan 2012).

Bei Hund und Katze sind ML-Resistenz für den Herzwurm *Dirofilaria immitis* beschrieben (Wolstenholme and Rogers 2005). In der Humanmedizin sind IVM-resistente Isolate von *Onchocerca volvulus* in Ghana bekannt (Osei-Atweneboana, Awadzi et al. 2011). Außer für Nematoden sind ML-Resistenzen auch für andere Parasiten beschrieben, etwa gegen IVM bei Zecken (Rodríguez-Vivas, Pérez-Cogollo et al. 2014) und Krätzmilben (Currie, Harumal et al. 2004) sowie gegen Abamectin bei verschiedenen Pflanzenschädlingen, u.a. der Kohlmotte *Plutella xylostella* und der Bohnenspinmilbe *Tetranychus urticae* (Pu, Yang et al. 2010, Khajehali, Van Nieuwenhuysse et al. 2011).

Resistenz gegen IVM muss nicht unbedingt eine Kreuzresistenz gegen MOX bewirken. MOX konnte sich bei seiner Markteinführung als wirksam gegen IVM-resistente Nematodenpopulationen erweisen und wird auch Jahrzehnte danach zum Teil noch erfolgreich eingesetzt (Craig, Hatfield et al. 1992, Leathwick, Moen et al. 2000). Allerdings sind auch Fälle bekannt, bei denen MOX keinen Effekt gegen IVM-resistente Nematoden zeigte (Sargison, Jackson et al. 2005). Während frühere Arbeiten annahmen, dass die Resistenzen gegen Avermectine und gegen MOX mechanistisch identischer Natur seien, so herrscht inzwischen das Bild von Unterschiedlichkeit, auch wenn hohe Ähnlichkeit zwischen beiden Resistenzen besteht (Prichard, Ménez et al. 2012, Wolstenholme and Kaplan 2012). Da MOX häufig erfolgreich gegen IVM-resistente Nematodenpopulationen eingesetzt werden kann, wird hypothesiert, dass MOX-Resistenz eine höhere Anzahl an Faktoren benötigt als die Resistenz gegen IVM (Kaplan, Vidyashankar et al. 2007). Ein Experiment, in dem ein suszeptibles Isolat von *H. contortus* sowohl mit IVM als auch MOX über 22 Generationen im Schaf selektiert wurde, kam zu dem Ergebnis, dass Resistenz gegen IVM deutlich schneller eintritt als gegen MOX (Ranjan, Wang et al. 2002). Aufschluss oder zumindest eine Annäherung daran soll eine Betrachtung des aktuellen Wissensstandes über ML-Resistenzmechanismen bringen:

### **2.2.5 Resistenzmechanismen**

Für die Entstehung von Wirkstoffresistenz gibt es nach Wolstenholme, Fairweather et al. (2004) vier Entstehungsmöglichkeiten: a) eine Änderung im Zielmolekül des Wirkstoffes, so dass dieser das Ziel nicht mehr erkennen kann. b) eine Änderung in der Verteilung des Wirkstoffes im Zielorganismus, die das Erreichen seines Wirkortes verhindert. c) eine Änderung im Metabolismus, die zu einer Inaktivierung/Nicht-Aktivierung des Wirkstoffes führt. d) eine Amplifikation von Zielgenen, um den Wirkstoffeffekt zu verwässern.

Für die Resistenz gegen ML bei parasitischen Nematoden scheint nach aktuellem Wissen nicht einer dieser Wege allein, sondern mehrere zusammen verantwortlich zu sein; die Resistenz wäre dann polygener Natur (Wolstenholme and Kaplan 2012).

Änderungen an den Zielstrukturen der ML, den CLGIC (2.2.2) wurden und werden als möglicher Resistenzmechanismus nach Entstehungsweg a) diskutiert. In *C. elegans* kann hochgradige IVM-Resistenz durch simultane Mutation in drei für CluCI-Untereinheiten kodierende Gene erzielt werden (Dent, Smith et al. 2000), daneben ist eine natürlich vorkommende, vier Aminosäuren umfassende Deletion in der Liganden-bindenden Domäne der alpha-Untereinheit eines CluCI bekannt, die Resistenz gegen Abamectin bewirkt (Ghosh, Andersen et al. 2012). In *C. onchophora* wurde eine mit IVM-Resistenz assoziierte SNP-bedingte Veränderung an der GluCI-Untereinheit AVR-14B beschrieben (Njue and Prichard 2004), bei *H. contortus* führt eine gleichartige Veränderung an der homologen GluCI-Untereinheit ebenfalls zu einem Verlust von Suszeptibilität für IVM (McCavera, Rogers et al. 2009). Die für *C. onchophora* beschriebene Veränderung in AVR-14B findet sich in nur einer einzigen Nematodenpopulation weltweit (Prichard, Ménez et al. 2012) und Untersuchungen an der AVR-14B von *T. circumcincta* bescheinigten ihr eine wenn nur untergeordnete Rolle in der Resistenz gegen IVM bei diesem Parasiten (Martinez-Valladares, Geldhof et al. 2012). Andere Autoren bezeichnen die Erklärung der ML-Resistenz mit einer Änderung des Wirkstoffzielmoleküls als verfrüht, da weder ein stimmiges Bild über die Selektion von mit Resistenz assoziierten Rezeptoruntereinheiten existiert noch eine große Bandbreite an Genen in einer repräsentativen Gruppe von Nematodenspezies untersucht wurde: Nematoden unterscheiden sich untereinander stark in ihrem Spektrum an CLGIC und ML interagieren unterschiedlich mit den verschiedenen Rezeptoren in verschiedenen Spezies (Wolstenholme and Kaplan 2012).

Für die Entstehung von ML-Resistenz durch veränderte Verteilung des Wirkstoffes im Zielorganismus (Weg b)) gibt es dagegen deutlichere Hinweise: In *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von P-Glykoproteinen (2.2.3) zu einer Zunahme der Suszeptibilität gegenüber IVM führt (Ardelli and Prichard 2013), durch die Verwendung von verschiedenen Stämmen mit „pgp-loss-of-function“-Mutationen konnte darüber hinaus der unterschiedliche Einfluss verschiedener Pgps auf den Grad der IVM-Suszeptibilität nachgewiesen werden (Janssen, Krucken et al. 2013). In verschiedenen parasitischen Nematoden konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Inhibierung von Pgps zu einer Erhöhung der Suszeptibilität gegenüber IVM, bzw. der Wiederherstellung von Suszeptibilität bei resistenten Isolaten führt (Bartley, McAllister et al. 2009, AIGusbi, Krucken et al. 2014). Erhöhte Expression von Pgps konnte in ML-resistenten Populationen verschiedener parasitischer Nematodenspezies nachgewiesen werden, des Weiteren ist für verschiedene parasitische Nematoden bekannt, dass SNPs in Pgp-Genen mit ML-Resistenz korrelieren (AIGusbi, Krucken et al. 2014).

Hinsichtlich der Frage der Unterschiedlichkeit von Resistenz gegen IVM und MOX zeigten Untersuchungen am Pgp-16 von *H. contortus* Unterschiede in der Interaktion von IVM und MOX mit diesem Pgp, was von den Autoren als eine mögliche Erklärung für die schnellere Entwicklung von Resistenz gegen Avermectine im Vergleich zur MOX-Resistenz gewertet wurde (Godoy, Che et al. 2015). In *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass die von einer Behandlung mit IVM oder MOX induzierten Pgp-Expressionserhöhungen für beide Wirkstoffe ein ähnliches Profil aufweisen, einige Pgps allerdings von nur einem der beiden ML induziert wurden (Bygarski, Prichard et al. 2014).

Die Möglichkeit der Entstehung von ML-Resistenz in Nematoden durch eine Änderung im Metabolismus mit der Folge von Wirkstoffinaktivierung/-nichtaktivierung wird diskutiert. Während dieser Weg bei der ML-Resistenz von Insekten und Arachniden von Bedeutung ist (Wolstenholme and Kaplan 2012), sind Informationen über die Situation bei Nematoden rar. AlGusbi et al. konnten zeigen, dass sich durch Verwendung des generellen CYP-Inhibitors Piperonylbutoxid die Sensibilität von IVM-empfindlichen sowie IVM-resistenten *C. oncophora* Stämmen und IVM-empfindlichen *O. ostertagi* Stämmen gegenüber IVM steigern ließ (AlGusbi, Krucken et al. 2014).

## **2.3 P450 Cytochrome**

Bei den P450 Cytochromen (CYPs) handelt es sich um eine ubiquitär vorkommende Proteinfamilie. Ihre Vertreter finden sich in allen Eukaryoten sowie einigen Prokaryoten und Archaeen (Peterson and Graham 1998), auch zwei viral kodierte CYPs sind bekannt (Lamb, Lei et al. 2009). Eine Übersicht über Nomenklatur und Sequenzinformationen der bekannten CYP-Gene findet sich auf <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html> (Nelson 2009).

### **2.3.1 Struktur und Funktion**

CYPs sind Häm-haltige Enzyme (Häm-Thiolat-Proteine) (Nelson, Koymans et al. 1996), die am oxidativen Metabolismus vieler xeno- und endobiotischer Moleküle beteiligt sind (Estabrook 2003). Die Abkürzung P450 setzt sich zusammen aus dem Buchstaben „P“ für „Pigment“ und der Größenangabe der für sie typischen Soret-Bande - im reduzierten Zustand komplexiert mit Kohlenstoffmonoxid - von 450 nm im optischen Spektrum (Omura and Sato 1962). Charakteristisch für CYPs ist die prosthetische Häm-Gruppe (Protoporphyrin IX), die über die Thiolgruppe des Cysteins im CXG-Motiv (s.u.) mit dem Protein verbunden ist (Groves 2005).

CYPs weisen untereinander eine geringe Sequenzhomologie von 10 – 30 % auf (Hasemann, Kurumbail et al. 1995), absolut konserviert sind lediglich drei Aminosäuren (Peterson and Graham 1998) (hiervon existieren Ausnahmen, s.u.). Für die Unterteilung der CYPs wird klassischerweise ihre Primärstruktur herangezogen, Familien begründen sich durch eine

mindestens 40%ige Sequenzidentität, Unterfamilien durch eine 55%ige (das CYP-14A5 beispielsweise gehört damit zur Familie 14, der Unterfamilie 14A und ist das fünfte Protein der Gruppe). Allerdings unterliegt dieses System Ausnahmen und Weiterentwicklungen (Nelson 1998, Nelson 2006). Im Gegensatz zu ihrer oft geringen Sequenzhomologie zeigen CYPs Konservierung in Bezug auf ihre Molekültopographie und Faltung (Werck-Reichhart and Feyereisen 2000). Diese konservierten Module der CYPs sind dabei verantwortlich für Struktur und Funktion, die variablen Bereiche für die jeweils individuellen biochemischen und zellbiologischen Eigenschaften (Sirim, Widmann et al. 2010). Die konservierten Strukturen bestehen aus den Alpha-Helices  $\alpha$ A-L und den Beta-Faltblättern  $\beta$ 1-4/5 (Anzahl variabel gemäß (Peterson and Graham 1998)), welche in allen CYPs gefunden werden können (Abbildung 4) (Sirim, Widmann et al. 2010). In der Literatur wird streckenweise von zwei Protein-Domänen gesprochen (Graham and Peterson 1999): Eine überwiegend aus Beta-Faltblättern bestehende und meistens der Substraterkennung dienende Domäne und eine überwiegend aus Alpha-Helices bestehende und meistens das katalytische Zentrum bildende Domäne. Der höchste Grad an struktureller Konservierung ist rund um das Häm-bindende Zentrum zu finden, dies spiegelt einen allen CYPs gemeinsamen Elektronen- sowie Protonentransfer als auch Sauerstoffaktivierung wider (Werck-Reichhart and Feyereisen 2000). Das Häm-bindende Zentrum selbst besteht aus einer Superhelix (gebildet aus den vier Alpha-Helices  $\alpha$ D,  $\alpha$ E,  $\alpha$ I und  $\alpha$ L), den Alpha-Helices  $\alpha$ J und  $\alpha$ K, zwei Beta-Faltblattstrukturen sowie der sog. „Meander“-Region (Werck-Reichhart and Feyereisen 2000). Im Häm-bindenden Zentrum finden sich auch die drei absolut konservierten Aminosäuren wieder, es handelt sich dabei um die Glutaminsäure und das Arginin des sog. ExxR-Motives in der K-Helix (beteiligt an Stabilisierung des Zentrums und der Häm-Bindung) sowie das Häm bindende Cystein im sog. CXG-Motiv (Syed and Mashele 2014), letzteres ist direkt vor der  $\alpha$ L lokalisiert (Poulos and Johnson 2005). Allerdings existieren doch Ausnahmen: die CYP-408-Familie weist das eigentlich absolut konservierte Cystein nicht auf (dafür aber das ExxR-Motiv sowie ausreichende Sequenzidentität, um als CYP klassifiziert zu werden) und im CYP-157C1 ist das ExxR-Motiv durch ein EQSLW-Motiv ersetzt (Lamb and Waterman 2013).



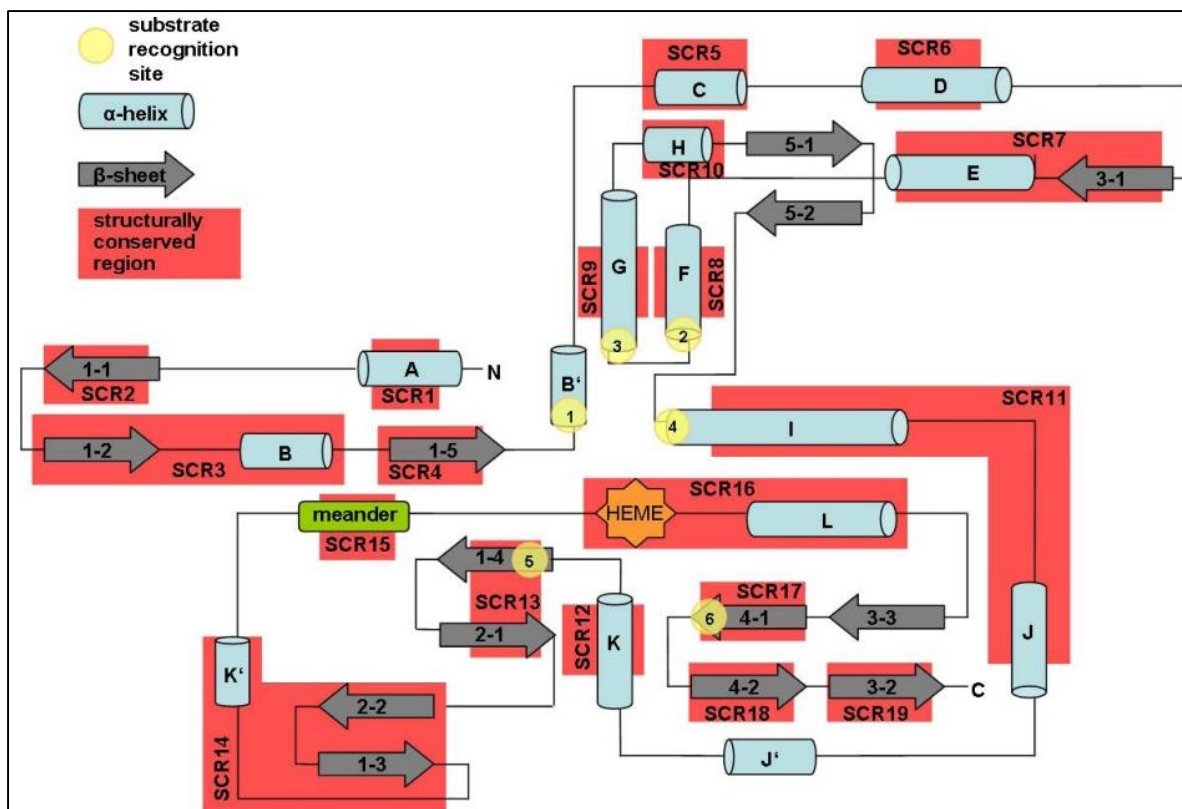
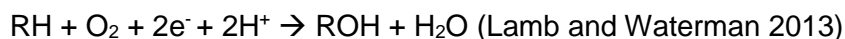


Abbildung 4: Aufbau eines typischen CYP-Proteins (aus (Sirim, Widmann et al. 2010))

CYPs sind Oxidoreduktasen, die molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) an ihrem Eisen-Zentrum aktivieren und ein Sauerstoffatom in ihr biologisches Substrat integrieren, das andere Sauerstoffatom wird zu einem Molekül  $H_2O$  transformiert (Groves 2005). Die allgemeine Formel dieser Monooxygenierung lautet:



Die von CYPs durchgeführten Grundreaktionen umfassen C-Hydroxylierung, Heteroatomoxygenierung, oxidative Dealkylierung, Epoxidierung sowie Gruppenumlagerung (Guengerich 2008), des Weiteren existiert eine Vielzahl ungewöhnlicher Reaktionen (Guengerich and Munro 2013, Lamb and Waterman 2013). Die für die Reaktion notwendigen zwei Elektronen werden dabei meistens von einem Redoxpartner zur Verfügung gestellt. Je nach Beschaffenheit der Redoxpartner können CYPs in verschiedene Gruppen klassifiziert werden, wobei bis zu zehn verschiedene Klassen unterschieden werden (Hannemann, Bichet et al. 2007). An dieser Stelle soll nur die gängige Unterteilung in zwei Klassen dargestellt werden ((Sirim, Widmann et al. 2010); zusätzliche Informationen sind (Hannemann, Bichet et al. 2007) entnommen) :

Klasse I: bakterielle und mitochondriale CYPs, Redoxsystem besteht aus FAD-haltiger Reduktase und einem Eisen-Schwefel-Protein (Ferredoxin). In Bakterien sind alle drei

Bestandteile löslich; im Falle der mitochondrialen CYPs nur das Ferredoxin, die Reduktase und das CYP sind membranassoziiert und an die innere Mitochondrienmembran gebunden.

Klasse II: eukaryotische, membrangebundene CYPs: alleiniger Redoxpartner ist eine ebenfalls membrangebundene NADPH-haltige CYP-Reduktase (CPR) mit prosthetischen FAD- und FMN-Gruppen.

Bei allen CYPs – ob löslich oder membrangebunden - liegt das katalytische Zentrum tief innerhalb des Proteinkomplexes, um die Reaktionsintermediärprodukte vor ungekoppelten Reaktionen zu schützen, d.h. Substratmoleküle können dieses nur nach erfolgter Konformationsänderung erreichen/verlassen (Denisov, Shih et al. 2012). Darüber hinaus weisen lösliche und membrangebundene CYPs aber eine Reihe von strukturellen Unterschieden auf, etwa in Form und Ausrichtung der Substratbindetasche oder dem Vorhandensein einer einzelnen N-terminalen Transmembranhelix zum Zwecke der Membranverankerung im Falle der membrangebundenen CYPs (Denisov, Shih et al. 2012).

CYPs haben ein breites Spektrum an Substraten und sind sowohl an anabolen als auch katabolen Reaktionen (F. Peter Guengerich 2008,) sowie dem Metabolismus von xenobiotischen Stoffen beteiligt (Guengerich 2006). Die Fähigkeit von CYPs eine Anzahl an bekannten Substraten zu metabolisieren reicht von einem bis zu mehr als zwanzig Substraten pro CYP; bekannt sind auch überlappende Substratspezifitäten, in diesem Fall kann ein Substrat von verschiedenen CYPs umgesetzt werden (Rendic and Di Carlo 1997). Einige CYPs produzieren nur eine Art von Metabolit aus einem gegebenen Substrat, andere CYPs dagegen können verschiedene Metabolite aus dem Substrat generieren (Scott 1999). Es ist bekannt, dass bereits der Austausch einer Aminosäure in einem CYP zu einer Änderung der Substratspezifität führen kann (Lindberg and Negishi 1989).

CYPs erfüllen eine Vielzahl an biologischen Aufgaben, hier seien einige Beispiele genannt:

In Bakterien lassen sich die Funktion der CYP vermittelten Reaktionen in zwei Kategorien unterteilen, der biodegradativen Transformation von ungewöhnlichen Kohlenstoffquellen zur Energie- und Kohlenstoffgewinnung (nutzbar für Bioremediation) sowie den biosynthetischen Reaktionen zur Produktion komplexer primärer und sekundärer Metabolite wie beispielsweise Antibiotika (z.B. Aminocumarine oder Vancomycin) (Cryle, Stok et al. 2003).

In Pflanzen sind CYPs u.a. an der Biosynthese von sekundären Pflanzenstoffen wie cyanogenen Glycoiden, Glucosinolaten, Isoflavonoiden, Terpenoiden, Phenylpropanoide und Alkanoiden beteiligt, darüber hinaus aber auch an der Detoxifikation von schädlichen Substanzen wie Herbiziden (Nielsen and Møller 2005, Hamberger and Bak 2013).

Tierische CYPs sind beteiligt an der Synthese von Steroidhormonen, Cholesterol und Fettsäuren sowie der Metabolisierung letzterer. Des Weiteren sind sie am Metabolismus xenobiotischer Substanzen beteiligt: Sie haben eine große Bedeutung für die olfaktorische Wahrnehmung terrestrischer Tiere (Maibeche-Coisne, Merlin et al. 2005) und spielen eine bedeutenden Rolle in Detoxifikationsvorgängen (Omura 1999).

### **2.3.1.1 P450 Cytochrome als Bestandteil der Biotransformationskaskade**

Allgemein gesprochen erfolgen im Rahmen der Biotransformation Reaktionen in der Zelle, die dazu führen, dass wasserunlösliche, niedermolekulare Verbindungen in eine für den Organismus ausscheidbare Form gebracht werden (Christen and Jaussi 2004). Bei diesen Verbindungen kann es sich um Endo- und Xenobiotika handeln. Ein besonderes Augenmerk soll hier auf dem Metabolismus xenobiotischer Substanzen liegen. Der Organismus verfügt dabei über keine stoffspezifischen Reaktionen, sondern um unspezifische Mechanismen. Ziel dieser Verkettung von Mechanismen ist das Ausschleusen von häufig apolaren xenobiotischen Substanzen aus der Zelle und nachfolgend aus dem Organismus. Beim Metabolismus von Xenobiotika lassen sich drei Phasen unterscheiden (Omiecinski, Vanden Heuvel et al. 2011). In der ersten Phase werden reaktionsträge, unpolare Verbindungen durch das Einbringen funktioneller Gruppen polarer und damit der zweiten Phase zugänglich gemacht, in der sie mit polaren, negativ geladenen Molekülen gekoppelt und damit ausscheidbar werden (Christen and Jaussi 2004). Es ist allerdings auch bekannt, dass Phase II Modifikationen ohne vorausgegangene Phase I Reaktionen erfolgen können (Lindblom and Dodd 2006). Der Transport der modifizierten Xenobiotika geschieht im Rahmen der dritten Phase und beinhaltet das Ausschleusen aus der Zelle mit Hilfe membrangebundener Proteine über die Zellmembran hinweg (Cvilink, Lamka et al. 2009) und eine anschließende Ausscheidung aus dem Organismus. Allerdings können wohl auch nicht modifizierte Xenobiotika oder Intermediärmetabolite derart ausgeschleust werden (Awasthi, Awasthi et al. 1997).

Die CYPs sind Bestandteil der ersten Phase, in welcher sie eine prominente Rolle einnehmen: Beim Menschen machen CYPs mit einem Anteil von ungefähr 80% die größte Gruppe unter den an der Phase I beteiligten Enzymen aus (bezogen auf die Biotransformation von Medikamenten in Leberzellen (Guengerich 2003)). Unter den dabei beteiligten CYPs ist allein das CYP-3A4 für die Oxidation von ungefähr 66% aller bekannten Medikamente verantwortlich (Ortiz de Montellano 2013). CYPs können im Rahmen der Biotransformation von Xenobiotika für verschiedenen Szenarien verantwortlich sein (Guengerich 2001): In jedem Falle führt der CYP-bedingte Metabolismus zu einer Abnahme der Bioverfügbarkeit der Ausgangssubstanz, was positive oder negative Folgen für den Organismus haben kann. Falls das Xenobiotikum eine toxische Wirkung auf den Organismus hat, kann diese durch die CYP-bedingte Umwandlung des Xenobiotikums in ein weniger toxisches Metabolit gemindert werden.

Allerdings kann ein Xenobiotikum auch erst durch die CYP-bedingte Umwandlung in eine aktive Form gebracht werden, was in der Bildung von toxischen Metaboliten oder – wie im Falle von Prodrugs - auch in der Formierung von dem Organismus dienlichen Metaboliten enden kann (Ortiz de Montellano 2013). CYPs können von einigen Substanzen auch suizidinhibiert werden, d.h. ein Substrat wird irreversibel gebunden, was mit einem funktionalen Ausfall des betroffenen CYP-Proteins einhergeht (Ortiz de Montellano and Correia 1983). Spezifische CYP-Suizidinhibitoren können zum Erbringen des Nachweises von CYP-vermittelten Reaktionen benutzt werden.

Die Expression von vielen CYPs (respektive ihrer Gene) ist durch Xenobiotika induzierbar; es sind Substanzen bekannt, die durch ihre Verfügbarkeit im Organismus die Expression des sie metabolisierenden CYP-Systems induzieren (Walker 1998).

### **2.3.2 P450 Cytochrome in *C. elegans***

Für die Anzahl der CYPs in *C. elegans* werden in der Literatur verschiedene Angaben gemacht: 75 (Kulas, Schmidt et al. 2008), 77 (plus fünf Pseudogene) (Aarnio, Lehtonen et al. 2011), 80 (Laing, Bartley et al. 2015), 82 (Ma, Rothe et al. 2013), 83 (Benenati, Penkov et al. 2009), 86 (darunter acht Pseudogene) (Lindblom and Dodd 2006). Die NADPH-abhängige CYP-Reduktase (CPR) ist membrangebunden und wird von nur einem Gen (*emb-8*) kodiert (Schuler and Sligar 2007). Im Wurm finden sich CYPs im Darmbereich (Menzel, Bogaert et al. 2001), allerdings auch im Pharynx (Kosel, Wild et al. 2011) und in Oocyten (Kubagawa, Watts et al. 2006). CYPs in *C. elegans* erfüllen neben der detoxifizierenden eine Vielzahl endogener Funktionen: CYP-29A3 und CYP-33E2 sind an der Synthese von Eikosanoiden (endogenen Signalmolekülen) beteiligt (Kulas, Schmidt et al. 2008). CYP-31A2 und CYP-31A3 sowie die CPR sind für die Synthese von für die Embryoentwicklung essentiellen Lipiden nötig, da diese für die Ausbildung einer intakten Eischale notwendig sind, welche wiederum unabdingbar für die Meiose und die spätere Embryopolarität ist (Benenati, Penkov et al. 2009). Daneben spielt das CYP-31A2 bzw. die von ihm modifizierten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren eine Rolle in der Kontrolle der Bewegungsrichtung von Spermien durch Oozyten (Kubagawa, Watts et al. 2006). Das CYP-22A1 (auch bekannt als DAF-9) führt den letzten Schritt der DAF-12-Liganden-Synthese aus; bei DAF-12 handelt es sich um einen Kernrezeptor, der je nach Ligandenbindung Einfluss auf die Entwicklung der L1 hat: In Abwesenheit des Liganden Dafachronsäure erfolgt der Eintritt in das Dauerstadium, in Anwesenheit die Entwicklung zum fortpflanzungsfähigen Adulten (Gerisch 2008). Das CYP-13A12 metabolisiert mehrfach ungesättigte C<sub>20</sub>-Fettsäuren zu Signalmolekülen, die die Bewegung von *C. elegans* regulieren (Keller, Ellieva et al. 2014). Die CYP-35A-Familie spielt eine bedeutende Rolle bei der Fettspeicherung (Menzel, Yeo et al. 2007) sowie der Regulation von Fettstoffwechsel und Signalmolekülen (Aarnio, Lehtonen et al. 2011).

Neben diesen endogenen Funktionen sind die CYPs von *C. elegans* auch am Metabolismus xenobiotischer Substanzen beteiligt bzw. erfahren durch die Xenobiotikapräsenz eine Induktion ihrer Expression: Nicht genauer definierte CYPs sind für die Umwandlung des Promutagens Aflatoxin B<sub>1</sub> in den genotoxischen, DNA-bindenden Epoxy-Metaboliten verantwortlich (Leung, Goldstone et al. 2010). CYP-14A3, CYP-14A5 und CYP-34A6 sind beteiligt an der Hydroxylierung des polychlorierten Biphenyls PCB52 (Schafer, Muller et al. 2009). CYP-35D1 katalysiert die Bildung des Hydroxymetabolits des Anthelminthikums Thiabendazol (Jones, Flemming et al. 2015).

Mehr als über die von CYPs gebildeten Metabolite in *C. elegans* ist über Xenobiotika bekannt, deren Präsenz die Expression von CYPs induziert. Hier eine Auswahl: Die Inkubation des N2-Bristol-Wildtyps mit 0,2 M Ethanol vom Embryonal- bis zum L4-Stadium führte zu einer signifikanten Hochregulation der Genexpression von zwölf CYPs (Peltonen, Aarnio et al. 2013). *Cyp-35C1*, *cyp-35A5* und *cyp-35A2* erfuhren eine signifikante Hochregulation nach vierstündiger Inkubation mit dem Anthelminthikum Albendazol (verschiedene Konzentrationen; nachgewiesen für den *C. elegans*-Stamm CB3474) (Laing, Ivens et al. 2010). Eine Inkubation des N2-Bristol-Wildtyps mit dem Anthelminthikum Aldicarb (16 mg/l) vom Embryonal- bis zum Adultstadium führte zu einer signifikanten Hochregulation der Genexpression von *cyp-33C5*, *cyp-32B1*, *cyp-14A4* (Wren, Kille et al. 2011).

Allerdings kann die CYP-Expression in *C. elegans* in Reaktion auf ein Xenobiotikum auch herunterreguliert werden, dies wurde z.B. für Lithium gezeigt (Inokuchi, Yamamoto et al. 2015). Die CYP-Transkriptionsantwort kann auch gemischt ausfallen, so führte die Inkubation des N2-Bristol-Wildtyps mit Acrylamid (500 mg/l) vom L1- bis L4-Stadium zur Hochregulation des *cyp-13A12* und zur Herunterregulation von *cyp-13A5*, *cyp-13A7*, *cyp-13B1* und *cyp-37B1* (Hasegawa, Miwa et al. 2008).

Die genannten Beispiele lassen erkennen, dass die Regulation der CYP-Expression in *C. elegans* stark abhängig von dem angebotenen Xenobiotikum ist.

### **2.3.3 P450 Cytochrome in parasitischen Nematoden**

Die Existenz von CYPs in Nematoden wurde anfänglich aufgrund der nicht nachweisbaren Metabolisierung von CYP-Modells substraten (Barrett 1998) und des nicht erbrachten spektrophotometrischen Nachweises von CYPs (Douch 1976, Precious and Barrett 1989) als fraglich eingestuft. Es konnten außerdem keine Hinweise gefunden werden, dass Helminthen Anthelminthika durch oxidative Mechanismen detoxifizieren (Barrett 1998). Mit der Entdeckung von CYPs in *C. elegans* – möglich gemacht durch Fortschritte in der Genomanalyse – gerieten CYPs in Nematoden wieder in den Fokus der Forschung (Cvilink, Lamka et al. 2009). Zuvor gelang in Larvalstadien von *Heligmosomoides polygyrus* der erste Nachweis von oxidativem

Metabolismus von Aminopyrin, einem bekannten CYP-Substrat (Kerboeuf, Soubieux et al. 1995). Außerdem konnte CYP-Aktivität und damit -Existenz in Mikrosomenpräparationen von *H. contortus* nachgewiesen werden (Kotze 1997). Die Aktivität gegenüber den bekannten CYP-Substraten Aldrin und 7-Ethoxycoumarin war dabei am stärksten ausgeprägt in L1 und L3-Stadien, in Adulten wurde nur eine geringe Aktivität gegenüber Aldrin nachgewiesen. In einer weiteren Studie wurden ein ML-suszeptibles und ein ML-resistentes *H. contortus*-Isolat hinsichtlich der CYP-Aktivität gegenüber den beiden Substraten verglichen: Während Mikrosomenpräparationen von Larven und Adulten der beiden Isolate jeweils keinen Aktivitätsunterschied zeigten, zeigten intakte Adulte des suszeptiblen Stammes erhöhte Aktivität gegenüber Aldrin im Vergleich zum resistenten Stamm (Kotze 2000).

Heute sind CYPs in einigen parasitischen Nematoden beschrieben: Für den Kiefernholz-nematoden *Bursaphelenchus xylophilus* konnten insgesamt 76 CYPs gefunden werden (Kikuchi, Cotton et al. 2011), für drei von diesen konnte eine Rolle u.a. in Reproduktion, Pathogenität und Pestizidmetabolismus nachgewiesen werden (Xu, Wu et al. 2015). Die Anzahl an CYPs für den Nördlichen Wurzelgallennematoden *Meloidogyne hapla* ist mit zwölf notiert, die für *Meloidogyne incognita* mit 27 (Kikuchi, Cotton et al. 2011). Für *H. contortus* wurden 42 CYPs beschrieben (Laing, Kikuchi et al. 2013), wobei in einer späteren Veröffentlichung mit nur 21 CYPs gearbeitet wurde (Laing, Bartley et al. 2015). Im Genom von *Loa loa* wurden fünf, in dem von *Wuchereria bancrofti* 13 und in dem von *Brugia malayi* fünf CYP-Domänen gefunden (Desjardins, Cerqueira et al. 2013).

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz des allgemeinen CYP-Inhibitors Piperonylbutoxid in Bioassays, in denen die Empfindlichkeit von parasitischen Nematoden gegenüber Anthelminthika analysiert wurde, Auswirkungen auf die Empfindlichkeit der Würmer hatte: Dies liefert Hinweise auf die Existenz von CYPs in *T. circumcincta* (Sargison, Jackson et al. 2010), *T. colubriformis* (Kotze, Dobson et al. 2006) sowie *C. oncophora* und *O. ostertagi* (AlGusbi, Krucken et al. 2014).

Durch den andauernden Fortschritt in der Sequenzierung ganzer Genome parasitischer Nematoden sind bereits für eine Vielzahl weiterer Organismen Informationen zu deren CYPs bekannt. Da diese bisher häufig nicht explizit in Publikationen beschrieben wurden, sei für den Zugriff auf die entsprechenden Datenbanken auf Websites wie <http://www.wormbase.org> (Howe, Bolt et al. 2016) oder <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> verwiesen.

#### **2.3.4 P450 Cytochrome in anderen parasitischen Organismen**

Bedingt durch das ubiquitäre Vorkommen von CYPs finden sie sich auch in Parasiten jenseits der Gruppe Nematoda:

Für *Plasmodium falciparum* wurde die Existenz von CYPs nachgewiesen; es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die CYP-Aktivität in Chloroquin-resistenten Stämmen signifikant höher ist als in empfindlichen Stämmen (Ndifor, Ward et al. 1990). In *Trypanosoma cruzi* sind CYPs nicht nur an der Synthese von Sterolen beteiligt (De Vas, Portal et al. 2011), sondern sollen auch eine Rolle bei Wirkstoffresistenzen spielen, da gezeigt werden konnte, dass eine experimentelle Überexpression zur Steigerung der Resistenzen gegenüber den Wirkstoffen Nifurtimox und Benznidazol führte (Portal, Fernandez Villamil et al. 2008). Die Existenz von CYPs ist auch für andere Trypanosomatida wie *Trypanosoma brucei* oder *Leishmania donovani* nachgewiesen (Berger and Fairlamb 1993).

Bei Vertretern aus der Gruppe der Plathelminthes ist die Existenz von CYPs ebenfalls belegt: Für den Katzenleberegel *Opisthorchis felineus* konnte ein einziges CYP identifiziert werden, dessen Expression im Adult- signifikant höher als im Metacercarien-Stadium war (Pakharukova, Ershov et al. 2012). CYP-Aktivitäten wurden auch in *Schistosoma mansoni* nachgewiesen (Saeed, Mostafa et al. 2002). Eine Untersuchung der Genomsequenzen von vier verschiedenen Bandwurm-Arten (Cestoda) zeigte das Vorhandensein von jeweils nur einem CYP (Tsai, Zarowiecki et al. 2013).

Im Gegensatz zu dem eher spärlichen CYP Repertoire der Plathelminthes findet sich innerhalb der Insecta eine größere Bandbreite:

Der Überträger des Dengue-Virus – *Aedes aegypti* – verfügt über 160 CYPs (Strode, Wondji et al. 2008), von denen einigen eine chemoprotektive Rolle zugesprochen wird (Poupardin, Riaz et al. 2010). In *Anopheles gambiae* wurden 105 CYPs gefunden (Strode, Wondji et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass in einem DDT-resistenten Stamm die Expression von fünf CYPs im Vergleich zu einem empfindlichen Stamm mehr als eineinhalbfach hochreguliert war, die von vier anderen CYPs allerdings auch mehr als eineinhalbfach herunterreguliert (Chiu, Wen et al. 2008). In drei Pyrethroid-resistenten Populationen wurde die signifikante Hochregulation für zwei weitere CYPs nachgewiesen (Djouaka, Bakare et al. 2008). Im Transkriptom der Bettwanze *Cimex lectularius* wurden ungefähr 60 CYP-Domänen gefunden (Bai, Mamidala et al. 2011) und für ein CYP konnte eine höhere Expression in einem pestizidbehandelten Stamm im Vergleich mit einem empfindlichen Kontrollstamm gezeigt werden.

Auch innerhalb der Gruppe der Acarina ist das Vorkommen von CYPs belegt, so sind für die Rinderzecke *Boophilus microplus* zwei CYPs bekannt (He, Chen et al. 2002). Die Bohnenspinnmilbe *Tetranychus urticae* verfügt über 86 CYPs, zu denen nicht nur gezeigt werden konnte, dass einige in u.a. Abamectin-resistenten Stämmen überexprimiert wurden (Dermauw, Wybouw et al. 2013), sondern auch, dass ein Vertreter, das CYP-392A16, in der

Lage ist, das ML Abamectin zu einem weniger toxischen Hydroxymetaboliten abzubauen (Riga, Tsakireli et al. 2014).

### **2.3.5 *in silico* Modellierung von CYP-vermitteltem Xenobiotikametabolismus**

Bei der Entwicklung neuer Medikamente spielt das Wissen über das Verhalten der Wirkstoffkandidaten in Bezug auf den körpereigenen Enzymapparat eine bedeutende Rolle. Um die zeit-, kosten- und arbeitsintensive sowie häufig den Einsatz von Versuchstieren beinhaltende *in vitro* Labormethodik, die traditionell zur Gewinnung dieses Wissens genutzt wird, zu unterstützen und eventuell eines Tages zu ersetzen, wurden und werden *in silico* Verfahren entwickelt (Afzelius, Arnby et al. 2007, Raunio, Kuusisto et al. 2015). Da CYPs eine prominente Rolle im Metabolismus xenobiotischer Substanzen spielen, sind Methoden zur Vorhersage des Ablaufes der durch sie vermittelten Reaktionen von großem Interesse. Kirchmair, Williamson et al. (2012) formulieren für diesen Ansatz drei Herangehensweisen: 1) Die Vorhersage der möglichen Metabolisierungsposition(en) im gegebenen Substratmolekül – der sog. site(s) of metabolism (SOM) – an der CYP-vermittelte Reaktionen ansetzen können. 2) Die Aufklärung möglicher, aus dem Substrat abgeleiteter Metabolite. 3) Die Vorhersage von direkten und indirekten Effekten der Substrate/Metabolite auf die sie metabolisierenden Enzyme (inhibierend/induzierend).

Auf die Vielfalt der entwickelten Modelle und Programme soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden, hierzu sei auf (Kirchmair, Williamson et al. 2012, Andrade, Silva et al. 2014, Raunio, Kuusisto et al. 2015) verwiesen. Es soll nur gesagt werden, dass sich die *in silico* Methoden grundlegend in zwei Großgruppen unterteilen lassen: den auf physikbasierten- und den auf empirischen Modellen beruhenden Verfahren (Raunio, Kuusisto et al. 2015): Während die physikbasierten Modelle auf Methoden wie der „Störung der freien Energie (FEP)“ und quantenchemischen Berechnungen beruhen, basieren die empirischen Modelle auf bekannten Versuchsdaten. Aktuelle *in silico* Methoden für die Evaluierung von CYP-Liganden-Interaktionen kombinieren häufig beide Ansätze.

Auch wenn *in silico* Methoden traditionelle *in vitro* Labormethodik noch nicht ersetzen können, so liefern so doch wichtige Einblicke und sind fester Bestandteil vieler Wirkstoffentwicklungsprojekte in der pharmazeutischen Industrie (Raunio, Kuusisto et al. 2015).

## **2.4 Detektion von makrozyklischen Laktone in biologischen Matrices**

Der Nachweis von Wirkstoffrückständen sowie -metaboliten kann von zweierlei Interesse getrieben sein: Einmal zur Aufklärung von Pharmakokinetik und besonders Biotransformation des jeweiligen Wirkstoffes und zum anderen der Feststellung von Wirkstoffrückständen in verschiedenen biologischen Matrices, um eventuell daraus resultierende Folgeerscheinungen



und Risiken bewerten zu können. Für beide Ansätze ist eine sensitive, aber zugleich robuste und relativ einfach sowie zeiteffizient durchzuführende Methodik unabdingbar.

#### **2.4.1 Nachweismethoden**

Für den Nachweis von ML in den unterschiedlichen Matrices besteht eine Vielzahl von Methoden: Die gebräuchlichsten Nachweisverfahren stellen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit fluorometrischer Detektion (FLD) (hierfür ist eine der Messung vorausgehende Derivatisierung der ML mit fluorometrisch inaktiven Reagenzien zur Erstellung von fluorometrisch aktiven Verbindungen nötig) sowie Methoden, die Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) verbinden, da; letztere Methodik ist der HPLC-FLD in Hinsicht auf Sensitivität, Kosten und Störanfälligkeit allerdings noch unterlegen (Galarini, Saluti et al. 2013). Auf der anderen Seite wird der LC-MS/MS eine höhere Zuverlässigkeit in Bezug auf ML-Bestätigung bescheinigt (in einer Studie erbrachte HPLC-FLD unstimmig-falsche Ergebnisse) (Danaher, Radeck et al. 2012). Andere Ansätze beruhen auf Dünnschichtchromatographie, immunochemischen Methoden wie ELISA-Verfahren, (Hochleistungs)Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einfacher Massenspektrometrie ((HP)LC/MS) oder UV-Detektion (Danaher, Howells et al. 2006). In Laborversuchen kann auch mit radioaktiv markierten Wirkstoffen gearbeitet werden, neben der Detektion von Metaboliten (Lee Chiu, Taub et al. 1987, Chiu, Green et al. 1990) können so auch Verteilung und Bindestellen der ML im Zielorganismus untersucht werden (Phipps, Martin-Short et al. 2005).

Aktuelle Nachweismethoden sind in der Lage, verschiedene ML simultan zu detektieren: Galarini et al. entwickelten beispielsweise eine HPLC-FLD-Methode, die sechs unterschiedliche ML (darunter IVM und MOX) in als Lebensmitteln verwendeten tierischen Matrices (Leber, Muskelfleisch, Milch) und Tierfutter zuverlässig simultan nachweisen kann (Galarini, Saluti et al. 2013). Auf Seiten der LC-MS/MS existiert zum Beispiel ein Verfahren für die gleichzeitige Detektion von neun verschiedenen ML im Muskelgewebe verschiedener Lebensmittel liefernder Nutztiere (He, Zhao et al. 2008).

#### **2.4.2 Metabolite makrozyklischer Laktone in Nematoden**

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Versuche unternommen, ML-Metabolite bei Nematoden nachzuweisen. Alvinerie et al. konnten radiochromatographisch einen nicht näher definierten MOX-Metaboliten im Homogenisat von *H. contortus* nachweisen, nachdem sie das Wurmhomogenisat nach Zugabe eines NADPH-generierenden chemischen Systems bei 37 – 38 °C für 24 h unter Schütteln mit 5 µg [<sup>14</sup>C]markiertem MOX inkubieren ließen (Alvinerie, Dupuy et al. 2001). Die Versuche, IVM-Metabolite in Nematoden nachzuweisen, waren bisher von keinem Erfolg gekrönt. Laing inkubierte sowohl L3-Mikrosomenpräparationen und intakte, entscheidete L3 von *H. contortus* als auch Mikrosomenpräparationen, Wurmhomogenisat und

intakte Vertreter von *C. elegans* mit verschiedenen Konzentrationen von IVM, konnte in den anschließenden HPLC-MS-Analysen jedoch in keinem Ansatz Metabolite finden (Laing 2010). Vokral et al. inkubierten sowohl Mikrosomenpräparationen von adulten *H. contortus* (diese mit 100 µM IVM bei 37 °C für 30 min) als auch intakte Adulte (diese mit 1 µM IVM für 24 h) mit IVM, konnten in der anschließenden Ultra-HPLC/MS/MS-Analyse ebenfalls keine Metabolite finden (Vokřál, Jedličková et al. 2013).

Für einige andere Anthelminthikaklassen konnten Wirkstoffmetabolite in Nematoden nachgewiesen werden, so für Benzimidazole (Cvilink, Kubicek et al. 2008, Vokřál, Jirásko et al. 2013) und Amino-Acetonitril Derivate (Stuchlíková, Jirásko et al. 2014).

### **2.4.3 „Targeted Metabolomics“ und „Non-Targeted Metabolomics“**

Unter dem Begriff „Metabolomics“ versteht man ein Konzept in der Bioanalytik, welches das Ziel verfolgt, die Gesamtheit aller in einem biologischen System, ggf. zu einem spezifischen physiologischen Zustand, vorhandenen niedermolekularen Verbindungen (Molekulargewicht < 1500 Da) zu quantifizieren (Griffiths, Koal et al. 2010). Dabei wird zwischen „Targeted -“ und „Non-Targeted Metabolomics“ unterschieden (Griffiths, Koal et al. 2010): Bei der „Targeted“-Strategie wird die zu untersuchende biologische Probe auf bereits bekannte Metabolite untersucht (hierbei wird auf das Wissen vorausgegangener Experimente zurückgegriffen; die Metabolit-spezifischen Detektionssignale sind definiert). Der „Non-Targeted“-Ansatz dagegen detektiert alle im Probenextrakt vorhandenen Analyte (bekannte und unbekannt) und ermöglicht so umfassende *de-novo*-Analysen. Dabei sind (im Falle einer LC-MS/MS-Analyse) von den tausenden identifizierten Ionen typischerweise nur ein kleiner Prozentsatz von relevantem, biologischem Interesse (Benton, Ivanisevic et al. 2015). Bedingt durch die große Masse an Informationen, die bei „Non-Targeted“-Ansätze generiert wird, bedürfen diese Informationen einer intensiven computergestützten Auswertung, um die Masse an Rohdaten in analysierbare Form zu bringen und mit bestehenden Datenbankinformationen abzugleichen (Sugimoto, Kawakami et al. 2012). Des Weiteren kann es nötig sein, möglicherweise existente Metabolite *in silico* zu modellieren oder zumindest Vermutungen über ihre Struktur und Beschaffenheit anzustellen und später im generierten Datensatz nach diesen zu suchen; hierzu existiert eine Bandbreite von Softwaretools (Kirchmair, Williamson et al. 2012, Peach, Zakharov et al. 2012). Im Bereich der Parasitologie konnten mit Hilfe von „Non-Targeted Metabolomic“-Ansätzen beispielsweise Zielstrukturen für Antiprotozoika gefunden und Wirkmechanismen bekannter Antiprotozoika aufgeklärt werden (Creek and Barrett 2014).

### 3 Material & Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

###### Agarosegelapparatur

Gießstand	BIORAD, München, Deutschland
Gelschlitten	k.A.
Gelkämme	k.A.

###### Arbeitsschutz

Autoklav Laboklav	SHP STERILTECHNIK AG, Magdeburg, Deutschland
Einweg-3M-Atemschutzmaske	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Handschuhe duoSHIELD™ PFH Nitrile 240	SHIELD SCIENTIFIC, Bennekom, Niederlande
Handschuhe Rotiprotect-Latex	ROTH, Karlsruhe, Deutschland

###### Brutschrank/Kühlschüttler

Schüttelschrank MAXQ 4000	THERMO SCIENTIFIC, Bonn, Deutschland
Wärmeschüttelschrank MAXQ 6000	THERMO SCIENTIFIC, Bonn, Deutschland

###### DNA-Extraktionsgeräte

Maxwell 16	PROMEGA, Madison, Wisconsin, USA
------------	----------------------------------

###### Elektrophoreseapparatur

Gelelektrophoresekammer Mini Sub Cell GT	BIORAD, München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer Wide Mini Sub Cell GT	BIORAD, München, Deutschland

###### Geldokumentation

Geldokumentation G:Box	SYNGENE, Cambridge, Großbritannien
Digital Graphic Printer UP-D897	SONY, Berlin, Deutschland

###### Glaswaren

DURAN® Laborflasche 0,1 l; 0,5 l; 1 l	DURAN Group GmbH, Mainz, Deutschland
Messkolben 1 l; 2 l; 5 l	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Messzylinder 1 l	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Objektträger ELKA	GLASWARENFABRIK KARL HECHT GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland

Vials für die Massenspektrometrie k.A.

Heizblock und Wasserbad

Schüttelheizblock Tmix ANALYTIK JENA, Jena, Deutschland  
 Wasserbad WNE 45 MEMMERT, Büchenbach, Deutschland

Mikroskope und Zubehör

Stereomikroskop Leica MZ 16F LEICA MICROSYSTEMS GmbH, Wetzlar, Deutschland  
 Inverses Mikroskop Olympus CK 2 OLYMPUS K.K., Tokyo, Japan

Mikrowelle

Großraummikrowelle SHARP, Hamburg, Deutschland

Petrischalen und Zellkulturzubehör

Petrischale 60 x 15 mm mit Nocken SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland  
 Petrischale 92 x 16 mm mit Nocken SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland  
 BioLite 48 Well Multidish THERMO SCIENTIFIC, Bonn, Deutschland  
 Tissue Culture Plate 24-Well SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland  
 Zellkulturflasche T-75, Stand. ,Vent. Cap SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland  
 Zellkulturflasche T-25, Standard SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland

Pipetten

Pipette Research 0,5 – 10 µl; 10 - 100 µl EPPENDORF, Hamburg, Deutschland  
 Pipette Research 20 – 200 µl; 100 – 1000 µl EPPENDORF, Hamburg, Deutschland  
 Einweg-Pasteurpipetten 1 ml VWR International GmbH (Darmstadt)  
 Akku-betriebene Pipettierhilfe Pipetus® HIRSCHMANN LABORGERÄTE GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland

Pipettenspitzen

Biosphere Filter Tip 20; 100; 100 – 1000 µl SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland  
 Pipettenspitze 10 µl; 200 µl; 1000 µl SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland

pH-Meter

pH-Meter HI991000 HANNA INSTRUMENTS, Kehl am Rein, Deutschland  
 pH-Meter 761 Calimatic KNICK, Berlin, Deutschland

Photometer

Epoch Mikroplatten Spektralphotometer BIOTEK, Bad Friedrichshall, Deutschland  
 Take3 Mikro-Volumen-Platte BIOTEK, Bad Friedrichshall, Deutschland

### Plastikreaktionsgefäße

Mikro-Schraubröhre 2ml, PP	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Tubes 0,2 ml	BIOZYM, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
PCR Single Cap 8er-Soft Strips 0,2 ml	BIOZYM, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
PCR 96-Well TW-MT Platte (weiß)	BIOZYM, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäße 0,5; 1,5; 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml; 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland

### Schüttelgeräte

Vortexer REAX 2000	HEIDOLPH, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer IKA Combimag RCT	IKA, Staufen, Deutschland
Vortex GENIUS 3	IKA, Staufen, Deutschland

### Sicherheitswerkbänke und Zubehör

Sterilbank Labogene Mars Safety Class 2	LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal, Deutschland
Gas-Sicherheitsbrenner Gasprofi 1 SCS micro	VWR, Darmstadt, Deutschland

### Spannungsquelle

Netzgerät Power Pac™ Universal	BIORAD, München, Deutschland
--------------------------------	------------------------------

### Sonstiges

Parafilm M	Bemis Company Inc., Oshkosh (WI), USA
Wägeschälchen	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Skalpellklingen "23"	Henty-Schein Inc., Melville (NY), USA
Rundfilter 597	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland

### Thermocycler

C1000™ Thermal Cycler	BIORAD, München, Deutschland
S1000™ Thermal Cycler	BIORAD, München, Deutschland
CFX96™ Real-Time System	BIORAD, München, Deutschland

### Waagen

Waage Acculab ALC-1100.2	SARTORIUS LABORATORY, Göttingen, Deutschland
Feinwaage Discovery DV215CDM	OHAUS CORPORATIONS, Nänikon, Schweiz

### Zentrifugen

Zentrifuge 5430 R	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
-------------------	---------------------------------

neoLab-Mikro-Zentrifuge	NEOLAB, Heidelberg, Deutschland
Biofuge pico	HERAEUS Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Minifuge RF	HERAEUS-SEPATECH

Zerkleinerungsgeräte und Zubehör

Speed Mill P12 Homogenisator	ANALYTIK JENA, Jena, Deutschland
innuSPEED Lysis Tubes "S"	ANALYTIK JENA, Jena, Deutschland

**3.1.2 Reaktionskits**

DNA-Kits

DNA Clean & Concentrator™-5 Kit	ZYMO RESEARCH Corporation, Irvine (CA), USA
EasyPrep Pro Plasmid Miniprep Kit	BIOZYM Vertrieb GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit	PROMEGA Corporation, Fitchburg (WI), USA
NucleoSpin® Tissue XS Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
PureYield™ Plasmid Midiprep System	PROMEGA Corporation, Fitchburg (WI), USA
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	ZYMO RESEARCH Corporation, Irvine (CA), USA

RNA-Kits

Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit	PROMEGA Corporation, Fitchburg (WI), USA
NucleoSpin® RNA Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® RNA XS Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

cDNA-Synthese-Kits

Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad (CA), USA
Qiagen QuantiTect® Reverse Transcription Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad (CA), USA

### Klonierungs-Kits

StrataClone Blunt PCR Cloning Kit	AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara (CA), USA
StrataClone PCR Cloning Kit	AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara (CA), USA
TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing, with One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli	LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad (CA), USA

### **3.1.3 Anthelminthika- und Inhibitorstammlösungen**

<u>Ivermectin</u> -Stammlösung (10 mM) (Ivermectin, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA)	MW IVM: 871 g/mol -> 8,71 g/ml = 10 mM. Gelöst in DMSO. Aliquots a 10 µl bei -80°C gelagert (nicht länger als zwei Monate) (MW-Angabe: persönliche Kommunikation Frau Prof. Dr. Janina Demeler, Ph.D)
<u>Moxidectin</u> -Stammlösung (10 mM) (Moxidectin VETRANAL, analytical standard, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA)	MW MOX: 639,82 g/mol --> 6,3982 mg/ml = 10 mM. Gelöst in DMSO. Aliquots a 10µl bei -80°C gelagert (nicht länger als zwei Monate) (MW-Angabe: Datenblatt)
<u>Piperonylbutoxid</u> -Stammlösung (50 mM) (Piperonylbutoxid PESTANAL®, analytical standard, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA)	MW Piperonylbutoxid: 338,4 g/mol -> 16,92 mg/ml = 50 mM. Dichte Piperonylbutoxid: 1,059 g/ml. Gemäß $V=m/p$ ( $V$ =Volumen, $m$ =Masse, $p$ =Dichte): 15,97 µl Piperonylbutoxid + 984,03 µl DMSO -> 50 mM Stammlösung. Jeweils vor Verwendung frisch angesetzt. (MW-Angabe: Datenblatt)

### **3.1.4 Reagenzien und Enzyme**

#### Polymerasen

AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, 10x Accuprime PCR Buffer I	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham (MA), USA
Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase, 10x Hot Start PCR Buffer, 25 mM MgCl <sub>2</sub>	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham (MA), USA
Phusion Hot Start II High-Fidelity Polymerase, 5x Phusion HF Buffer	FINNZYME, Vantaa, Finnland

Restriktionsenzyme

EcoRI, 10x Buffer EcoRI with BSA

THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham (MA), USA

für PCR

dNTP Mix (10 mM each)

THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham (MA), USA

DEPC-Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei, autoklaviert, DEPC-behandeltes Wasser für die Molekularbiologie)

CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

für Elektrophorese

Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder, Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker (Details: s. Abbildung 49)

THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham (MA), USA

GRGreen (GRSafe) Nucleic Acid Gel Stain

LABGENE Scientific Sa, Chatel-St-Denis, Schweiz

Sonstiges

Lugols Lösung

MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland



### 3.1.5 Verwendete PCR-Primer und Primerpaarungen

Alle in diesem Projekt verwendeten Primer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific, Life Technologies synthetisiert. Im Folgenden sind alle verwendeten Primer sortiert nach Teilprojekt gelistet.

#### 3.1.5.1 Primer für die Suche nach *cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden

Die degenerierten Primer wurden auf Grundlage der gesplitten Sequenzen der fünf Vertreter der *C. elegans-cyp-14A*-Familie sowie des *cyp-2A39* (accession number: J1169326) aus *A. suum* (4.5.1.5) mit Hilfe des Programms Bioedit in Zusammenarbeit mit Herrn PD. Dr. Jürgen Krücken erstellt.

**Tabelle 1: Paarungen der degenerierten Primer für die Suche nach *cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden (unter Verwendung der AccuPrime™ Taq DNA Polymerase)**

	Primernamen	Primersequenz	T <sub>HYB</sub>	Elongationszeit	Produktgröße (erwartet)
1	Cyp14deg1-for	AAWGTIMGIRAATAYCCIAAAGG	50 °C	0:45 min	ca. 563 bp
	Cyp14deg1-rev	SCMACRCAAARYTGAAYIGGCCA			
2	Cyp14deg2-for	GATTTYTKKYTDGCWGGIATGGA	50 °C	0:30 min	ca. 161 bp
	Cyp14deg2-rev1	GGCATATTYKGTTTTRTCDRMCAT			
3	Cyp14deg2-for		50 °C	0:30 min	ca. 161 bp
	Cyp14deg2-rev2	GGCATATTYKGTTTTRTCDRGACAT			
4	Cyp14deg1-for		50 °C	1:30 min	ca. 974 bp
	Cyp14deg-2rev1				
5	Cyp14deg1-for		50 °C	1:30 min	ca. 974 bp
	Cyp14deg-2rev2				

### 3.1.5.2 Primer für Etablierung und Durchführung der *cyp-14A5*-qPCR

Tabelle 2: Primer für Etablierung und Durchführung der *cyp-14A5*-qPCR (unter Verwendung der Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase)

Primernamen	Zielgen	Primersequenz	Hybridisierungstemperatur	Elongationszeit	Produktgröße (erwartet)	Quelle
C.e_ama-1_f	F36A4.7	TCGAACGACATCCAACGATA	60,7 °C	0:30 min	133 bp	(Jones, Rayson et al. 2013)
		TGCCAAATGTCGGTAATTGA				
C.e_ama-1_r						
C.e_tba-1_f	F26E4.8	TCAACACTGCCATCGCCGCC	60,7 °C	0:30 min	193 bp	(Zhang, Chen et al. 2012)
		TCCAAGCGAGACCAGGCTTCAG				
C.e_tba-1_r						
C.e_Y45F10D.4_f	Y45F10D.4	CGAGAACCCCGCGAAATGTCGGA	60 °C	0:30 min	191 bp	Zhang, Chen et al. 2012)
		CGGTTGCCACGGGAAGATGAGGC				
C.e_Y45F10D.4_r						
pmp-3_f	C54G10.3	GTTCCCGTGTTTCATCACTCAT	60,7 °C	0:30 min	115 bp	(Hoogewijs, Houthoofd et al. 2008)
		ACACCCGTCGAGAAGCTGTAGA				
pmp-3_r						
cyp14A5_qpct_neu_f	F08F3.7	AGCGTTTTTCATCGTTGCTTT	60 °C	0:15 - 0:30 min	136 bp	selbst erstellt
		TATTATCGGCTGGGAAGTGC				
cyp14A5_qpct_neu_r						

### 3.1.5.3 Primer für die Überprüfung der Deletionsmutation

Die gelisteten Primer wurden selbstständig erstellt.

**Tabelle 3: Primer für die Überprüfung der Deletionsmutation beim *C. elegans*-Stamm VC249 (unter Verwendung der Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase)**

Primername	Primersequenz (5'→3')	T <sub>HYB</sub>	Elongationszeit	Produktgröße (erwartet)
CYP-14A5_gk152_VC249_F	CTAAAACTTACACCAATATTTGCCATT	58,52 °C	N2-Wildtyp: 1:45 min	N2-Wildtyp: 1462 bp
CYP-14A5_gk152_VC249_R	CAATATTAATCGGTGAGTTTATGAAGA		VC249: 0:30 min	VC249: 200 bp

### 3.1.5.4 Primer für die Überprüfung der Auskreuzung der *C. elegans-cyp-14A5*-Deletionsmutation

Die gelisteten Primer wurden selbstständig erstellt.

**Tabelle 4: Primer für Überprüfung des *C. elegans*-VC249-Auskreuzvorganges (unter Verwendung der Phusion Hot Start II High-Fidelity Polymerase)**

Primername	Primersequenz (5'→3')	T <sub>HYB</sub>	Elongationszeit	Produktgröße (erwartet)
CYP-14A5_gk152_VC249_F	CTAAAACTTACACCAATATTTGCCATT	63,1 °C	0:50 min	N2-Wildtyp: 1462 bp
CYP-14A5_gk152_VC249_R	CAATATTAATCGGTGAGTTTATGAAGA			VC249: 200 bp

### 3.1.6 Medien, Puffer und Lösungen

Agarose Gel	1x TAE-Puffer mit 0,5 – 2% Agarose versetzen, aufkochen bis Agarose gelöst
Kaliumcitrat (1M, pH 6,0)	Für 1 Liter: 20 g Zitronensäure-Monohydrat und 293,5 g Trikaliumcitrat-Monohydrat in 900 ml A. dest lösen. pH einstellen, ad 1 l A. dest, autoklavieren.
Kaliumphosphat (1M, pH 6)	136,09 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ in 900 ml A. dest lösen. pH einstellen, ad 1 l A. dest, autoklavieren.
Ladepuffer (6x)	Für 0,1 Liter: 1 mM TrisHCl (pH 7,6), 6 ml Bromphenolblaulösung (0,5 %), 60 ml Glycerol (100 %) und 12 ml EDTA (500 mM), ad 100 ml A. dest. Vor Benutzung 1:6 verdünnen.
Larvenmedium	Leitungswasser mit A. dest versetzen, bis eine Leitfähigkeit von 0,45 mS/m erreicht ist
LB (lysogeny broth)-Agar	500 ml LB-Medium + 10g Agar, autoklavieren
LB (lysogeny broth)-Medium	Für 1 Liter: 25 g LB-Pulver in 1 l A. dest lösen, autoklavieren
M9-Puffer	Für 1 Liter: 3 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5 g NaCl, 1 ml $\text{MgSO}_4$ (1 M), ad 1 l A. dest, autoklavieren
NGM-Agar	Für 1 Liter: 3 g NaCl, 2,5 g Pepton, ad 1 l A. dest. Pro Flasche: 500 ml Medium und 10g Agar, autoklavieren. Nach Autoklavieren: 0,5 ml Cholesterol (5 mg/ml in 95 % Ethanol), 0,5 ml $\text{CaCl}_2$ (1 M), 0,5 ml $\text{MgSO}_4$ (1 M), 12,5 ml Kaliumphosphat (1 M, pH 6) pro Flasche hinzufügen während Agar flüssig

S-Basal	Für 1 Liter: 5,85 g NaCl, 1 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ad 1 l A. dest, autoklavieren
S-Medium	Zu 1 l S-Basal hinzufügen: 10 ml Kaliumcitrat (1 M, pH 6), 10 ml Spurenelementlösung, 3 ml CaCl <sub>2</sub> (1 M), 3 ml MgSO <sub>4</sub> (1 M), 1 ml Cholesterol (5 mg/ml in Ethanol; nicht erneut autoklavieren
Spurenelementlösung	Für 1 Liter: 1.86 g Dinatrium-EDTA, 0,69 g FeSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O, 0,2 g MnCl <sub>2</sub> ×4 H <sub>2</sub> O, 0,29 g ZnSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O, 0,025 g CuSO <sub>4</sub> ×5 H <sub>2</sub> O, ad 1 l A. dest, autoklavieren. Dunkel lagern.
TAE-Puffer (50x)	Für 1 Liter: 242 g Tris-aminomethan-acetat mit 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) und 57 ml Essigsäure versetzen, ad 1 l A. dest. Vor Benutzung 1:50 mit A. dest verdünnen.

### 3.1.7 Chemikalien

Agar	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bacillol AF	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Biozym LE Agarose	BIOZYM, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Cholesterol (C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O)	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
CuSO <sub>4</sub> ×5 H <sub>2</sub> O	k.A.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatrium-EDTA	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
EDTA	k.a.
Essigsäure 100%	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

FeSO <sub>4</sub> x7 H <sub>2</sub> O	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB (lysogeny broth)-Medium	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol (CH <sub>4</sub> O)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
MgSO <sub>4</sub>	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MnCl <sub>2</sub> x4 H <sub>2</sub> O	k.A.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhypochloritlösung (NaClO + H <sub>2</sub> O)	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Nukleinsäurefrei	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trikaliumcitrat-Monohydrat (C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> K <sub>3</sub> O <sub>8</sub> )	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-aminomethan-acetat	k.A.
TrisHCl (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> x HCl )	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypton/Pepton	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub> )	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
ZnSO <sub>4</sub> x7 H <sub>2</sub> O	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## 3.1.8 Software

Name	Version	Entwickler/Website
Bioedit	7.0.5.3	(Hall 1999)
Bio-Rad CFX Manager	2.0.885.0923	BIORAD, München, Deutschland
NCBI-BLAST		<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
ClustalX2	2.0.12	(Larkin, Blackshields et al. 2007)
End Note X6	6.0.1	THOMSON REUTERS, San Francisco, USA
Gen5	1.10	BIOTEK INSTRUMENTS GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
Gene Snap	7.9.06	SYNGENE, Cambridge, UK
GraphPad Prism	5.03.	GRAPHPAD PRISM, La Jolla, USA
Mass Accuracy Calculation		<a href="http://homepages.warwick.ac.uk/staff/M.P.Barrow/massaccuracy.html">http://homepages.warwick.ac.uk/staff/M.P.Barrow/massaccuracy.html</a>
Mass Spectrometry Adduct Calculator		<a href="http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Metabolomics/MS-Adduct-Calculator/">http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Metabolomics/MS-Adduct-Calculator/</a>
MEGA	5	(Tamura, Peterson et al. 2011)
MetaPrint2D		<a href="http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/">http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/</a>
MUSCLE	3.8	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/</a>
Microsoft Office 2010	14.0.7128.5	MICROSOFT, Redmond, USA
NemaBLAST		<a href="http://nematode.net/">http://nematode.net/</a>
NEMBASE4 - Nematode BLAST Server		<a href="http://xyala.cap.ed.ac.uk/services/blastserver/">http://xyala.cap.ed.ac.uk/services/blastserver/</a>
PhyML	2.4.5 - 3.0	(Guindon, Dufayard et al. 2010)
ProteoWizard 32-bit	3.0.6002	<a href="http://proteowizard.sourceforge.net/#">http://proteowizard.sourceforge.net/#</a>
Sanger - <i>H. contortus</i> BLAST Server		<a href="http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/h_contortus">http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/h_contortus</a>
SMARTCyp	2.4.2	<a href="http://www.farma.ku.dk/smartCyp/index.php">http://www.farma.ku.dk/smartCyp/index.php</a>
Thermo MSFileReader	2.2.62	Thermo Fisher Scientific
XCMS_online	2.01.02a	<a href="https://xcmsonline.scripps.edu/">https://xcmsonline.scripps.edu/</a>

### 3.1.9 Verwendete *C. elegans*-Stämme

Alle *C. elegans* Stämme wurden von dem Caenorhabditis Genetics Center (CGC), University of Missouri bezogen (<http://cbs.umn.edu/cgc/home>). Die Informationen zu den Mutationen sind den Stammbeschreibungen der CGC oder [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org) entnommen.

Name	mutiertes CYP-Gen	Variation	Information zur Mutation
N2	-		
VC40	<i>cyp-13A6</i>	<i>gk31</i>	Nucleotide change: deletion: 1265 bp deletion / - (wild type / mutant)
VC40	<i>cyp-13A7</i>	<i>gk31</i>	Nucleotide change: deletion: 1265 bp deletion / - (wild type / mutant)
VC1558	<i>cyp-13B2</i>	<i>gk726</i>	Nucleotide change: insertion: - / AGG (wild type / mutant) Nucleotide change: deletion: 1291 bp deletion / - (wild type / mutant)
VC603	<i>cyp-14A2</i>	<i>gk289</i>	?
VC249	<i>cyp-14A5</i>	<i>gk152</i>	Nucleotide change: deletion: 1263 bp deletion / - (wild type / mutant)
VC482	<i>cyp-23A1</i>	<i>gk253</i>	Nucleotide change: deletion: 889 bp deletion / - (wild type / mutant)
RB1023	<i>cyp-33E1</i>	<i>ok950</i>	Nucleotide change: deletion: 1439 bp deletion / - (wild type / mutant)
RB1855	<i>cyp-34A9</i>	<i>ok2401</i>	laut CGC: Deletion size: about 1300 bp
RB1788	<i>cyp-35A1</i>	<i>ok2306</i>	Nucleotide change: deletion: 1494 bp deletion / - (wild type / mutant)
VC710	<i>cyp-35A2</i>	<i>gk317</i>	Nucleotide change: deletion: 1245 bp deletion / - (wild type / mutant)
RB 2046	<i>cyp-35A3</i>	<i>ok2709</i>	Nucleotide change: insertion: - / 47 bp insertion (wild type / mutant) Nucleotide change: deletion: 345 bp deletion / - (wild type / mutant)
RB1294	<i>cyp-35A4</i>	<i>ok1393</i>	laut CGC: Estimated Deletion Size: about 600 bp
RB1613	<i>cyp-35A5</i>	<i>ok1985</i>	Nucleotide change: deletion: 807 bp deletion / - (wild type / mutant)
RB2216	<i>cyp-35B1</i>	<i>ok2998</i>	Nucleotide change: deletion: 582 bp deletion / - (wild type / mutant)
RB1993	<i>cyp-35C1</i>	<i>ok2628</i>	laut CGC: Deletion size: about 700 bp
RB846	<i>cyp-37A1</i>	<i>ok673</i>	Nucleotide change: deletion: 1234 bp deletion / - (wild type / mutant)
AA776	<i>cyp-44A1</i>	<i>ok216</i>	Nucleotide change: deletion: 953 bp deletion / - (wild type / mutant)



### **3.1.10 Isolate der parasitischen Nematoden**

Nematoden für die Detektion von *cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden mittels PCR mit degenerierten Primern:

Nicht-ML-induzierter Ansatz:

*H. contortus*: *H.c* Mc Master (adult)

*C. oncophora*: *C. o* Weybridge (IVM-suszeptibel) (cDNA)

*O. ostertagi*: *O.o* Weybridge (IVM-suszeptibel) (cDNA)

ML-induzierter Ansatz (3.2.2.2):

*C. oncophora*: *C. o* NZ IVM resistent (AIGusbi, Krucken et al. 2014)

Nematoden für die massenspektrometrische Metabolitdetektion:

*C. oncophora*: Mix aus IVM selektierten Stämmen [interne Passagennummern: 286, 680, 281, *C. oncophora*-Pool 2012]

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung und *in vitro*-Assays mit *C. elegans*

#### 3.2.1.1 Kultivierung von *C. elegans*

*C. elegans* lässt sich aufgrund seiner Biologie als freilebender, nichtparasitischer Nematode mit überwiegend autogamer Fortpflanzung einfach im Labor kultivieren. Auch wenn die Arbeit mit *C. elegans* nicht unter sterilen Bedingungen erfolgen muss, bietet sich das Benutzen einer Sicherheitswerkbank an, um Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien zu vermeiden. Die Würmer können auf Festagarplatten aus NGM-Agar oder als Flüssigkultur in S-Medium gehalten werden, in beiden Fällen dient der *E. coli*-Stamm OP50 als Futterquelle. Bei *E. coli*-OP50 handelt es sich um einen Uracil-auxotrophen Stamm, d.h. er ist auf die Zufuhr von Uracil durch das Medium angewiesen. Im Falle der Haltung auf NGM-Agarplatten werden diese gegossen und über Nacht zum Aushärten und Trocknen bei RT unter der Werkbank stehen gelassen. Am nächsten Tag wird pro Platte eine bestimmte Menge OP50-Plattensuspension hinzugegeben (70 µl zentral bei den 6 cm-Petrischalen, 200 µl verteilt auf drei Bereiche bei den 9 cm-Petrischalen). Nachdem die OP50-Plattensuspension über Nacht angetrocknet ist, werden die Platten bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Da der NGM-Agar kein Uracil und das LB-Medium, in dem der *E. coli*-OP50-Stamm aufgenommen ist, nur begrenzt viel Uracil enthält, können die Futterbakterien die gesamte Platte nicht überwachsen und ermöglichen so ein unkompliziertes Beobachten der Würmer (Brenner 1974). Die OP50-Plattensuspension wurde wie folgt hergestellt: In einem 15 ml-Zentrifugationsröhrchen wurden 7 ml LB-Medium vorgelegt. Mit Hilfe einer Impföse wurde eine Kolonie eines OP50-Vereinzelungsausstriches (ausgestrichen auf einer LB-Agarplatte) abgenommen, in das LB-Medium überführt und anschließend über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die so erhaltene *E. coli*-OP50-Flüssigkultur wurde bis zur Verwendung bei +4 °C gelagert. Sollten Würmer von einer Platte auf die andere übertragen werden, so konnte dies entweder per „chunking“ (Ausschneiden eines dreieckigen Agarstückes aus der Ursprungsplatte mittels einer sterilen Skalpellklinge, das dann kopfüber auf die neue Platte gelegt wurde. Die auf dem Agarstück befindlichen Würmer wandern dann in Richtung Futterbakterien auf die neue Platte aus) oder durch „picken“ (Aufnehmen eines einzelnen Wurmes mit Hilfe einer Insektenpräpariernadel und Überführen auf eine neue Platte) geschehen. Die Platten wurden dann mit Parafilm umwickelt um Austrocknung und Entweichen der Würmer zu verhindern und bei 20 °C in Styroporboxen gelagert.

Bei der Flüssigkultur von *C. elegans* wurden die Würmer in Volumina von 50 - 150 ml S-Medium gehalten und zusätzlich mit *E. coli*-OP50 als Futterquelle versorgt. Die Bakterien wurden dabei als konzentriertes Pellet hinzugegeben. Diese Pellets wurden wie folgt angesetzt: 600 ml LB-Medium wurden mit 600 µl der OP50-Plattensuspension angeimpft und

über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkultur auf zwölf 50 ml-Zentrifugationsröhrchen aufgeteilt, diese wurden bei 3000 rpm für 20 min (1509 ×g) zentrifugiert, dann der Überstand abgegossen und die in den 50 ml-Zentrifugationsröhrchen verbleibenden Pellets bei +4 °C bis zum Verbrauch gelagert. Pro 50 - 150 ml Flüssigmediumansatz wurde ein Pellet hinzugegeben, die Gesamtmenge des Ansatzes bemaß sich dabei an den weiterführenden Versuchen und der dafür benötigten Menge an Kulturflüssigkeit. Ein Pellet *E. coli*-OP50 erwies sich als ausreichend für Kulturvolumen bis 150 ml für eine Wachstumsdauer von bis zu vier Tagen.

Eine bewährte Anzuchtstrategie bestand darin, pro in Flüssigkultur zu bringenden Stamm am ersten Tag zwei 9 cm-Petrischalen durch „chunking“ mit je einem etwa daumennagelgroßen Agarstück einer dicht mit Würmern bewachsenen 6 cm-Ursprungsplatte zu versehen. Am Tag vier wurde jede dieser Petrischalen mit je 2 ml S-Medium abgespült und die Würmer zusammen mit der benötigten Menge S-Medium und dem Futterpellet in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Bei 20 °C und 150 rpm wurden die Flüssigkulturen im Kühlschüttler inkubiert, am Tag sieben standen die Würmer dann für weiteres Vorgehen wie einer DNA-Extraktion oder der sog. Synchronisation (ein Verfahren zur Isolation der Eier durch Desintegration der graviden Tiere) zur Verfügung.

Letzteres war nötig, wenn die Würmer in einen Versuch eingebracht werden sollten, in dem die Verwendung einer synchronisierten, d.h. im gleichen Entwicklungsstadium befindlichen Population nötig war (etwa um eine Verzerrung der Ergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher *C. elegans*-Entwicklungsstadien zu verhindern). Hierbei wurden die Eier einer dicht bewachsenen *C. elegans*-Flüssigkultur isoliert und über Nacht ohne Zugabe von Futterbakterien in M9-Puffer bei 20 °C und 150 rpm gelagert. Die aus den Eiern geschlüpften Erstlarven verharren im L1-Stadium, da ohne Futter keine weitere Entwicklung erfolgt. Erst mit der Aufnahme von Nahrung (etwa durch das Einbringen der Larven in einen dementsprechend aufgebauten Versuch) startet die Entwicklung über das L1-Stadium hinaus und ermöglicht eine zuverlässige Aussage über den Entwicklungsstand der Würmer zum Zeitpunkt null des Versuches.

Die Synchronisation im Detail wurde folgendermaßen durchgeführt: Pro zu synchronisierendem Stamm wurden 50 ml Flüssigkultur in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und auf Eis gelagert, bis die Würmer sedimentierten. Der Überstand wurde bis auf 2-3 ml abgenommen (dabei war darauf zu achten, dass das Wurmpellet nicht aufgewirbelt wurde). Für das Auflösen der Würmer wurde eine Mischung aus 3 ml 2 M NaOH und 5 ml Natriumhypochlorit (12 % in H<sub>2</sub>O) je Stamm verwendet. Diese Lösung wurde direkt vor Verwendung frisch angesetzt. Sobald sie dem Wurmpellet zugegeben wurde, wurde das 50 ml-Zentrifugationsröhrchen verschlossen und intensiv geschüttelt. Optional konnten nach

30 s 10 µl des Ansatzes auf einen Objektträger gegeben und das Aufbrechen der Würmer mikroskopisch bei 20facher Vergrößerung mitverfolgt werden, das intensive Schütteln des Gesamtansatzes wurde dabei fortgeführt. Abhängig vom Alter der Natriumhypochlorit-Lösung erfolgte das Aufbrechen der Würmer ab 60 s, meist ergaben sich gute Ergebnisse wenn der Auflösevorgang nach 75 s durch Auffüllen des 50 ml-Zentrifugationsröhrchens mit M9-Puffer abgestoppt wurde (bei Verwendung älterer Natriumhypochlorit-Lösung konnte sich diese Zeitspanne auch erhöhen, in diesem Fall war die Durchführung der mikroskopischen Kontrolle angeraten). Direkt im Anschluss wurde das 50 ml-Zentrifugationsröhrchen für 5 min bei 1400 rpm (329 xg) mit deaktivierter Bremse zentrifugiert, dann der Überstand bis auf 5 ml Volumen abgenommen, verworfen und das Röhrchen mit frischem M9-Puffer aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde vierfach wiederholt. War dies erfolgt, wurde der Überstand erneut abgenommen und 2 µl des Restvolumens mikroskopisch auf Eier untersucht. Fanden sich darin mindestens fünf Eier konnte die Synchronisation als erfolgreich gewertet werden. In diesem Falle wurde das 50 ml-Zentrifugationsröhrchen wieder mit M9-Puffer aufgefüllt und das Gesamtvolumen in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben überführt. Dieser wurde über Nacht bei 20 °C und 150 rpm im Kühlschüttler gelagert. Am nächsten Tag wurde die Larvensuspension durch ein Sieb (Maschenweite 25 – 28 µm) in ein neues 50 ml-Zentrifugationsröhrchen gegeben und bei 1400 rpm (329 xg) ohne Bremse für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 5 ml abgenommen, 2 µl von dem Restvolumen unter dem Mikroskop auf Erstlarven untersucht und die Menge Erstlarven pro 2 µl so mit M9-Puffer eingestellt, dass sich 5-10 L1 darin befanden. Waren bei der ersten Kontrolle weniger als 5 L1 pro 2 µl zu finden, wurde das 5 ml-Restvolumen erneut für 5 min bei 1400 rpm (329 xg) ohne Bremse zentrifugiert. Dann wurden vorsichtig 2-3 ml vom Überstand abgenommen, die Erstlarven erneut ausgezählt und auf die gewünschte Anzahl eingestellt.

### **3.2.1.2 C. elegans Entwicklungsassay**

Um die Sensitivität verschiedener *C. elegans*-Stämme gegenüber IVM und MOX vergleichen zu können, wurden Entwicklungsassays in 48-Well-Zellkulturplatten durchgeführt. Die zu vergleichenden Stämme wurden dabei als Erstlarven in den Versuch eingesetzt und verschiedenen, definierten Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt. In deren Gegenwart entwickelten sie sich bis zu dem Punkt, ab dem Eier im Kontrollansatz (ohne Wirkstoff) vorhanden waren. War dieser Punkt erreicht, wurden sämtliche Würmer eines Ansatzes durch Zugabe von Iodlösung abgetötet und der Anteil der graviden Hermaphroditen an der Gesamtwurmzahl eines jeden Wells ermittelt. Die so ermittelten Entwicklungsraten geben Auskunft über die Fähigkeit des jeweiligen Stammes, sich unter definierten Wirkstoffkonzentrationen zu entwickeln.

Im Detail wurden die Entwicklungsassays wie folgt durchgeführt:

Die Wells der 48-Well-Zellkulturplatte wurden mit je 200 µl Volumen befüllt. Dieses Gesamtvolumen setzte sich aus 168 µl S-Medium, 10 µl *E. coli*-OP50-Futtersuspension als Nahrungsquelle, 2 µl Wirkstoff gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) und 20 µl Larvensuspension (enthielt 50-100 Erstlarven des zu untersuchenden *C. elegans*-Stammes) zusammen. Die *E. coli*-OP50-Suspension wurde wie folgt angesetzt: Über Nacht wurden 600 ml LB-Medium mit 600 µl *E. coli*-OP50-Plattensuspension (s. 3.2.1.1) beimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Kulturansatz auf zwölf 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt, diese bei 3000 rpm (1509 xg) und aktivierter Bremse zentrifugiert und die Überstände abgegossen. Je drei Pellets wurden in 2 ml S-Medium resuspendiert und die so entstandenen vier Ansätze zur fertigen *E. coli*-OP50-Futtersuspension gepoolt. Diese Suspension wurde bei +4 °C gelagert und ggf. vor Verwendung für mindestens vier Stunden auf -80 °C gekühlt. Eine dauerhafte Lagerung bei -80 °C erwies sich als ungeeignet, da es durch das regelmäßige Einfrieren und Auftauen zu nicht löslichen Verklumpungen der Bakterien kam.

Die Wirkstoffe IVM und MOX wurden in DMSO gelöst, allerdings durfte der Wirkstoff/DMSO-Anteil nicht mehr als 1 % des Gesamtansatzes ausmachen, um eine Einflussnahme des DMSO auf die Entwicklung der Würmer auszuschließen (Ura K. 2002). Da im Laufe des Projektes verschiedene Wirkstoffkonzentrationen eingesetzt wurden, wird hier exemplarisch der Aufbau für einen Entwicklungsassay mit den Endkonzentrationen 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 10 nM für IVM und 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 10 nM für MOX beschrieben. Pro Konzentration wurden pro zu untersuchendem *C. elegans*-Stamm drei technische Replikate angesetzt (außer beim Screening der verschiedenen *C. elegans*-Stämme (4.2), dort wurde die 10 nM-Konzentrationen in drei Replikaten ausschließlich für den N2-Wildtyp angesetzt und dienten lediglich als Positivkontrolle für die Wirkstoffwirksamkeit). Die 0 nM-Konzentration diente als gemeinsame Negativkontrolle für die IVM- und MOX-Entwicklungsreihe (war also pro *C. elegans*-Stamm mit drei technischen Replikaten vertreten). Ein Pipettierschema mit den exemplarischen Wirkstoffkonzentrationen findet sich im Folgenden (das Ansetzen der Stocklösungen ist unter 3.1.3 beschrieben):

**Tabelle 5: Pipettierschema IVM für den Entwicklungsassay**

Vorverdünnung	Nr.	Konzentration Lösung	Zugabe Vorverdünnung	Zugabe DMSO	Gesamtvolumen
	①	100 µM	10 µl Stocklösung (10 mM)	990 µl	1000 µl
	②	10 µM	100 µl Lösung ①	900 µl	1000 µl
Endkonzentration im Assay	Nr.	Konzentration Lösung	Zugabe Vorverdünnung	Zugabe DMSO	Gesamtvolumen
<b>0 nM</b>	③	0 nM	--	1350 µl	1350 µl
<b>1 nM</b>	④	100 nM	13,5 µl Lösung ②	1336,5 µl	1350 µl
<b>2 nM</b>	⑤	200 nM	27 µl Lösung ②	1323 µl	1350 µl
<b>3 nM</b>	⑥	300 nM	40,5 µl Lösung ②	1309,5 µl	1350 µl
<b>4 nM</b>	⑦	400 nM	54 µl Lösung ②	1296 µl	1350 µl
<b>5 nM</b>	⑧	500 nM	67,5 µl Lösung ②	1282,5 µl	1350 µl
<b>6 nM</b>	⑨	600 nM	81 µl Lösung ②	1269 µl	1350 µl
<b>10 nM</b>	⑩	1000 nM	135 µl Lösung ②	1215 µl	1350 µl

**Tabelle 6: Pipettierschema MOX für den Entwicklungsassay**

Vorverdünnung	Nr.	Konzentration Lösung	Zugabe Vorverdünnung	Zugabe DMSO	Gesamtvolumen
	①	100 µM	10 µl Stocklösung (10 mM)	990 µl	1000 µl
	②	10 µM	100 µl Lösung ①	900 µl	1000 µl
Endkonzentration im Assay	Nr.	Konzentration Lösung	Zugabe Vorverdünnung	Zugabe DMSO	Gesamtvolumen
1 nM	③	100 nM	13,5 µl Lösung ②	1336,5 µl	1350 µl
1,5 nM	④	150 nM	20,25 µl Lösung ②	1329,75 µl	1350 µl
2 nM	⑤	200 nM	27 µl Lösung ②	1323 µl	1350 µl
2,5 nM	⑥	250 nM	33,75 µl Lösung ②	1316,25 µl	1350 µl
3 nM	⑦	300 nM	40,5 µl Lösung ②	1309,5 µl	1350 µl
3,5 nM	⑧	350 nM	47,25 µl Lösung ②	1302,75 µl	1350 µl
4 nM	⑨	400 nM	54 µl Lösung ②	1296 µl	1350 µl
10 nM	⑩	1000 nM	135 µl Lösung ②	1215 µl	1350 µl

Alle Bestandteile außer der Larvensuspension wurden zuvor pro Wirkstoff und Konzentration als Mastermix angesetzt, um Fehler beim Pipettieren der kleinen Volumina zu vermeiden; je Well wurden 180 µl Mastermix vorgelegt. Vor dem Befüllen der 48-Well-Zellkulturplatte wurde diese beschriftet und auf der Rückseite mit Hilfe von Skalpell und Lineal derart eingeritzt, dass pro Wellzeile vier Schnitte angebracht wurden. Unter dem Mikroskop ergab dies eine Fünfteilung eines jeden Wellbodens, was ein mäanderndes Durchmuster der Wells bei der späteren Zählung der Würmer zuließ.

Von der Suspension der synchronisierten Erstlarven der zu vergleichenden *C. elegans*-Stämme (eingestellt auf 5 - 10 Individuen pro 2 µl) wurden pro Well 20 µl hinzugegeben. Es war darauf zu achten, dass die Suspension gegen die Wand des Wells pipettiert wurde und die Pipettenspitze keinesfalls den vorgelegten Mastermix berühren durfte. Nach Beendigung der Pipettierarbeit wurde der Deckel aufgelegt und mittels eines Streifens Parafilms abgeklebt, um ein Austrocknen der Platte zu verhindern. Die Platten wurden lichtdicht in Papierhandtücher verpackt und bei 20 °C und 150 rpm im Kühschüttler inkubiert.

Sobald sich in den Negativ-Kontrollansätzen frisch produzierte Eier fanden, wurde der Assay durch Zugabe von 10 µl Iodlösung (5 % Lugollösung in M9-Puffer) pro Well abgestoppt und unter dem Mikroskop bei 31,25facher Vergrößerung bei entferntem „phase slider“ und fast vollständig geöffneter Blende ausgezählt. Dabei wurde pro Well die Anzahl der graviden Adulten der Gesamtwurmzahl gegenübergestellt und so die Entwicklungsrate berechnet. Die Berechnung der Entwicklungsraten wurde mit Microsoft Excel durchgeführt, die spätere statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism.

### 3.2.1.2.1 *C. elegans* Entwicklungsassay unter Zugabe von Piperonylbutoxid

Für Entwicklungsassays, in denen neben dem Wirkstoff IVM oder MOX noch PBO als allgemeiner CYP-Inhibitor eingesetzt werden sollte, wurde ein angepasstes Pipettierschema verwendet. Die Herstellung der 10 µl-ML-Vorverdünnungen wurde wie unter 3.2.1.2, Tabelle 5 und 6, beschrieben durchgeführt. Die Herstellung der 50 mM-PBO-Vorverdünnung ist 3.1.3 zu entnehmen. Die angegebenen Konzentrationen sind exemplarisch.

**Tabelle 7: Pipettierschema Entwicklungsassaykombinationsansatz Piperonylbutoxid und ML**

<b>PBO-Endkonz. im Assay</b>	PBO-Konz. in Lösung	Zugabe PBO-Vorverdünnung	<b>ML-Endkonz. im Assay</b>	ML-Konz. in Lösung	Zugabe ML-Vorverdünnung	Zugabe DMSO	Gesamt-volumen
<b>0 µl</b>	0 µM	0 µl	<b>0 nM</b>	0 nM	0 µl	1000 µl	1 ml
<b>0 µl</b>	0 µM	0 µl	<b>2 nM</b>	200 nM	20 µl ② oder ②	980 µl	1 ml
<b>100 µM</b>	10 mM	200 µl	<b>0 nM</b>	0 nM	0 µl	800 µl	1 ml
<b>100 µM</b>	10 mM	200 µl	<b>2 nM</b>	200 nM	20 µl ② oder ②	780 µl	1 ml

Die Durchführung des Entwicklungsassays erfolgte analog zu der in 3.2.1.2 gegebenen Beschreibung.

### 3.2.1.3 Auskreuzen der *cyp-14A5*-Deletionsmutation in den Bristol-N2-Wildtypstamm

Obwohl die *C. elegans* Hermaphroditen sich ohne das Beiwohnen von Männchen durch Selbstbefruchtung fortpflanzen können, sind Männchen für einen Kreuzungsversuch unerlässlich. Um ausreichend viele Männchen für Kreuzungsexperimente zu erhalten, kann man sich verschiedener Methoden bedienen, die Fehlsegregationsrate während der Meiose und damit den Anteil der gebildeten Männchen zu erhöhen. Hitzeschock, RNAi-Ansätze sowie die Nutzung von *him*-Mutanten (high incidence of male) stellen etablierte Techniken dar; aufgrund der Einfachheit und Kostengünstigkeit wurde im vorliegenden Fall auf die



Hitzeschockbehandlung zurückgegriffen. Dabei werden mehrere Hermaphrodit-Viertlarven für einige Stunden einer Temperatur von 30-35 °C im Brutschrank ausgesetzt, wodurch eine Erhöhung der Fehlsegregationsrate erreicht wird. Die genaue Dauer und Temperatur kann dabei je nach Protokoll schwanken, im vorliegenden Fall hatte eine Behandlung bei 31 °C für 5 h Erfolg. Die so erhaltenen Bristol-N2-Männchen wurden adult im Verhältnis eins zu fünf mit Bristol-N2-Hermaphrodit-Viertlarven vergesellschaftet um durch stattfindende Paarungen die Population an Männchen aufrechtzuerhalten.

Unter Auskreuzen versteht man die Vererbung einer bestimmten Eigenschaft aus einer Individuengemeinschaft (Population, Kulturpflanzensorte) in eine andere ([www.biosicherheit.de](http://www.biosicherheit.de)). Im vorliegenden Fall sollte das die 1263 bp-Deletion im *cyp-14A5*-Gen tragende Allel *gk152* aus dem *C. elegans*-Stamm VC249 in den Bristol-N2-Wildtypstamm überführt werden. Nötig macht dies die Tatsache, dass der Stamm VC249 durch Zufallsmutagenese mittels Ethylmethansulfonat aus dem Wildtyp hervorgegangen ist und somit weitere Mutationen im restlichen Genom nicht auszuschließen sind. Da solche nicht identifizierten Mutationen Einfluss auf den Phänotyp des Stammes haben können, war es nötig das restliche Genom des VC249-Stammes soweit wie möglich mit dem des Bristol-N2-Wildtypes zu ersetzen; hierfür wurde eine vierfache Auskreuzung vorgenommen.

Das *cyp-14A5*-Gen liegt auf Chromosomenpaar V (einem der fünf Autosomenpaare) und ist damit bedingt durch die Diploidie von *C. elegans* in zwei Kopien vorhanden. Für die Auskreuzung wurden fünf adulte N2-Männchen mit einem VC249-L4-Hermaphrodit verpaart (F0-Generation), die beiden Stämme waren dabei jeweils homozygot für ihr *cyp-14A5*-Allel. Gemäß der Uniformitätsregel nach Mendel sollte die F1-Generation vollständig heterozygot für das *cyp-14A5*-Allel sein, d.h. je ein Wildtyp- und ein Deletionsallel tragen (Abbildung 5 und Abbildung 6). Für den nächsten Kreuzungsschritt gab es zwei Varianten, bei beiden wurde die F2-Generation aus Vertretern der F1-Generation gemäß der Spaltungsregel nach Mendel hervorgebracht. Für Variante 1 (Abbildung 5) wurde ein heterozygoter Hermaphrodit der F1-Generation auf eine mit OP50-Futtersuspension versehene kleine NGM-Agarplatte verbracht, dieser konnte dort per Selbstbefruchtung Nachkommen zeugen (F2-Generation). Für Variante 2 (Abbildung 6) wurde ein heterozygoter L4-Hermaphrodit der F1-Generation mit fünf heterozygoten adulten Männchen der F1-Generation verpaart.

Die F2-Generation sollte gemäß der Spaltungsregel zu 25% homozygot für das *cyp-14A5*-Wildtypallel, zu 25% homozygot für das *cyp-14A5*-Deletionsallel und zu 50% heterozygot mit jeweils einem Wildtyp- und einem Deletionsallel sein. Ziel der Auskreuzung war die für das Deletionsallel homozygote Teilpopulation. Jeweils zehn Nachkommen dieser F2-Generation wurden dafür auf mit OP50-Futtersuspension versehene große NGM-Agarplatten vereinzelt. Dabei war es wichtig, die Nachkommen bei einem Entwicklungsstand zu übertragen, der eine

eindeutige Identifikation als Hermaphrodit zuließ, aber noch vor Erreichen der Paarungsfähigkeit lag, um einen ungewollten Einfluss durch eine Paarung und damit einhergehende Übertragung von Sperma mit ev. anderem Genotyp zu verhindern.

Sobald die vereinzelt Hermaphroditen sich vermehrt und die großen NGM-Platten besiedelt hatten, wurden – nachdem jede Teilpopulation auf einer kleinen, mit OP50-Futtersuspension versehenen NGM-Agarplatte weitergeführt wurde – die zehn Teilpopulationen der DNA-Isolation zugeführt. Dabei kamen zwei unterschiedliche Verfahren zur Anwendung: Während der ersten drei Kreuzungsansätze wurden die Teilpopulationen je in Flüssigkultur gebracht (pro Ansatz: 50 ml S-Medium mit einem OP50-Futterpellet) und anschließend die genomische DNA per Maxwell® 16 System DNA Purification Kit isoliert (3.2.3.1.1). Während der vierten Auskreuzungsrunde wurde aus Gründen der Zeitersparnis die DNA von den auf den großen NGM-Platten befindlichen Teilpopulationen direkt per Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue XS Kit isoliert (3.2.3.1.2). Im Anschluss an DNA-Isolation (und Messung der DNA-Konzentration) wurde eine PCR-Überprüfung (3.2.3.3.3) durchgeführt, auf deren Aussage beruhend eine für das Deletionsallel homozygote Teilpopulation ausgewählt und für die nächste Runde der Auskreuzung verwendet wurde. Die Templates (je 2 µl) der in der PCR verwendeten drei Positivkontrollen setzten sich dabei folgendermaßen zusammen:

- ① Positivkontrolle Wildtyp: 1 µl A. dest + 1 µl gDNA vom *cyp-14A5*-Wildtypstamm
- ② Positivkontrolle *gk152*: 1 µl A. dest + 1 µl gDNA vom Stamm VC249
- ③ Positivkontrolle Heterozygot: 1 µl ① + 1 µl ②

Schema 1

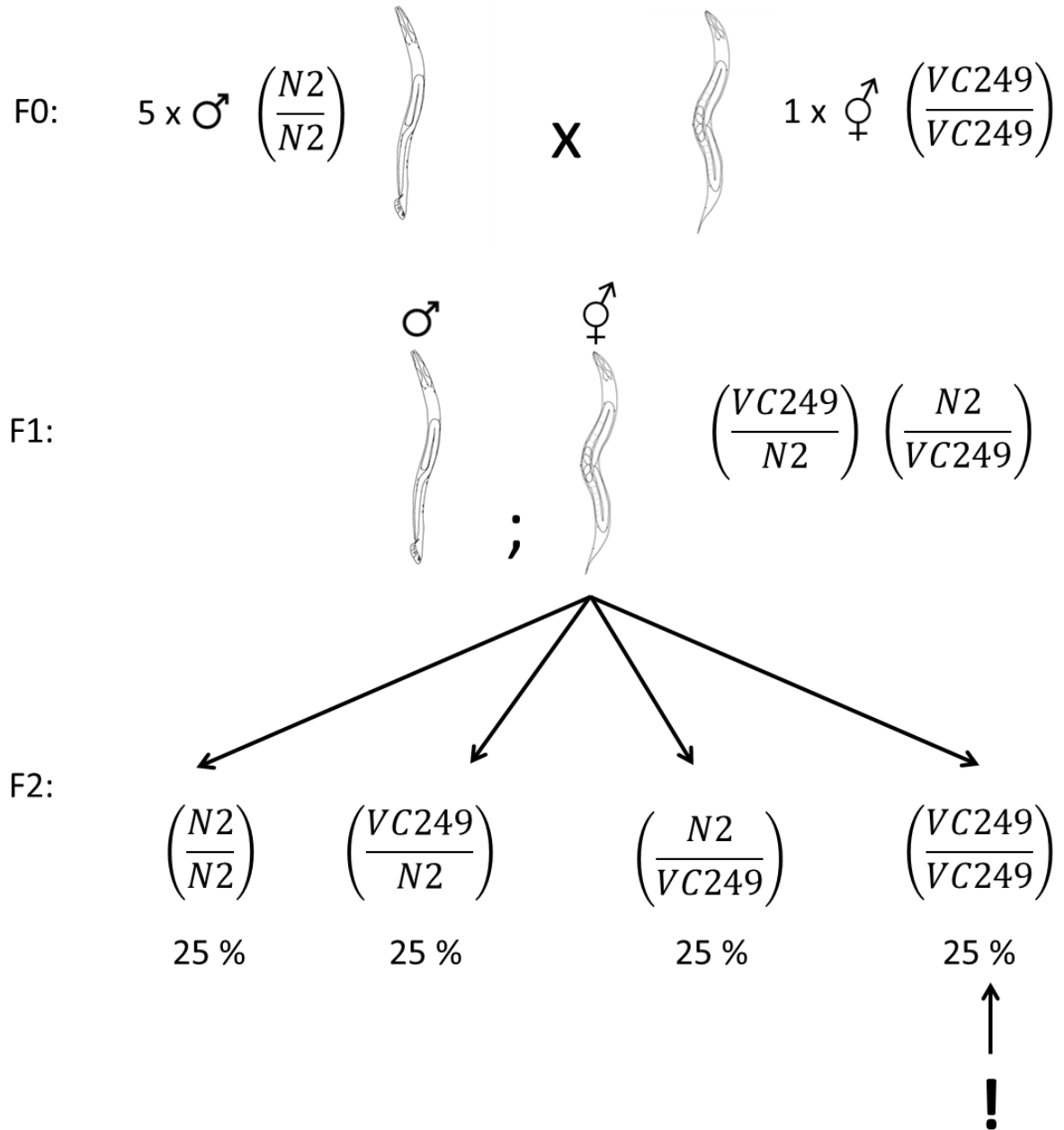


Abbildung 5: Kreuzungsschema für Auskreuzung, Variante 1

Schema 2

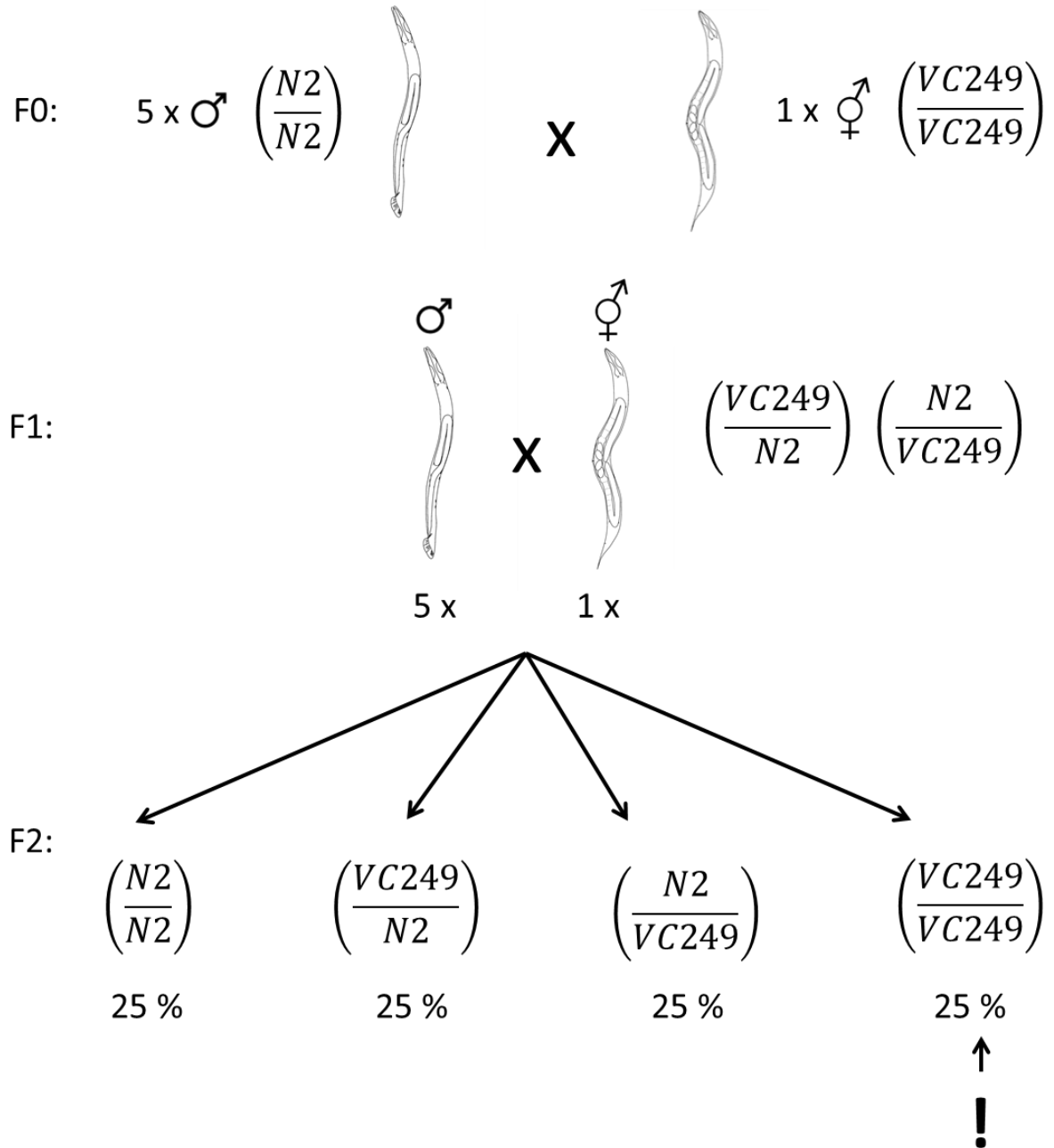


Abbildung 6: Kreuzungsschema für Auskreuzung, Variante 2

Von den PCR-Ansätzen wurden anschließend je 10 µl unverdünnt auf das Agarosegel aufgetragen, um auch schwache Banden zu detektieren.

### 3.2.1.4 Inkubation und Aufarbeitung des Bristol-N2-Wildtypstammes mit Makrozyklischen Laktone für die *cyp-14A5*-Expressionsuntersuchung

Um die Expression des *cyp-14A5*-Gens beim Bristol-N2-Wildtypstammes unter Einwirkung von IVM und MOX untersuchen zu können, wurden Inkubationen mit nicht entwicklungsbeeinträchtigenden Konzentrationen der beiden Wirkstoffe durchgeführt und die aus den N2-Würmern extrahierte RNA einer quantitativen Real-Time-PCR zugeführt.

Die Inkubation wurde analog zu dem in 3.2.1.2 beschriebenen Entwicklungsassay in 48-Well-Platten durchgeführt. Ebenso wie bei den Entwicklungsassays wurden synchronisierte Erstlarven in den Versuch eingebracht, im vorliegenden Fall die des Bristol-N2-Wildtypstammes. Pro Well wurden rein rechnerisch 100 Erstlarven eingesetzt. Die zugegebenen Futterbakterien vom Stamm *E. coli* OP50 wurden dabei für mindestens vier Stunden bei -80 °C gelagert.

Die Endkonzentration der Wirkstoffe betrug 2 nM für IVM und 1,5 nM für MOX. Des Weiteren wurde ein Negativkontrollansatz ohne Wirkstoff (nur mit DMSO) sowie zwei Positivkontrollen für IVM und MOX (mit Endkonzentrationen von je 10 nM) durchgeführt. Die beiden 10 nM-Positivkontrollen fanden keinen Eingang in die anschließende Untersuchung per quantitativer Real-Time-PCR, sondern dienten lediglich der Überprüfung der Wirkstoffwirksamkeit.

**Tabelle 8: Pipettierschema IVM für die *cyp-14A5*-Expressionsuntersuchung**

	Nr.	Konzentration Lösung	Zugabe Solvat	Zugabe DMSO	Gesamtvolumen
Vorverdünnung	①	100 µM	10 µl Stocklösung (10 mM)	990 µl	1000 µl
	②	10 µM	100 µl Lösung ①	900 µl	1000 µl
Endkonzentration im Well	Nr.	Konzentration Lösung	Zugabe Solvat	Zugabe DMSO	Gesamtvolumen
<b>2 nM</b>	③	200 nM	27 µl Lösung ②	1323 µl	1350 µl
<b>10 nM</b>	④	1000 nM	135 µl Lösung ②	1215 µl	1350 µl

Tabelle 9: Pipettierschema MOX für die *cyp-14A5*-Expressionsuntersuchung

	Nr.	Konzentration Lösung	Zugabe Solvat	Zugabe DMSO	Gesamtvolumen
Vorverdünnung	①	100 µM	10 µl Stocklösung (10 mM)	990 µl	1000 µl
	②	10 µM	100 µl Lösung ①	900 µl	1000 µl
Endkonzentration im Well	Nr.	Konzentration Lösung	Zugabe Solvat	Zugabe DMSO	Gesamtvolumen
1,5 nM	③	150 nM	20,25 µl Lösung ②	1329,75 µl	1350 µl
10 nM	④	1000 nM	135 µl Lösung ②	1215 µl	1350 µl

Von jedem der drei Ansätze (DMSO-Negativkontrolle, 2 nM IVM, 1,5 nM MOX) wurden jeweils drei technische Replikate durchgeführt. Für jedes Replikat wurden dabei 10 Wells benötigt, was 30 Wells pro Ansatz nötig machte. Die beiden 10 nM-Positivkontrollen wurden jeweils im Dreifachansatz durchgeführt, so dass die komplette Inkubation auf zwei 48-Well-Platten Platz fand.

Wie bei den Entwicklungsassays wurde die Inkubation nach Auftreten der ersten Eier in der DMSO-Negativkontrolle beendet. Hierfür wurden pro technischem Replikat je zehn Wells in einem 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäß zusammengeführt und diese zum Sedimentieren der Würmer auf Eis gelagert. Nach erfolgter Sedimentation wurde der Überstand abgenommen und das Reaktionsgefäß wieder mit M9-Puffer gefüllt. Dieser Vorgang diente dem Auswaschen der verbliebenen Futterbakterien und wurde ein zweites Mal wiederholt. Final wurde der Überstand abgenommen und die sedimentierten Würmer der RNA-Extraktion (3.2.3.1.7) zugeführt. Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (3.2.3.2.2) und die Expression von *cyp-14A5* per quantitativer Real-Time-PCR (3.2.3.9) untersucht.

### 3.2.2 Kultivierung und *in vitro*-Assays parasitische Nematoden

#### 3.2.2.1 Lagerung der parasitischen Nematoden

Die Drittlarven( L3) der parasitischen Nematoden wurden in Larvenmedium in 250 ml-Zellkulturflaschen bei +10 °C gelagert.

Sollten L3 für Versuche genutzt werden, wurden die in den Zellkulturflaschen befindlichen Populationen über ein Trichterverfahren nach Baermann aufgereinigt. Hierbei werden tote Larven sowie Verunreinigungen zurückgehalten und herausgefiltert, was es ermöglicht, nur lebendige L3 in den Versuch einzusetzen. Das Trichterverfahren besteht dabei aus einem Plastiktrichter mit aufgestülptem Plastikschlauch, wobei das untere Ende des

Plastikschlauches schräg abgeschnitten ist und zusätzlich mit einer Metallklemme parallel zur Schnittkante verschlossen wird. Die Metallklemme wird dabei so angebracht, dass die bei Betätigung des Öffnungsmechanismus sich zuerst öffnende Klemmenseite zum ausgezogenen Ende des Plastikschlauches zeigt. In den Trichter wird ein kreisförmiger Stickrahmen aus Plastik eingelegt, in den eine sechslagige Gaze eingespannt ist (die bespannte Seite zeigt dabei nach unten). Der Trichter wird bei verschlossenem Schlauch mit Larvenmedium gefüllt bis die Unterseite des bespannten Stickrahmens benetzt ist.

Die Zellkulturflaschen mit den aufzureinigenden L3 werden hochkant aufgestellt um die Larven zu sedimentieren, dann wird der Überstand weitgehend abgenommen (bis auf max. 30 ml) und die so aufkonzentrierten Larven werden auf den bespannten Stickrahmen des Trichters gegeben. Die Zellkulturflasche wird mit Larvenmedium nachgespült und die so gewonnenen Larven ebenfalls auf den bespannten Stickrahmen gegeben. Es ist darauf zu achten dass die Larven auf der Gaze von Larvenmedium bedeckt sind, allerdings darf der Flüssigkeitsspiegel den Rahmen nicht übersteigen.

Die lebendigen Larven wandern durch die Gazelagen und sinken in das Schlauchende ab. Durch Betätigung der Metallklemme können diese in eine neue Zellkulturflasche abgenommen werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass der bespannte Stickrahmen nicht trockenfällt, ggf. muss Larvenmedium nachgefüllt werden. Nach erfolgter Aufreinigung können die lebendigen Larven ausgezählt werden (3x 10 µl Suspension auszählen), anhand dieser Werte kann dann die Larvenmenge pro ml bestimmt werden.

### **3.2.2.2 Inkubation und Aufarbeitung von *C. oncophora* Drittlarven mit Makrozyklischen Laktonen zur Detektion von *cyp-14A*-homologen Genen mittels PCR mit degenerierten Primern**

Zur Aufspürung von potentiell am ML-Metabolismus in *C. oncophora* beteiligter CYPs wurden 50000 entscheidete L3 für 24 h in 10 µM IVM-Lösung bei 28 °C und 70 rpm unter Lichtausschluss in einer mit Deckel versehenen Glaspetrischale (Durchmesser: 5 cm) inkubiert. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug dabei 5 ml und setzte sich aus 4,95 ml Larvenmedium mit den darin befindlichen 50000 L3 sowie 50 µl IVM-Lösung (1 mM, gelöst in DMSO) zusammen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der gesamte Ansatz in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, die Glasschale in der die Inkubation stattfand mehrfach mit Larvenmedium gespült und die Flüssigkeit ebenfalls in das 50ml-Zentrifugenröhrchen verbracht. Das 50 ml-Zentrifugenröhrchen wurde mit Larvenmedium aufgefüllt und auf Eis gelagert, um ein Sedimentieren der Larven zu bewirken. Nach erfolgter Sedimentation wurde der Überstand abgenommen und verworfen, das Larvenpellet wurden anschließend der RNA-Isolation zugeführt (3.2.3.1.6).

### **3.2.2.3 Inkubation und Aufarbeitung der *C. oncophora* Isolate mit Makrozyklischen Laktonen für die massenspektrometrische Metabolitdetektion**

Für die Detektion von potentiellen Metaboliten der ML IVM und MOX wurden L3 von *C. oncophora* für 24 h mit IVM bzw. MOX inkubiert. Dabei wurden für die Inkubation mit den ML pro Messung 300000 L3 benötigt (je 100000 L3 für den Kontroll-, den IVM- sowie den MOX-Ansatz). Alle bei diesem Versuch genutzten Glaswaren und Pfropfen wurden vor Verwendung in einer handelsüblichen Laborspülmaschine gewaschen, getrocknet, dann für 24 h in Aqua dest. gespült und erneut getrocknet, um eventuell vorhandene Spülmittelreste zu entfernen.

Insgesamt wurden pro Messung folgende Inkubationen durchgeführt:

- Kontrolle (nur DMSO, kein Wirkstoff) + Larvenmedium
- Kontrolle (nur DMSO, kein Wirkstoff) + *C. oncophora* L3 (homogenisiert)
- IVM 10 µM (gelöst in DMSO) + Larvenmedium
- IVM 10 µM (gelöst in DMSO) + Medium (filtriert)
- IVM 10 µM (gelöst in DMSO) + *C. oncophora* L3 (homogenisiert)
- MOX 5 µM (gelöst in DMSO) + Larvenmedium
- MOX 5 µM (gelöst in DMSO) + Medium (filtriert)
- MOX 5 µM (gelöst in DMSO) + *C. oncophora* L3 (homogenisiert)

Das Larvenmedium wurde einer einzigen Charge entnommen, es wurden Aliquote angefertigt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Larvenmedium wies einen pH von 6,92 auf.

Für den Ansatz „Medium (filtriert)“ wurde der Überstand aus den Zellkulturflaschen nach Sedimentation der L3 genutzt. Da die parasitischen Nematoden nicht unter sterilen Bedingungen kultiviert werden, sollte hiermit überprüft werden, ob im Überstand Mikroorganismen existieren, die ML verstoffwechseln können. Vor Verwendung wurde der Überstand durch einen Laborfilter gegeben um ggf. übrige Nematodenlarven und andere Schwebstoffe herauszufiltern.

Für die Ansätze „*C. oncophora* L3 (homogenisiert)“ wurden insgesamt 300000 der wie in 3.2.2.1 beschrieben aufgereinigten L3 durch Sedimentation in 13 ml Überstand aufgenommen und in einen 15 ml-Handhomogenisator gegeben (pro Ansatz wurden so 100000 homogenisierte L3 eingesetzt). Die Larvensuspension wurde bis zum Erreichen eines Homogenisationsgrades bearbeitet, in dem sich in 5 µl Suspension lichtmikroskopisch keine intakten L3 mehr auffinden ließen. Anschließend wurden 2 ml Larvenmedium hinzugegeben, um eine ausreichende Menge Homogenisat für alle drei Ansätze zu erhalten.



Das Gesamtvolumen der Inkubationsansätze betrug jeweils 5 ml. Diese 5 ml setzten sich zusammen aus 50 µl DMSO (rein oder mit Wirkstoff) und 4,950 ml Larvenmedium/Medium/Wurmhomogenisat.

Die Inkubation erfolgte in mit Deckeln versehenen Glaspetrischalen (Durchmesser: 5 cm) bei 28 °C und 70 rpm unter Lichtausschluss für 24 h. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Ansätze 30 zu 70 in Methanol (reinst) aufgenommen. Dazu wurden pro Ansatz 11 ml Methanol in ein Reagenzglas vorgelegt, der Ansatz hinzupipettiert und die Glaspetrischale mit weiteren 660 µl Methanol gespült. Dieses Methanol wurde dann ebenfalls in das Reagenzglas gegeben, dieses mit einem Latexstopfen verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Bis zur massenspektrometrischen Messung wurden die Proben auf Eis gelagert.

Direkt vor der Messung wurden die Proben mit Medium- oder Wurmhomogenisatsbestandteilen beim Abfüllen in die Messvials je durch eine Glasspritze mit aufgesetztem 0,2 µm-Einwegfilter filtriert (die Spritze wurde nach jedem Filtriervorgang gereinigt, der Filteraufsatz ausgetauscht). Alle anderen Proben wurden unfiltriert in die Vials überführt, die Füllmenge eines Vials betrug je 1 ml.

### **3.2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.3.1 DNA- und RNA-Isolation**

##### **3.2.3.1.1 DNA-Isolation mit Maxwell® 16 System DNA Purification Kit (Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit)**

Dieses Kit wurde verwendet, um DNA aus *C. elegans*-Flüssigkulturen zu isolieren. Das allgemeine Vorgehen war das folgende:

Für jede zu extrahierende Probe wurden 50 ml der Flüssigkultur in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und auf Eis gelagert. Nach dem Sedimentieren der Würmer wurde der Überstand bis auf 5 ml abgenommen und das Röhrchen mit M9-Puffer erneut auf 50 ml aufgefüllt (dies diente der weitgehenden Auswaschung übriger *E. coli* OP50). Nach einem weiteren Sedimentieren auf Eis wurde der Überstand bis auf 0,5 - 1 ml abgenommen und die Würmer in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer einstündigen Lagerung bei -20 °C wurden die Ansätze aufgetaut und für 2 min bei 11000 rpm (11499 xg) zentrifugiert. Anschließend wurde der restliche Überstand abgenommen und das Pellet mit 300 µl Lysis-Puffer und 30 µl Proteinase-K (beides aus dem Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit) überschichtet und nach kurzem Durchmischen auf dem Vortex für 15 min bei 70°C und 400 rpm im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Maxwell-Kartusche wie folgt vorbereitet: Nach Abziehen der Folie wurde ein Plunger in Well 8, die Probe in Well 1 gegeben und die Kartusche in dem Maxwell-Ladetablett eingerastet. In die zugehörige Halterung wurde ein mit

50 µl Elutionspuffer gefülltes 500 µl-Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel gesteckt. Den Anweisungen auf dem Display folgend wurde das „DNA-Blood“-Protokoll gestartet (Run→DNA→Blood). Nach Ablauf des Programmes wurde das 500 µl-Reaktionsgefäß mit der extrahierten DNA entnommen, die gebrauchte Kartusche verworfen und die Konzentration der DNA bestimmt (3.2.3.1.10). Anschließend wurde die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.3.1.2 DNA-Isolation mit Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue XS Kit

Dieses Kit wurde benutzt, um während der Auskreuzung des *C. elegans*-Stammes VC249 DNA aus den F2-Teilpopulationen zu isolieren. Wie in 3.2.1.2.1 beschrieben diente als Ausgang pro Population eine dicht mit Würmern bevölkerte 12 cm-NGM-Agarplatte. Pro Platte wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Platte wurde mit 2 ml M9-Puffer abgespült und der Überstand in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Nach der Sedimentierung der Würmer wurde der Überstand bis auf etwa 300 µl abgenommen und verworfen, das Reaktionsgefäß wurde für 1 h bei -20 °C gelagert und nach Auftauen des Ansatzes für 1 min bei 11000 rpm (11499 xg) zentrifugiert, woraufhin auch der letzte Rest an Überstand entfernt wurde. Mit dem übrig gebliebenen Pellet wurde gemäß der Kit-Anleitung verfahren („Protocol for human or animal tissue“, Genomic DNA from tissue user manual, NucleoSpin® Tissue XS, November 2013 / Rev. 05). Anschließend wurde die Konzentration der DNA bestimmt (3.2.3.1.10) und diese dann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.3.1.3 Plasmid-Isolation mit Biozym EasyPrep Pro Plasmid Miniprep Kit

Dieses Kit wurde verwendet, um Plasmide aus kleinen Kulturvolumen transformierter *E. coli*-Zellen zu gewinnen (3.2.3.7). Die Isolation wurde gemäß dem Kit-Protokoll durchgeführt, ausgehend von 1 ml Flüssigkulturvolumen pro Ansatz. Für die finale Elution der DNA wurden pro Ansatz 30 µl A. dest verwendet. Anschließend wurde die Konzentration der DNA bestimmt (3.2.3.1.10) und diese dann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.3.1.4 Plasmid-Isolation mit Promega PureYield™ Plasmid Midiprep System

Dieses Kit wurde verwendet, um Plasmide aus einem größeren Kulturvolumen transformierter *E. coli*-Zellen zu gewinnen (3.2.3.7), und kam bei der Etablierung des Real-Time-PCR-Verfahrens für die *cyp-14A5*-Expressionsuntersuchung zum Einsatz. Die Isolierung wurde nach dem Kit-Protokoll „DNA Purification by Centrifugation“ (revised 10/13, TM253) durchgeführt, allerdings mussten aufgrund der Verwendung von 200 ml Kulturvolumen pro Ansatz einige Änderungen am Protokoll (ursprünglich ausgelegt auf 50 – 100 ml Kulturvolumen pro Ansatz) durchgeführt werden. So betrug die Menge an eingesetzter Cell Resuspension Solution 6 ml, an Cell Lysis Solution 6 ml und an Neutralisation Solution 10 ml pro Ansatz. Die Columns wurden bei 3000 rpm (1509 xg) für die im Protokoll angegebenen Zeiten zentrifugiert. Ab dem Schritt „Wash“ wurden die Puffermengen wie im Protokoll

angegeben verwendet. Final wurden die Plasmide in 1 ml A. dest aufgenommen. Anschließend wurde die Konzentration der DNA bestimmt (3.2.3.1.10) und diese dann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.3.1.5 RNA-Isolation mit Maxwell® 16 LEV simplyRNA Kit (Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit)

Dieses Kit wurde verwendet, um RNA aus einem adulten, männlichen *H. contortus* sowie einer 50 ml-Flüssigkultur vom *C. elegans* N2-Wildtyp zu isolieren. Die auf Basis dieser RNA synthetisierte cDNA wurde für die Detektion von *cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden mittels PCR mit degenerierten Primern verwendet. Des Weiteren diente die *C. elegans*-N2-RNA als Ausgang für die Amplifikation der für die quantitative qPCR benötigten Referenz- und Zielgenfragmente (3.2.3.9.1).

Alle Arbeiten wurden auf Eis und gemäß des Kit-Protokolls „Purification of Total RNA from Tissue Samples (TM 372, 3/12)“ durchgeführt. Der bis zu seinem Auftauen bei -80 °C gelagerte *H. contortus* wurde zusammen mit 200 µl gekühlter 1-Thioglycerol/Homogenization-Lösung in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit einem sterilen Pistill homogenisiert bis keine Wurmfragmente mehr erkennbar waren. Anschließend wurde für weitere 15 s homogenisiert. Im Falle der *C. elegans*-Flüssigkultur wurden 50 ml in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und bis zur Sedimentation der Würmer auf Eis gelagert. Der Überstand wurde bis auf 5 ml abgenommen und das Zentrifugenröhrchen mit M9-Puffer aufgefüllt. Nach einem weiteren Sedimentationsvorgang auf Eis wurde der Überstand bis auf 0,5 – 1 ml abgenommen und die Würmer in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, für 2 min bei 11000 rpm (11499 ×g) zentrifugiert und anschließend der restliche Überstand abgenommen. Das resultierte Wurmpellet wurde mit 200 µl gekühlter 1-Thioglycerol/Homogenization-Lösung vermengt und die Würmer mit einem sterilen Pistill für 1,5 min homogenisiert.

Von beiden Homogenisaten wurden je 200 µl mit je 200 µl Lysis Buffer versetzt, auf dem Vortex durchmischt und dann gemäß den Angaben des Protokolls in die vorbereiteten Kartuschen (unter Verwendung von je 5 µl DNase) gegeben und diese in das Maxwell-Ladetablett eingerastet. Eluiert wurde in 50 µl Nuklease-freiem Wasser. Durch Auswahl des „SimplyRNA“-Programms (Run→RNA→SimplyRNA) wurde die RNA-Isolation gestartet. Nach Ablauf des Programmes wurden die 500 µl-Reaktionsgefäß mit der extrahierten RNA entnommen, die gebrauchten Kartuschen verworfen und die RNA-Konzentrationen bestimmt (3.2.3.1.10). Anschließend wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.3.1.6 RNA-Isolation mit Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA Kit

Dieses Kit wurde benutzt, um RNA aus entwickelten, mit IVM inkubierten *C. oncophora* L3 zu isolieren, dies geschah im Rahmen der Detektion von *cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden mittels PCR mit degenerierten Primern (3.2.2.2).

Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Die Larven wurden in 600 µl RA1-Puffer aufgenommen und in ein mit Keramik-Beads (0,4 - 0,6 mm) versehenes 2 ml Reaktionsgefäß (innuSPEED Lysis Tube S) überführt. In einem SpeedMill-Homogenisator fand ein erster Homogenisationsschritt unter Verwendung des „plant soft“-Protokolls statt, anschließend wurden dem Ansatz 12 µl Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) hinzugegeben und erneut das „soft plant“-Protokoll ausgeführt. Die weiteren Schritte der RNA-Isolation wurden gemäß dem Kit-Protokoll „RNA purification from cultures cells and tissue (05/2014, Rev.16)“ durchgeführt (ab Schritt 3 „filtrate lysate“). Einzig bei Schritt 4 („adjust RNA binding conditions“) wurden 600 µl anstatt der angegebenen 350 µl Ethanol (70%) verwendet. Eluiert wurde final in 60 µl RNase-freiem Wasser. Anschließend wurde die Konzentration der RNA bestimmt (3.2.3.1.10) und diese dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.3.1.7 RNA-Isolation mit Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA XS Kit

Dieses Kit wurde verwendet, um RNA aus kleinen *C. elegans*-Populationen zu isolieren, wie es im Rahmen der *cyp-14A5*-Expressionsuntersuchung nötig war (3.2.1.4).

Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Das Aufschließen der sedimentierten Würmer wurde mittels einer Speedmill (Analytik Jena) durchgeführt. Hierzu wurden pro Probe die Würmer in 200 µl RA1-Puffer und 4 µl TCEP aufgenommen und in ein mit Keramik-Beads (0,4 - 0,6 mm) versehenes 2 ml Reaktionsgefäß (innuSPEED Lysis Tube S) überführt. Eine Homogenisierung der Würmer wurde durch das einminütige Aktivieren des Speedmill-Programms „plant soft“ erreicht. Die weitere RNA-Isolierung wurde gemäß dem Kit-Protokoll „RNA purification from tissue (03 / 2013, Rev. 07)“ ab Schritt 3 („add carrier RNA“) inklusive dem optionalen Schritt 4 („filtrate lysate“) durchgeführt. Eluiert wurde final in je 12 µl RNase-freiem Wasser. Anschließend wurde die Konzentration der RNA bestimmt (3.2.3.1.10) und diese dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.3.1.8 DNA-Extraktion aus Agarosegel mit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit

Um PCR-Fragmente für eine Klonierung oder Reamplifikation aus einem Agarosegel zu isolieren, wurde dieses Kit benutzt.

Die Extraktion wurde gemäß dem Kit-Protokoll (Version 1.2.0) durchgeführt. Die Menge an verwendetem Elution-Puffer variierte und wurde der entsprechenden Versuchssituation angepasst. Anschließend wurde ggf. die Konzentration der DNA bestimmt (3.2.3.1.10) und diese dann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.3.1.9 Aufreinigung von DNA mit Zymo Research DNA Clean & Concentrator™-5 Kit

Dieses Kit wurde benutzt, um DNA aufzukonzentrieren. Benutzt wurde es gemäß dem Kit-Protokoll (Version 1.2.1), eluiert wurde in 6 µl Elution-Buffer. Anschließend wurde ggf. die Konzentration der DNA bestimmt (3.2.3.1.10) und diese dann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.3.1.10 DNA/RNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde photometrisch mit Hilfe eines Epoch™ Spektralphotometers der Firma Biotek gemessen. Vor der Messung der eigentlichen DNA- oder RNA-Proben wurde zur Bestimmung des Nullwertes je 2 µl des jeweiligen Elutionsmediums auf zwei Messfelder der Take3 Mikro-Volumen-Platte gegeben und im Spektralphotometer mit Hilfe der „Gen5™ Datenanalyse-Software“ als „blank“ gemessen. Das Messen der eigentlichen DNA-/RNA-Probe erfolgte ebenfalls im 2 µl-Doppelansatz. Vor, zwischen und nach Beendigung der Messungen wurden der Messfeldbereich sowie die korrespondierende Glasfläche der Mikro-Volumen-Platte mit Linsenpapier gereinigt. Die gemessenen Konzentrationen konnten in einer Exceltabelle ausgegeben, gespeichert und gedruckt werden.

### 3.2.3.2 cDNA-Synthese

#### 3.2.3.2.1 cDNA-Synthese mittels Thermo Scientific Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit

Dieses Kit wurde benutzt, um cDNA aus der RNA von mit IVM inkubierten *C. oncophora*-L3 zu synthetisieren. Die so hergestellte cDNA wurde bei der Detektion von *cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden mittels PCR mit degenerierten Primern (3.2.2.2) eingesetzt. Da die in diesem Kit enthaltene reverse Transkriptase keine RNase H Aktivität aufweist, findet kein Abbau von RNA im RNA-DNA-Heteroduplex ab, weswegen eine große Ausbeute an vollständiger cDNA auch langer RNA-Templates erzielt werden kann.

Die Synthese wurde gemäß dem Kit-Protokoll „RT-PCR“ (Rev.6) unter Verwendung der „random hexamer primer“ durchgeführt. Nach Beendigung der Synthese wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.3.2.2 cDNA-Synthese mittels Qiagen QuantiTect® Reverse Transcription Kit

Dieses Kit wurde im Rahmen der *cyp-14A5*-Expressionsuntersuchung (3.2.1.4) benutzt, um cDNA für die Untersuchung mittels quantitativer Real-Time-PCR zu gewinnen. Die in diesem Kit verwendete Reverse Transkriptase (RT) zeichnet sich durch RNase H Aktivität aus. Bedingt durch diese Eigenschaft verdaut die Reverse Transkriptase den RNA-Bestandteil in DNA-RNA-Heteroduplexen (etwa die Template-RNA während der Erststrang-cDNA-Synthese),

macht so einen weiteren Verdau mit RNase H unnötig und erhöht nach Herstellerangaben die Sensitivität der nachfolgenden quantitativen Real-Time-PCR.

Die cDNA-Synthese wurde gemäß dem Kit-Protokoll „QuantiTect Reverse Transcription Handbook (03/2009)“ durchgeführt, pro Ansatz wurden 50 ng RNA eingesetzt (die RNA aus 3.2.3.1.7 wurde derart verdünnt, dass die 50 ng RNA in 12 µl A. dest gelöst waren). Für die „Minus-R(everse)T(ranskriptase)“-Kontrollen wurde die Reverse Transkriptase im „reverse transcription master mix“ durch A. dest ersetzt.

Die erhaltenen cDNAs und –RT-Kontrollen wurden mit je 5 µl A. dest versetzt um ein für den gesamten Versuch ausreichendes Volumen zu erhalten und bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.3.2.3 cDNA-Synthese mittels Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

Dieses Kit wurde benutzt, um im Rahmen der Detektion von *cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden mittels PCR mit degenerierten Primern cDNA aus der RNA des adulten *H. contortus* und des *C. elegans*-N2-Wildtyps (3.2.3.1.5) zu synthetisieren. Die cDNA-Synthese wurde gemäß dem Kit-Protokoll „First Strand cDNA Synthesis (Rev.11)“ durchgeführt. Nach Beendigung der Synthese wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

### 3.2.3.3 Konventionelle PCR-Methoden

#### 3.2.3.3.1 PCR unter Verwendung von Invitrogen AccuPrime™ Taq DNA Polymerase

Die AccuPrime™ Taq DNA Polymerase wurde für die PCR mit degenerierten Primern im Rahmen der Detektion von *cyp-14A*-homologen Genen (3.2.2.2) genutzt. Besondere Merkmale dieser Polymerase sind eine durch anti-Taq-DNA-Polymerase-Antikörper gesicherte Hot-Start-Eigenschaft, eine durch ein „accessory protein“ unterstützte Primer-Template-Bindung sowie die Produktion eines 3'-A-Überhanges am Ende des PCR-Produktes (Sticky End) (Angaben gemäß Invitrogen™ life technologies). Die PCR-Reaktion wurde mit dem AccuPrime™ SuperMix I (optimiert für die Verwendung von cDNA-Templates) durchgeführt.

Ein 25 µl-Einzelansatz setzte sich folgendermaßen zusammen, aufgrund der Verwendung von degenerierten Primern wurde mit einer Primerendkonzentration von je 10 µM gearbeitet:

10x Accuprime PCR Buffer I:	2,5 µl
Sense Primer (50µM!):	5 µl
Antisense Primer (50µM!):	5 µl
Template-cDNA:	1 µl
AccuPrime Taq:	0,5 µl
Water, nuclease-free:	11 µl

Die PCR-Reaktion wurde in einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) durchgeführt,

Initiale Denaturierung	94 °C; 0:15min
Denaturierung	94 °C; 0:15min
Primerhybridisierung	50 °C; 0:30min
Elongation	68 °C; 0:30 - 1:30 min
Anzahl Zyklen:	35

Wegen der Verwendung degenerierter Primer wurde für alle Primerkombinationen eine Hybridisierungstemperatur von 50 °C verwendet. Die genauen Elongationszeiten der verschiedenen Primerkombinationen sind Kapitel 3.1.5.1 zu entnehmen.

### 3.2.3.3.2 PCR unter Verwendung von Thermo Scientific Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase

Die Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase wurde verwendet, um im Rahmen der Etablierung der quantitativen Real-Time-PCR für die *cyp-14A5*-Expressionsuntersuchung (3.2.3.9.1) die Fragmente der Ziel-/Referenzgene zu amplifizieren. Des Weiteren wurde sie zur Überprüfung der *C. elegans*-CYP-Deletionsmutanten genutzt. Die Polymerase produziert einen 3'-A-Überhang am Ende des PCR-Produktes (Sticky End).

Ein 25µl-Einzelansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10x Maxima Hot Start Taq buffer	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM each)	0,5 µl
Forward primer (10 µM)	0,75 µl
Reverse primer (10 µM)	0,75 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5 µl
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (5 u/µl)	0,2 µl
Water (nuclease-free)	16,8 µl
Template DNA	1 µl

Die PCR-Reaktion wurde in einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) durchgeführt.

Initiale Denaturation	95 °C; 4 min
Denaturation	95 °C; 1 min
Primerhybridisierung	X °C; 1 min
Elongation	72 °C; x min
Finale Elongation:	72 °C; 5 min
Anzahl Zyklen	40

Die Primersequenzen sowie die Hybridisierungstemperaturen und Elongationszeiten der verschiedenen Primerkombinationen sind den Kapiteln 3.1.5.2 und 3.1.5.3 zu entnehmen.

### 3.2.3.3.3 PCR unter Verwendung von Thermo Scientific Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase

Die Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase wurde bei der Analyse der Auskreuzung der *cyp-14A5*-Deletionsmutation in den *C. elegans* Bristol-N2-Wildtyp (3.2.1.3) verwendet sowie bei der Modifikation von DNA-Fragmenten, indem Sticky- zu Blunt-Ends aufgefüllt wurden. Letzteres geschah im Rahmen der zur Detektion von *cyp-14A*-homologen Genen in *C. oncophora* mittels PCR mit degenerierten Primern (3.2.2.2) gehörigen Klonierung (3.2.3.7.1). Die Polymerase verfügt über eine DNA-bindenden Domäne, die dem Enzym hohe Prozessivität verleiht und die Amplifikation auch schwieriger Templates ermöglicht. Weitere besondere Merkmale sind eine hohe Toleranz gegenüber PCR-Inhibitoren und eine Hot Start Eigenschaft, die auf dem Vorhandensein eines reversibel gebundenen spezifischen Affibody™ Liganden beruht, der die Enzymaktivität bei Raumtemperatur hemmt und erst bei Reaktionstemperatur abgespalten wird (Angaben gemäß Thermo Scientific). Die Polymerase produziert keinen Überhang am Ende des PCR-Produktes (Blunt End).

Ein 20 µl-Einzelansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

5x Phusion HF Buffer	4µl
dNTP Mix (10 mM each)	0,4 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl
Reverse primer (10 µM)	1 µl
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
Template DNA	2 µl
Water, nuclease-free	11,1 µl

Die PCR-Reaktion wurde in einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) durchgeführt.

Initiale Denaturation	98 °C; 30 s
Denaturation	98 °C; 10 s
Primerhybridisierung	X °C; 20 s
Elongation	72 °C; x min
Finale Elongation	72 °C; 7min
Anzahl Zyklen	35

Die Primersequenzen sowie die Hybridisierungstemperaturen und Elongationszeiten der verschiedenen Primerkombinationen sind Kapitel 3.1.5.4 zu entnehmen



Zum Auffüllen der Sticky- zu Blunt-Ends bei PCR-Fragmenten wurde folgendes Protokoll verwendet (20 µl gesamt):

5x Phusion HF Buffer	4 µl
dNTP Mix (10 mM each)	0,4 µl
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
Template DNA	10 µl
Water, nuclease-free	5,1 µl

Der Ansatz wurde für 30 min bei 72 °C in einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) inkubiert.

### 3.2.3.4 Gelelektrophorese

#### 3.2.3.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Um die der PCR entstammenden DNA-Fragmente ihrer Länge nach aufzutrennen und sichtbar zu machen, kam elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel unter Zuhilfenahme eines die DNA bindenden und unter UV-Licht leuchtenden Farbstoffes zur Anwendung. DNA ist aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladen und bewegt sich in wässriger Lösung bei anliegendem elektrischem Spannungsfeld in Richtung der positiv geladenen Anode. Das Agarosegel – hergestellt aus Agarose aufgeköcht in TAE-Puffer – bewirkt dabei das Auftrennen der DNA-Fragmente, da sich während des Abkühlvorganges Poren im Gel bilden, die kleinere DNA-Fragmente weniger stark zurückhalten als größere. Es erfolgt eine Auftrennung der Fragmente nach Größe. Die Größe der Poren ist dabei von der Konzentration der Agarose im Gel anhängig (je höher die Konzentration, desto kleiner die Poren). Kleinere Poren ermöglichen die Auftrennung kleiner Fragmente; in den durchgeführten Arbeiten kamen 1 – 2%ige Gele zum Einsatz.

Zum Anfärben der DNA-Fragmente wurde die Agarose/TAE-Lösung bei einer Temperatur von 65 °C mit dem Farbstoff GR Green versetzt (0,1 µl/ml Agarose/TAE-Lösung), anschließend in einen abgedichteten Gelschlitten gegossen und dieser mit einem Kamm mit der gewünschten Anzahl an Zinken versehen. Nach dem Aushärten des Gels wurde der Schlitten mitsamt Geld und Kamm in die Gelkammer gestellt, mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm vorsichtig entfernt. Die PCR-Proben wurden ggf. mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt, auf jeden Fall aber im Verhältnis 6:1 mit 6x-Ladepuffer vermengt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Neben den PCR-Proben inkl. der Negativ- und ev. Positivkontrollen wurde ein definierter DNA-Größenstandard aufgetragen, der ein späteres Bewerten der DNA-Fragmentgrößen ermöglichte. Nach der Beladung des Gels wurde die Gelkammer geschlossen und an eine Gleichspannungsquelle angeschlossen. Die angelegte Spannung war anhängig von der Größe der Kammer und damit des verwendeten Gels und betrug 3 - 4

V/cm Elektrodenabstand. Durch den Ladepuffer konnte der Fortschritt der Elektrophorese mit bloßem Auge verfolgt werden, sobald die Lauffront die gewünschte Strecke zurückgelegt hatte, wurde die Stromquelle ausgeschaltet und das Gel mittels eines Transilluminators betrachtet. Dabei wird das Gel mit UV-Licht bestrahlt, das den an die DNA gebundenen Farbstoff anregt und sichtbar macht. Die Auswertung wurde mittels der Software Gene Snap durchgeführt.

#### 3.2.3.6 Ausschneiden von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Sollten PCR-Produkte für weitere Bearbeitung gewonnen werden, wurde das Gel auf einen Blaulichtfilter und dieser wiederum auf den Transilluminator gelegt. Bei aktiviertem UV-Licht wurde die entsprechende Bande mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß verbracht. Für weitere Banden wurden jeweils neue Klingen und 1,5 ml-Reaktionsgefäße verwendet. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück wurde gemäß 3.2.3.1.8 durchgeführt.

### 3.2.3.7 Klonierung

#### 3.2.3.7.1 Agilent Technologies StrataClone Blunt PCR Cloning Kit

Dieses Kit wurde verwendet, um im Rahmen der Detektion von *cyp-14A*-homologen Genen in ML-induzierten *C. oncophora* L3 (3.2.2.2) die per PCR mit degenerierten Primern gewonnenen PCR-Fragmente zu klonieren und anschließend sequenzieren zu lassen. Beim StrataClone Blunt PCR Cloning Kit wird der spätere zirkuläre Vektor aus zwei linearen DNA-Vektorsträngen gebildet. Beide Stränge tragen an je einer Seite ein Blunt End mit gebundenem Topoisomerase-I-Enzym und an der anderen Seite eine *loxP*-Erkennungssequenz, unterscheiden sich aber in der Ausstattung mit *ori*- oder Resistenzgensequenz. Das Blunt-End-PCR-Produkt wird von beiden Seiten von je einem DNA-Vektorstrang kovalent gebunden (vermittelt durch die Topoisomerase I). Das lineare Vektorarm<sup>ori</sup>-PCR-Produkt-Vektorarm<sup>Resistenzgen</sup>-Konstrukt wird in die *cre*-Rekombinase exprimierenden, kompetenten Bakterienzellen transformiert, in denen es durch die Cre-Rekombinase zirkularisiert und anschließend durch die Zellmaschinerie vervielfacht wird (Angaben gemäß Hersteller).

Da die PCR mit der AccuPrime™ Taq DNA Polymerase durchgeführt wurde, mussten die Sticky Ends der Fragmente erst zu Blunt Ends aufgefüllt werden (3.2.3.3.3). Dies war nötig, da anfängliche Versuche die Fragmente mit einem für Sticky Ends designten Kit zu klonieren keinen Erfolg brachten.

Die Klonierung wurde gemäß dem Kit-Protokoll „StrataClone Blunt PCR Cloning Kit (Revision B.02)“ durchgeführt, einzig die Inkubationsdauer des Ligationsansatzes auf Eis wurde von 5 auf 30 min ausgedehnt. Die Inkubationsdauer des Transformationsansatzes in LB-Medium betrug 1:45 h. Kanamycin diente als Selektionsantibiotikum und wurde in einer

Endkonzentration von 0,1 g/ml den LB-Agarplatten hinzugegeben. Der Transformationsansatz wurde auf zwei Agarplatten verteilt, so dass 10 % auf der einen und 90 % auf der anderen ausplattiert wurden.

Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden in 7 ml LB-Medium mit Kanamycin (Endkonzentration: 0,1 g/ml) aufgenommen, über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Brutschrank inkubiert und später der Plasmid-Isolation zugeführt (3.2.3.1.3).

#### 3.2.3.7.2 Agilent Technologies StrataClone PCR Cloning Kit

Dieses Kit diente der Klonierung der Referenzgensequenzen im Rahmen der Etablierung der quantitativen Real-Time-PCR für die *cyp-14A5*-Expressionsuntersuchung. Die Funktionsweise des Kits ist analog zu dem des Agilent Technologies StrataClone Blunt PCR Cloning Kit (3.2.3.7.1), einzig die Insertschnittstelle mit der Topoisomerase I unterscheidet sich. Das vorliegende Kit weist dort einen modifizierten Uridin-Überhang und damit ein Sticky End auf, das sich mit einem 3'-Adenosin-Überhang des Inserts verbinden kann.

Die Klonierung der Referenzgenfragmente (erzeugt mittels Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, daher mit Sticky Ends versehen) wurde nach dem Kit-Protokoll „StrataClone PCR Cloning Kit (Revision B.02)“ durchgeführt. Die Inkubationsdauer des Transformationsansatzes in LB-Medium betrug 2 h und es wurde Kanamycin (Endkonzentration: 0,1 g/ml) als Selektionsantibiotikum in den LB-Agar-Platten verwendet. Der Transformationsansatz wurde auf zwei Agarplatten verteilt, so dass 10 % auf der einen und 90 % auf der anderen ausplattiert wurden. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden in 5 ml LB-Medium mit Kanamycin (Endkonzentration: 0,1 g/ml) aufgenommen, über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Brutschrank inkubiert und später der Plasmid-Isolation zugeführt (3.2.3.1.3)

#### 3.2.3.7.3 Invitrogen™ TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing, with One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*

Dieses Kit wurde verwendet, um im Rahmen der Detektion von *cyp-14A*-homologen Genen in nicht-induzierten *C. oncophora* L3 die per PCR mit degenerierten Primern gewonnenen PCR-Fragmente zu klonieren. Der in diesem Kit verwendete Vektor liegt linearisiert vor und verfügt über mit je einem Topoisomerase-I-Enzym versehene Sticky Ends. Diese weisen 3'-Thymidin-Überhänge auf. Des Weiteren verfügt der Vektor über Ampicillin- und Kanamycinresistenzgene.

Die Klonierung der Fragmente (gewonnen mittels AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, daher mit Sticky Ends versehen) wurden gemäß dem Kit-Protokoll „TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (Revision A.0)“ durchgeführt. Da zur Transformation One Shot® TOP10 –Zellen verwendet wurde, kam hierbei das Protokoll „Transform One Shot® TOP10 and DH5α™-T1R

competent cells“ zum Einsatz. Als Selektionsantibiotikum wurde Kanamycin verwendet und zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml dem LB-Agar hinzugegeben.

Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden in 5 ml LB-Medium mit Kanamycin (Endkonzentration: 50 µg/ml) aufgenommen, über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Brutschrank inkubiert und später der Plasmid-Isolation zugeführt (3.2.3.1.3)

#### 3.2.3.7.4 Restriktionsverdau

Zur Überprüfung von Plasmidinserts wurde Restriktionsverdau angewandt. Hierbei kam ausschließlich das Enzym EcoRI zur Anwendung. Der Verdau erfolgte dabei nach Herstellerangaben für 1 h bei 37 °C.

#### 3.2.3.7.5 Anlage von Bacto-Stocks

Um Bakterienkulturen langfristig bei -80 °C lagern zu können, wurden Bacto-Stocks aus Flüssigkulturen hergestellt. Dazu wurde 1 ml Übernachtskultur der entsprechenden Bakterienkultur (in LB-Medium) und 1 ml Glycerol in einem 2 ml-Schraubdeckelgefäß vermengt, gründlich auf dem Vortex durchmischt und nach zweistündiger Lagerung auf Eis bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.3.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von den Firmen GATC Biotech sowie LGC Genomics GmbH durchgeführt.

#### 3.2.3.9 Quantitative Real-Time-PCR

##### 3.2.3.9.1 Vorarbeiten

Um die Expression des *cyp-14A5*-Gens im *C. elegans*-Bristol-N2-Wildtypstamm unter Einwirkung von IVM und MOX untersuchen zu können, musste in Vorarbeit die entsprechende Real-Time-PCR etabliert werden. Um verlässliche Aussagen über die Expression des Zielgens tätigen zu können, wurden vier Referenzgene für *C. elegans* aus der Literatur ausgewählt. Dies sind Gene, deren Expression – im optimalen Fall – unabhängig von versuchsbedingt geänderten Faktoren auf gleichem Niveau bleibt und so die Berechnung der Expressionsänderung des Zielgens ermöglichen. Die verwendeten Primersequenzen, Referenzgene, Fragmentlängen und Literaturquellen sind in Kapitel 3.1.5.2 angegeben. Die Primer für das *cyp-14A5*-Zielgen wurden unter Zuhilfenahme der Software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) erstellt.

Die Referenzgenfragmente sowie das *cyp-14A5*-Zielgenfragment wurden per PCR amplifiziert (3.2.3.3.2), als Template diente dabei cDNA, die aus *C. elegans*-N2-RNA (3.2.3.1.5) synthetisiert worden war (3.2.3.2.1). Anfangs wurde eine Temperaturgradienten-PCR mit acht Hybridisierungstemperaturen zwischen 50 – 60 °C durchgeführt. Pro Gen wurden drei bis vier

deutliche Banden verschiedener Hybridisierungstemperaturen aus dem Gel ausgeschnitten (3.2.3.6), gepoolt, aufgereinigt (3.2.3.1.8) und anschließend kloniert (3.2.3.7.2). Jeweils vier Transformanten wurden in Flüssigkultur gebracht, nach vollzogener Plasmidisolierung (3.2.3.1.3) wurden diese erneut per PCR untersucht. Die hierbei verwendeten Hybridisierungstemperaturen sind Kapitel 3.1.5.1 zu entnehmen. Auf den Ergebnissen der PCR beruhend wurde für jedes Referenzgen ein Plasmidpool ausgewählt und die Identität eines Inserts per Sequenzierung (3.2.3.8) bestätigt.

Um ausreichende Mengen an Plasmiden zu erhalten, wurde für jedes zu untersuchende Gen eine 200 ml Flüssigkultur (LB-Medium, versetzt mit Kanamycin (0,1 g/ml)) mit den entsprechenden Transformanten angelegt. Nach einem Übernachtwachstum bei 37 °C und 200 rpm Schüttelbewegung wurden Midipreparationen (3.2.3.1.4) zur Isolation der Plasmide durchgeführt. Die DNA-Konzentration der isolierten Plasmide wurde ermittelt (3.2.3.1.10) und gemäß der Website <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> die Kopienanzahl pro Mikroliter berechnet. Das Template setzte sich dabei aus dem Vector (4300 bp) und dem entsprechenden Insert zusammen.

Um die zusammengehörigen qPCR-Durchläufe der drei biologischen Replikate zusammenzufassen und somit kombiniert bewerten zu können, musste ein Standard aus *C. elegans*-cDNA mituntersucht werden. Dieser Standard ergab für die einzelnen untersuchten Gene reproduzierbare cp-Werte und ermöglichte so ein Abgleichen. Der sog. cDNA-Mix bestand aus einem gepoolten Ansatz von cDNA, die wie unter 3.2.3.2.1 beschrieben aus den RNAs eines ersten IVM-/MOX-Inkubationsansatzes mit dem *C. elegans*-Bristol-N2-Wildtyp (3.2.1.4) generiert wurde.

Die cDNA sowie die „Minus-R(verse)T(ranskriptase)“-Kontrollen der *C. elegans*-N2-Wildtyp-Inkubationsansätze wurden wie in Kapitel 3.2.3.2.2 beschrieben generiert.

#### 3.2.3.9.2 Etablierung und Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR unter Verwendung von Promega GoTaq® qPCR Master Mix

Zur quantitativen Untersuchung der Expression des *cyp-14A5*-Gens mussten verschiedene Proben, Standards und Kontrollen in der Real-Time-PCR untersucht werden. Als Proben wurde die cDNA der drei Inkubationsansätze (*C. elegans* N2-Wildtyp mit DMSO/IVM/MOX (3.2.1.4), jeweils in drei technischen Replikaten) verwendet. Die Proben wurden in Doppelansätzen untersucht.

Als Standards dienten sowohl ein Gradient der Plasmide, die das Fragment des zu untersuchenden Gens trugen (*cyp-14A5*- oder Referenzgen) als auch der *C. elegans*-cDNA-Mix. Der Plasmidgradient umfasste acht Verdünnungsstufen von  $4 \times 10^7$  bis  $4 \times 10^0$  Plasmidkopien pro Mikroliter und diente zur Erstellung der Standardkurve. Die einzelnen

Verdünnungsstufen wurden in Doppelansätzen untersucht. Der cDNA-Mix wurde im Doppelansatz untersucht.

Als Kontrollen dienten die „Minus-RT“-Kontrollen (3.2.3.2.2) der Inkubationsansätze sowie „No-Template“-Kontrollen. Die „Minus-RT“-Kontrollen dienten der Überprüfung der der cDNA-Synthese zugrundeliegenden RNA auf mögliche DNA-Verunreinigungen. Die „No-Template“-Kontrollen, bei denen das DNA-Template durch A. dest ersetzt wurde, wurden durchgeführt, um den Real-Time-PCR-Ansatz auf mögliche DNA-Verunreinigungen zu untersuchen. Die „Minus-RT“-Kontrollen wurden im Einzel-, die „No-Template“-Kontrollen im Doppelansatz untersucht.

Ein 25 µl-Einzelansatz setzte sich wie folgt zusammen:

GoTaq® qPCR Master Mix, 2x	12,5 µl
Forward primer (10 µM)	0,75 µl
Reverse primer (10 µM)	0,75 µl
Water, nuclease-free	9 µl
Template DNA	2 µl

Erste Vorversuche mit dem Promega GoTaq® qPCR Master Mix ergaben eine optimale Hybridisierungstemperatur von 62 °C und eine Elongationstemperatur von 72 °C. Final wurde folgendes Protokoll verwendet:

Initiale Denaturation	95°C	2min
Denaturation	95°C	0:15min
Primerhybridisierung	62°C	0:30min
Elongation	72°C	0:30min
+ Schmelzkurzenanalyse		

Die qPCR über 40 Zyklen mit anschließender Schmelzkurvenanalyse wurde in einem Biorad CFX96 Thermal Cycler durchgeführt. Die Ansteuerung des Cyclers sowie die Auswertung der gewonnenen Daten geschah dabei über die Software Bio-Rad CFX Manager 2.0.

### 3.2.4 Massenspektrometrische Methoden

Zur Identifizierung der in den „*C. oncophora* mit ML“-Inkubationsansätzen (3.2.2.3) vorhandenen Massen (und damit eventuellen Metaboliten) wurde eine Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit anschließender Detektion mittels hochauflösender Massenspektrometrie (LC-HRMS) durchgeführt. Verwendet wurde hierzu ein LC-MS-System der Firma Thermo Scientific bestehend aus Autosampler (HTS PAL), Pumpe mit Degasser (Accela 1250 Pump) und Säulenofen (MayLab MistraSwitch) mit

nachgeschaltetem hochauflösendem Massenspektrometer (Exactive Orbitrap). Die Ionisation erfolgte mittels Elektrospray (ESI) im positiven Modus. Für die Chromatographie wurde eine Hypersil GOLD Säule (3 µm, 150 × 2.1 mm, Thermo Scientific) verwendet, die Temperatur des Säulenofens betrug 30 °C. Es wurde eine Gradiententrennung angewendet, deren Details Tabelle 10 zu entnehmen sind. Der Messbereich der massenspektrometrischen Messungen betrug 160 – 1050 m/z.

Die LC-HRMS-Analysen wurden in Kooperation mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin, Abteilung: Sicherheit in der Nahrungskette, Fachgruppe 81: Rückstände durchgeführt.

**Tabelle 10: Verlauf der Gradiententrennung (Dauer: 13 min; Eluent A: Wasser + 5 mM CH<sub>3</sub>COOH, Eluent B: Methanol + 5 mM CH<sub>3</sub>COOH)**

Nr	Zeit [min]	Anteil Eluent A (%)	Anteil Eluent B (%)	Flußrate (µl/min)
0	00:00	30	70	300
1	05:00	3	97	300
2	08:00	3	97	300
3	08:10	30	70	300
4	13:00	30	70	300

### 3.2.5 Bioinformatische Methoden

#### 3.2.5.1 Sammlung der CYP-Sequenzen

Um eine vollständige Liste der Sequenzen aller bekannten CYP-Gene von *C. elegans* zu erstellen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Ausgehend von einer beliebigen *C. elegans*-CYP-AA-Sequenz (bezogen von der Website [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org) mit dem Suchbegriff „CYP-“) wurde ein Protein-Blast durchgeführt. Durch Bestätigung der Schaltfläche unter „Show Conserved Domains“ auf der Ergebnisseite wurde die verlinkte „Conserved domains“-Website aufgerufen. Auf dieser wurde durch Betätigung des zum „p450“-Eintrag (in der „List of domain hits“) gehörigen Accessionlinks eine neue Website mit dem PFAM-Eintrag „pfam00067“ (für „Cytochrome P450“) aufgerufen. Dort konnte unter der Option „Links/Related Protein“ eine Liste aller in der Datenbank hinterlegten CYP-Sequenzen aufgerufen werden. Durch Anwendung der Filter „Species“ (gesetzt auf „*C. elegans*“) und „Source databases“ (gesetzt auf „RefSeq“) wurde die Auswahl auf die Referenzsequenzen der *C. elegans*-CYPs eingeschränkt (Stand 03.03.2011).

Für die so gesammelten CYP-Proteine wurden die ungesplitten und gesplitten DNA-Sequenzen sowie die AA-Sequenzen von [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org) bezogen. Im Falle verschiedener Isoformen eines CYPs wurde die längste Sequenz ausgewählt.

Zur genaueren Überprüfung der einzelnen CYPs wurden die jeweiligen AA-Sequenzen einem Interproscan (Jones, Binns et al. 2014) unterzogen (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>), dort werden u.a. Aussagen zur Klassifizierung der Proteine in Familien, Klassen und Gruppen getätigt.

### **3.2.5.2 Sequenzalignment, phylogenetische Berechnung und Darstellung des phylogenetischen Baumes**

Das Alignment von DNA- oder AA-Sequenzen wurde mit der Software ClustalX2 durchgeführt. Die zu alignenden Sequenzen wurden im FASTA-Format in einer gemeinsamen Textdatei gespeichert und in ClustalX2 eingelesen. Als Ausgabeformat wurde unter dem Reiter „Alignment“ und dem Optionsmenü „Output Format Options“ das PHYLIP-Format gewählt. Unter demselben Reiter wurde die Berechnung durch Betätigung der Schaltfläche „Do Complete Alignment“ gestartet.

Für die Berechnung der phylogenetischen Bäume auf Grundlage der alignierten Sequenzen wurde das Programm PhyML verwendet (Guindon, Dufayard et al. 2010), das auf Grundlage der Maximum Likelihood Methode arbeitet. Nachdem das Alignment eingelesen wurde, wurden folgende Parameter festgelegt:

- Data type: AA oder DNA
- Proportion of invariable sites: estimated
- One category of substitution rate: no (4)
- Gamma distribution parameter: estimated

Für die restlichen Parameter galten die Standardeinstellungen.

Nach Abschluß der Berechnung wurde der phylogenetische Baum mit dem Programm MEGA (Version 5) visualisiert. Über den Reiter „User Tree“ und die Option „Edit/Draw Tree (Manually)“ kann die Ergebnisdatei aus PhyML („\*\_phyml\_tree.txt“) über die Auswahl „From a file“ eingelesen werden (im Menü „Öffnen“: Dateityp: „all files“ auswählen). Der Baum kann dann im Newick-Format abgespeichert werden, dieses mit dem „Tree Explorer“-Tool von MEGA geöffnet und der Baum weiter analysiert werden.



### 3.2.5.3 Berechnung möglicher Ivermectin-/Moxidectinmetabolite

#### 3.2.5.3.1 Das SMILES-Dateiformat

Für die bioinformatische Prozessierung der beiden IVM- und des MOX-Moleküls mussten die Summenformel- und Strukturinformationen der jeweiligen Verbindungen in geeigneten Dateiformaten gespeichert werden. Geeignet dafür ist das sog. SMILES-Format, dieses steht für "Simplified molecular-input line-entry system" und stellt ein Datenformat da, das die Summen- und Valenzstrichformel einer chemischen Verbindung speichert. Über die dreidimensionale Anordnung der Molekülbestandteile zueinander sind keine Informationen verfügbar. Aus der Datenbank Chemspider (<http://www.chemspider.com/>) wurden die SMILES-Codes der drei Verbindungen bezogen:

#### IVM H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> (ChemSpider ID16736314)

SMILES:

```
CC[C@H](C)[C@@H]1[C@H](CC[C@@]2(O1)C[C@@H]3C[C@H](O2)C/C=C/[C@H]([C@H]/C=C/C=C/4\CO[C@H]5[C@@]4([C@@H](C=C([C@H]5O)C)C(=O)O3)O)C)[C@H]6[C@@H]([C@H]([C@@H](O6)C)O[C@H]7C[C@@H]([C@H]([C@@H](O7)C)O)OC)OC)\C)C
```

#### IVM H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub> (ChemSpider ID16736315)

SMILES:

```
C[C@H]1CC[C@]2(C[C@@H]3C[C@H](O2)C/C=C/[C@H]([C@H]/C=C/C=C/4\CO[C@H]5[C@@]4([C@@H](C=C([C@H]5O)C)C(=O)O3)O)C)O[C@H]6C[C@@H]([C@H]([C@@H](O6)C)O[C@H]7C[C@@H]([C@H]([C@@H](O7)C)O)OC)OC)\C)O[C@@H]1C(C)C
```

#### Moxidectin (ChemSpider ID22901017)

SMILES:

```
C[C@@H]1C/C(=C/C[C@@H]2C[C@@H](C[C@@]3(O2)C/C(=NOC)/[C@@H]([C@H](O3)/C(=C/C(C)C)/C)C)OC(=O)[C@@H]4C=C([C@H]([C@@H]5[C@]4/C(=C/C=C1)/CO5)O)O)C)/C
```

#### 3.2.5.3.2 Vorhersage der bevorzugten Metabolisierungspositionen von IVM und MOX mittels SMARTCYP und MetaPrint2D

Um eine erste Annäherung an die mögliche Beschaffenheit eventueller IVM- und MOX-Metabolite zu bekommen, wurden Analysen mit SMARTCYP (Rydberg, Gloriam et al. 2010, Rydberg, Rostkowski et al. 2013) und MetaPrint2D (Carlsson, Spjuth et al. 2010) durchgeführt.

Das SMARTCYP-Tool analysiert chemische Verbindungen und trifft auf Grundlage der zweidimensionalen Molekülstruktur Vorhersagen über die Molekülpositionen, an denen mit höchster Wahrscheinlichkeit eine CYP-vermittelte Reaktion stattfindet. Der SMARTCYP Web Service (<http://www.farma.ku.dk/smartCYP/index.php>) bietet die Möglichkeit die zu untersuchende Verbindung als SMILES-Code einzugeben.

Das MetaPrint2D-Tool arbeitet auf Grundlage von data-mining und statistischer Auswertung von in der Literatur bekannten metabolischen Transformationen. Die Einspeisung der zu untersuchenden Verbindung geschieht als SMILES-Code. MetaPrint2D sowie das noch in der Experimentalphase befindliche MetaPrint2D-React finden sich auf <http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/>. MetaPrint2D-React bietet neben der reinen Vorhersage der Molekülpositionen, an denen mit höchster Wahrscheinlichkeit Reaktionen der Detoxifikationsphase I stattfindet werden, auch die Option diese nach Reaktionstypen zu filtern und kann so Vorhersagen zu möglichen Metaboliten treffen.

#### 3.2.5.3.3 Berechnung theoretisch möglicher Metabolite mittels Metabolizer (Chemaxon)

Das Programm Metabolizer der Firma Chemaxon ermöglicht die Vorhersage theoretisch möglicher Metabolite einer Ausgangsverbindung. Es bedient sich dabei eines Katalogs von chemischen Reaktionen (Biotransformation Library), die – soweit möglich – *in silico* auf die Ausgangsverbindung angewendet werden. Die Ausgangsverbindung kann dem Programm als SMILES-Code nach Auswahl von „File/New“ im Programmfenster „Draw Substrate“ unter „Edit/Paste“ eingespeist werden. Mit der Option „structure checking“ lassen sich eventuelle Fehler in der zwei- und dreidimensionalen Struktur erkennen und beheben. Durch Betätigen der Schaltfläche „accept“ kann die Ausgangsverbindung in das eigentliche Metabolizer-Programm übernommen werden. Unter der Option „Settings/Library Options...“ lassen sich verschiedene Biotransformation Libraries einladen, im vorliegenden Fall wurde mit der Demoversion der zwölf Reaktionen umfassenden „CYP450 xenobiotic biotransformation library“ gearbeitet (zu finden unter <https://www.chemaxon.com/download/configuration-files/>). Im Metabolizer-Hauptfenster lässt sich die Anzahl der Generation der zu berechnenden Metabolite festlegen und die Berechnung durch Betätigung der Schaltfläche „Calculate Metabolites“ starten. Nach Beendigung der Berechnung können die vorhergesagten Metabolite als „ChemAxon Marvin Documents / MRV“-Datei gespeichert und mit dem Programm Marvin View geöffnet werden. Hier erscheinen sie in Tabellenform geordnet und es können Schlüsselinformationen wie exakte Massen u.a. abgelesen werden.

Die Metabolitberechnungen für IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> und IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub> sowie das MOX-Molekül wurden mit der oben erwähnten „CYP450 xenobiotic biotransformation library“ über zwei Generationen hinweg durchgeführt.

#### 3.2.5.3.4 Berechnung der Massen der berechneten und in der Literatur gefundenen Metabolite unter Berücksichtigung der Addukte

Ausgehend von den Summenformeln der berechneten und der in der Literatur gefundenen Metabolite wurden deren exakte Massen mit dem „the exact mass calculator, single isotope version“ (<http://www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm>) berechnet.

Bedingt durch die Anwendung von Elektronenspray-Ionisation-Massenspektrometrie kam es während der Ionisation der Messproben zur Anlagerung von nicht kovalent gebundenen Ionen (sog. Addukte) an das eigentliche Probenmaterial. Die Addukte stammen dabei aus den verwendeten Lösungsmitteln. Bei diesem Vorgang wird die exakte Masse des Probenmaterialmoleküls um die Masse des Adduktes erhöht und als dementsprechend aufsummierter m/z-Wert detektiert. Um aus den exakten Massen der Ausgangswirkstoffe sowie der berechneten und in der Literatur gefundenen Metabolitkandidaten die tatsächlich zu detektierenden Massen zu berechnen, wurde der „Mass Spectrometry Adduct Calculator“ (<http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Metabolomics/MS-Adduct-Calculator/>) verwendet.

#### 3.2.5.4 Aufarbeitung der massenspektrometrisch gewonnenen Daten für eine Analyse mit XCMS\_online

Die bei der LC/MS-Messung ermittelten Rohdaten (3.2.4) wurden von der Steuerungssoftware Xcalibur (Thermo Fisher) in einem sog. RAW-Format gespeichert. Für eine weitere Analyse mit dem Programm XCMS\_online mussten diese erst in das kompatible Format „mzXML in centroid mode“ umgewandelt werden. Für die Umwandlung wurde das Programm ProteoWizard (Version 3.0.6002) verwendet, wobei zuvor noch benötigte Dateinformationen durch Installation der Software Thermo MSFileReader hinzugefügt wurden. Die Umwandlung der RAW- in mzXML-Dateien wurde analog zur Anleitung auf <https://xcmsonline.scripps.edu/docs/fileformats.html> unter Verwendung des „Peak Picking“-Filters durchgeführt. Die so umgewandelten Daten ließen sich direkt mit XCMS\_online einlesen.

#### 3.2.5.5 Analyse der Daten mit XCMS\_online

Bei der Software XCMS\_online (Tautenhahn, Patti et al. 2012) handelt es sich um ein Programm speziell für die Analyse von massenspektrometrischen Daten im Rahmen von „Non-Targeted Metabolomics“-Fragestellungen. Durch seine grafische Benutzeroberfläche ermöglicht das Programm eine weitgehend intuitive Arbeitsweise ohne Programmierfähigkeiten beim Nutzer vorauszusetzen.

Eine Kernfunktion von XCMS\_online ist der Vergleich von massenspektrometrischen Messläufen. Ein bis mehrere Testläufe können als ein Dataset gespeichert werden (unter „Stored Datasets/Add Dataset(s)“) und diese Datasets dann miteinander verglichen werden

(sog. „Pairwise Job“). Dies geschieht unter dem Reiter „Create Job“ via „Pairwise Job“, hier können die beiden Datasets ausgewählt werden (Dataset 1 dient dabei als Kontrolle) sowie Parameter bestimmt werden. Durch einen Klick auf „Submit Job“ wird die Analyse gestartet. Nach Beendigung kann der Vergleich unter dem Reiter „View Results“ ausgewählt und tiefergehend betrachtet werden. Im vorliegenden Fall wurde einzig die Option „View Results Table“ verwendet, über diese gelangt man zu einer Liste aller in den beiden verglichenen Testläufen gefundenen m/z-Werte. Zu jedem m/z-Wert wird eine Vielzahl von Informationen gegeben (u.a. Retentionszeit, Intensität, „Fold Change“, ggf. Chromatogramm). Des Weiteren existieren eine Such- und Filterfunktion sowie die Möglichkeiten die Werte der Tabellenspalten nach Größe zu ordnen.

Des Weiteren ist es möglich sich die Daten eines einzelnen Datasets aufarbeiten und anzeigen zu lassen, hierfür wird unter dem Reiter „Create Job“ ein sog. „Single Job“ gestartet, auf der folgenden Bedienfläche können zu untersuchendes Dataset und weitere Einstellungen bestimmt werden.

Eine weitere Funktion von XCMS\_online ist die Möglichkeit zum Vergleich mehrerer „Pairwise Jobs“ im Rahmen einer sog. Metaanalyse (Patti, Tautenhahn et al. 2012). Hiermit können Massen identifiziert werden, die in allen/einem Teil/nur einem der verglichenen „Pairwise Jobs“ vorhanden sind. Eine Metaanalyse wird über den Reiter „Create Job“ unter „metaXCMS Job“ gestartet. Dort können die zu vergleichenden „Pairwise Jobs“ ausgewählt sowie verschiedene Parameter eingestellt werden, über „Submit Job“ wird die Analyse gestartet. Das Resultat der Analyse wird von XCMS\_online als Venn-Diagramm dargestellt. Diesem kann entnommen werden wie viele m/z-Werte in welchen „Pairwise Jobs“ vorkommen/geteilt werden. Jeder m/z-Wertangabe bietet dabei theoretisch einen Link zur Liste der jeweiligen m/z-Werte, wobei diese Verlinkung leider nicht durchgehend funktionierte und daher die Auswertung auf andere Art und Weise erfolgen musste:

XCMS\_online bietet die Möglichkeit die Ergebnisse einer Metaanalyse als zip-Datei herunterzuladen (unter der Schaltfläche „Download Results“) und auf dem eigenen Rechner weiter zu bearbeiten. Ausgehend von der Datei „all-features-detailed.xlsx“ kann die Metaanalyse mit Microsoft Excel ausgewertet werden.

In dieser Tabelle finden sich dabei Angaben zu den gefundenen m/z-Werten (gemittelt, Maximal- und Minimalmesswert), den dazugehörigen Retentionszeiten (gemittelt, Maximal- und Minimalmesswert) sowie Angaben dazu, in welchen der verglichenen Teilmessungen der besagte m/z-Wert gefunden wurde. Ziel der Analyse sollte eine Liste der m/z-Werte sein, die ausschließlich im Inkubationsansatz „*C. oncophora* und Wirkstoff“ vorhanden sind. Hierzu wurde der gesamte Ergebnisbereich (alle Zellen im Kreuzungsbereich der m/z-Wertzeilen und

der Teilmessungsspalten) markiert. Anschließend wurden alle leeren Zellen mit einer „0“ gefüllt (über den Befehl „ersetzen“) und die oberste Zeile (mit den Zeilenüberschriften) eingefroren. Über die Funktion „Filtern“ wurden dann in allen Teilmessungsspalten bis auf die „*C. oncophora* und Wirkstoff“-Messungsspalten nur die m/z-Werte angezeigt, die in diesen Teilmessungen mit einer „0“ notiert waren (also nicht vorhanden waren). Die übriggebliebenen m/z-Werte konnten noch nach ihrer Größe sortiert werden und ergaben die Liste der m/z-Werte, die ausschließlich im Inkubationsansatz „*C. oncophora* und Wirkstoff“ vorkamen. Diese Liste konnte mit den Addukt-korrigierten m/z-Werten der berechneten und in der Literatur gefundenen ML-Metaboliten verglichen werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Sammlung der CYP-Sequenzen

Am Anfang der Untersuchung einzelner CYPs von *C. elegans* stand die Zusammenstellung des kompletten CYPoms des Organismus. Darüber hinaus wurde nach CYPs in anderen Organismen gesucht, die in ihrer biologischen Funktion mit ML interferieren und eventuell Aufschluss geben könnten, welche *C. elegans* CYPs als ML-Metabolisierer/-Resistenzverursacher-Kandidaten gehandelt werden könnten.

#### 4.1.1 Sammlung der *C. elegans*-CYP-Sequenzen

Die Sammlung der *C. elegans*-CYP-Sequenzen wurde wie unter 3.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Es ist zu beachten, dass sich die Anzahl der CYPs im Laufe der Zeit änderte. Bei einer ersten Suche im März 2011 fanden sich 77 proteinkodierende CYP-Gene, im Sommer 2012 erweiterte sich die Sammlung um das *cyp-31A5* auf insgesamt 78 proteinkodierende CYP-Gene (Tabelle 11). Dies war die CYP-Auswahl, die für die phylogenetischen Berechnungen in dieser Arbeit benutzt wurden. Im August 2015 stellte sich heraus, dass zwei der CYPs ihren Status als proteinkodierend verloren hatten und als Pseudogene angesprochen werden (*cyp-25A5* und *cyp-34A3*). Eine Sammlung der bekannten *C. elegans*-CYP-Pseudogene ist Tabelle 12 zu entnehmen (Stand August 2015).

**Tabelle 11: Liste der 78 *C. elegans*-CYPs, wie sie für die phylogenetischen Berechnungen in dieser Arbeit verwendet wurden. Bei einer ersten Suche im März 2011 war das CYP-31A5 noch nicht verzeichnet. Bei einer erneuten Überprüfung im August 2015 stellte sich heraus, dass CYP-25A5 und CYP-34A3 (je mit Asterisk gekennzeichnet) inzwischen Pseudogenstatus haben.**

CYP-13A1	CYP-14A4	CYP-32B1	CYP-33E1	CYP-35A4
CYP-13A10	CYP-14A5	CYP-33A1	CYP-33E2	CYP-35A5
CYP-13A11	CYP-23A1	CYP-33B1	CYP-33E3	CYP-35B1
CYP-13A12	CYP-25A1	CYP-33C1	CYP-34A1	CYP-35B2
CYP-13A2	CYP-25A2	CYP-33C2	CYP-34A2	CYP-35B3
CYP-13A3	CYP-25A3	CYP-33C3	CYP-34A3*	CYP-35C1
CYP-13A4	CYP-25A4	CYP-33C4	CYP-34A4	CYP-35D1
CYP-13A5	CYP-25A5*	CYP-33C5	CYP-34A5	CYP-36A1
CYP-13A6	CYP-25A6	CYP-33C6	CYP-34A6	CYP-37A1
CYP-13A7	CYP-29A2	CYP-33C7	CYP-34A7	CYP-37B1
CYP-13A8	CYP-29A3	CYP-33C8	CYP-34A8	CYP-42A1
CYP-13B1	CYP-29A4	CYP-33C9	CYP-34A9	CYP-43A1
CYP-13B2	CYP-31A2	CYP-33C11	CYP-34A10	CYP-44A1
CYP-14A1	CYP-31A3	CYP-33C12	CYP-35A1	Daf-9 (CYP-22A1)
CYP-14A2	CYP-31A5	CYP-33D1	CYP-35A2	
CYP-14A3	CYP-32A1	CYP-33D3	CYP-35A3	

**Tabelle 12: Liste der bekannten *C. elegans*-CYP-Pseudogene (Stand 29.08.2015)**

<i>cyp-13A9</i>	<i>cyp-29A1</i>	<i>cyp-34A3</i>
<i>cyp-25A5</i>	<i>cyp-31A1</i>	<i>cyp-35D2</i>

#### **4.1.2 Sammlung von CYPs, die in ihrer biologischen Funktion mit makrozyklischen Laktonen interagieren, aus anderen Organismen**

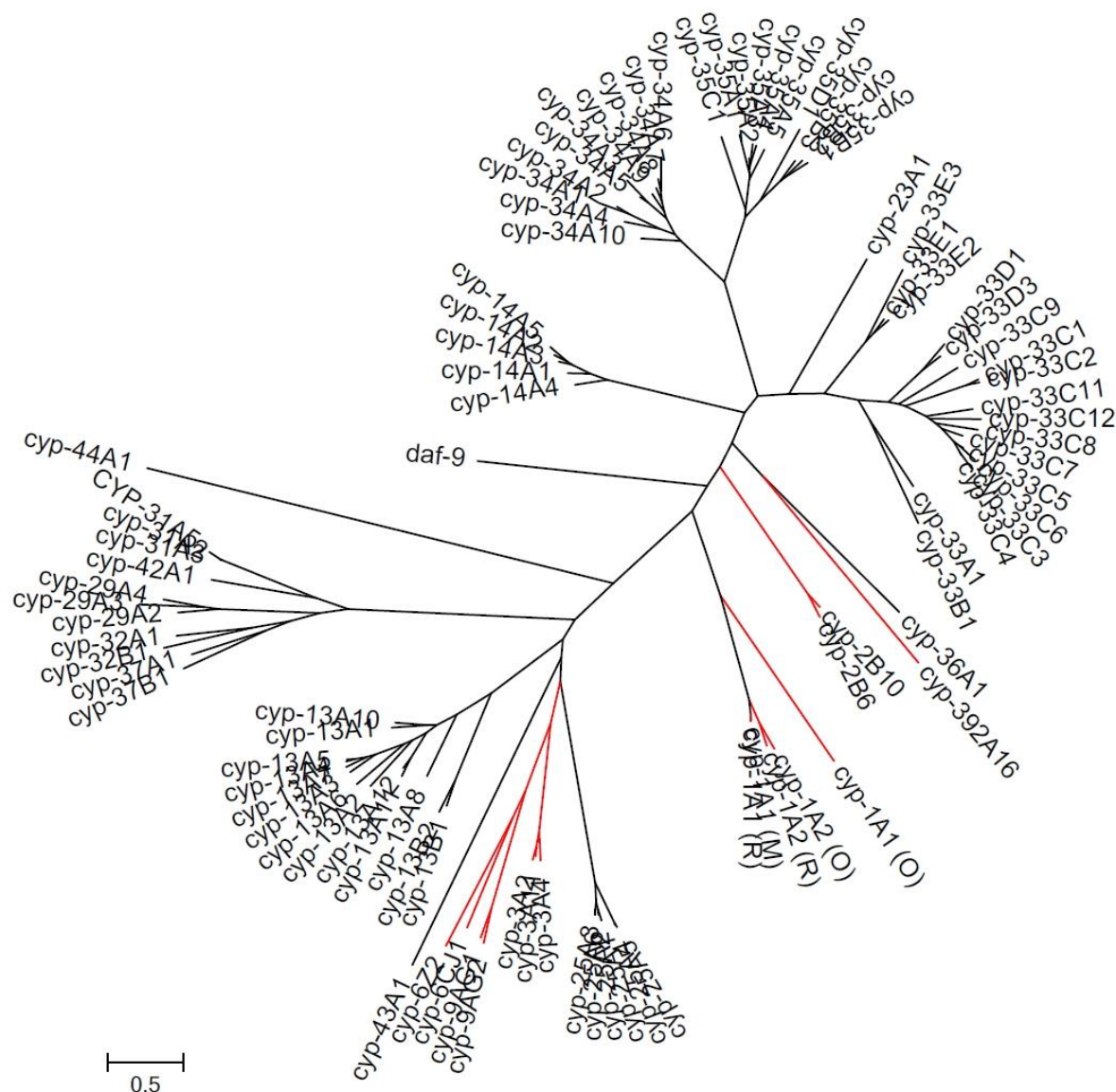
Die Sammlung der CYPs aus anderen Organismen, die [CYPs] in ihrer biologischen Funktion mit ML interagieren, wurde auf Grundlage einer Literaturrecherche durchgeführt. Es wurden CYPs von Vertebraten und Invertebraten gefunden, deren Expression in Gegenwart von ML induziert wird, deren Aktivität durch ML gehemmt wird oder die ML als Substrat umsetzen können. Die genaue Auflistung der CYPs mitsamt Herkunftsorganismus und Literaturangabe findet sich in Tabelle 13.

**Tabelle 13: Sammlung von CYPs, die in ihrer biologischen Funktion mit ML interagieren, aus verschiedenen Organismen (AVM: Abamectin, MEM-H<sub>2</sub>B<sub>1</sub>: 22,23-dihydro-13-O-[(2-methoxyethoxy)methyl]-avermectin B<sub>1</sub> aglycone)**

Organismus	CYP	beobachteter Effekt/Kommentar	Literaturquelle
<i>Pediculus.h.humanus</i>	CYP-6CJ1	Genexpression induziert durch IVM	(Yoon, Strycharz et al. 2011)
	CYP-9AG1	Genexpression induziert durch IVM	
	CYP-9AG2	Genexpression induziert durch IVM	
	CYP-CF1	dito, [Mangel Sequenzinformation]	
	CYP-4BU1	dito, [Mangel Sequenzinformation]	
<i>Anopheles gambiae</i>	CYP-6Z2	Hemmung der Enzymaktivität durch IVM <i>in vitro</i>	(McLaughlin, Niazi et al. 2008)
<i>Rattus norvegicus</i>	P4501A (Enzymfamilie):	IVM induziert Expression <i>in vivo</i>	(Skalova, Szotakova et al. 2001)
	CYP-1A1		
	CYP-1A2		
	CYP-1A1 (redundant)	AVM Substrat	(Zeng, Andrew et al. 1996)
	CYP-3A2	Substrat: MEM-H <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	(Zeng*, Andrew et al. 1997)
<i>Homo sapiens</i>	CYP-3A4	IVM Substrat	(Zeng, Andrew et al. 1998)
	CYP-2B6	Hemmung der Enzymaktivität durch AVM <i>in vivo</i>	Abass et al., 2009 (Abass, Turpeinen et al. 2009)
<i>Tetranychus urticae</i>	CYP-392A16	AVM Substrat	(Riga, Tsakireli et al. 2014)
<i>Ovus musimon</i>	CYP-1A1	IVM steigert Enzymaktivität <i>in vivo</i>	Skalova, Szotakova et al. 2001)
	CYP-1A2	IVM steigert Enzymaktivität <i>in vivo</i>	
	CYP-2B	dito, [Mangel Sequenzinformation]	
	CYP-3A	dito, [Mangel Sequenzinformation]	
<i>Mus musculus</i>	CYP-1A1	Genexpression induziert durch IVM	(Alberich, Menez et al. 2014)
	CYP-2B10	Genexpression induziert durch IVM	
	CYP-3A11	Genexpression induziert durch IVM	



Insgesamt wurden fünf CYP-Sequenzen aus insgesamt drei invertebraten Organismen sowie zehn CYP-Sequenzen aus insgesamt vier vertebraten Organismen gefunden, es waren nicht zu allen CYPs die entsprechenden Sequenzinformationen auffindbar. Die verfügbaren Sequenzen (AA-Sequenzen) wurden zusammen mit denen des *C. elegans*-CYPom in einen phylogenetischen Baum gerechnet (Abbildung 7; Methodik siehe 3.2.5.2).



**Abbildung 7: Phylogenetischer Baum der *C. elegans*-CYPs und der CYPs anderer Organismen, die in ihrer biologischen Funktion mit ML interferieren (AA-Sequenzen. Die rot gefärbten Äste zeigen CYPs anderer Organismen an. Bei gleichnamigen CYPs bezeichnet das Suffix in Klammern den Herkunftsorganismus; (R): *Rattus norvegicus*, (O): *Ovus musimon*, (M): *Mus musculus*)**

Bei Betrachtung des phylogenetischen Baumes fällt auf, dass die CYPs der Vertebraten gemäß ihrer Nomenklatur clustern, so bilden sämtliche CYP-1A-Vertreter (aus drei unterschiedlichen Organismen) eine Operational Taxonomic Unit, ebenso die CYP-2B-Vertreter (aus zwei unterschiedlichen Organismen) und die CYP-3A-Vertreter (aus drei

unterschiedlichen Organismen). Im Falle der Invertebraten clustern die CYPs aus *Pediculus h. humanus* und *Anopheles gambiae* zusammen und stehen dabei im Schwestergruppenverhältnis zu dem vertebraten CYP-3A-Cluster. CYP-392A16 aus *Tetranychus urticae* steht abseits der anderen invertebraten CYPs im Schwestergruppenverhältnis mit dem *C. elegans*-CYP-36A1.

Aufgrund der Tatsache, dass das CYP-392A16 in der Lage ist ein ML (Abamectin) zu metabolisieren und dazu noch aus einem invertebraten Organismus stammt, wurde eine BLASTP-Analyse gegen das *C. elegans*-CYPom durchgeführt (Abbildung 8). Das *C. elegans*-CYP-36A1, das im phylogenetischen Baum im Schwestergruppenverhältnis zu CYP-392A16 steht, findet sich dabei nicht unter den ersten zehn Treffern der BLASTP-Analyse (sondern an 15. Stelle (nicht gezeigt)).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Protein CYP-33C9 [Caenorhabditis elegans]	223	223	82%	2e-65	32%	<a href="#">NP_503846.1</a>
Protein CYP-14A5 [Caenorhabditis elegans]	220	220	89%	2e-64	32%	<a href="#">NP_504435.1</a>
Protein CYP-14A1 [Caenorhabditis elegans]	219	219	89%	3e-64	31%	<a href="#">NP_510203.1</a>
Protein CYP-33E1 [Caenorhabditis elegans]	214	214	78%	5e-62	32%	<a href="#">NP_501480.2</a>
Protein CYP-14A2 [Caenorhabditis elegans]	211	211	86%	5e-61	32%	<a href="#">NP_510204.1</a>
Protein CYP-14A3 [Caenorhabditis elegans]	211	211	86%	5e-61	31%	<a href="#">NP_510205.1</a>
Protein CYP-33E2 [Caenorhabditis elegans]	209	209	83%	4e-60	31%	<a href="#">NP_501470.2</a>
Protein CYP-14A4 [Caenorhabditis elegans]	206	206	86%	3e-59	31%	<a href="#">NP_510207.1</a>
Protein CYP-33C1 [Caenorhabditis elegans]	203	203	86%	4e-58	30%	<a href="#">NP_503592.2</a>
Protein CYP-33C2 [Caenorhabditis elegans]	202	202	82%	8e-58	31%	<a href="#">NP_503594.1</a>

**Abbildung 8: Die ersten zehn Ergebnisse der BLASTP-Analyse des *T. urticae* CYP-392A16 gegen das *C. elegans*-CYPom (AA-Sequenzen)**

## **4.2 Entwicklungsassays mit *C. elegans***

Mit Hilfe von Entwicklungsassays wurden die verschiedenen CYP-deletionsmutierten *C. elegans*-Stämme im Hinblick auf ihre Empfindlichkeit gegenüber ML während der Entwicklung mit dem Wildtyp N2-Bristol verglichen (3.2.1.2). Ziel dieser Untersuchung war die Identifikation von Stämmen, deren Entwicklung unter Versuchsbedingungen stark von der des N2-Bristol-Wildtyps abwich. Dieses Verhalten im Versuch wurde als Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des im jeweiligen Stamm deletionsmutierten CYP am ML-Stoffwechsel gewertet. Neben dem Screening der verschiedenen CYP-Deletionsmutanten wurden auch Entwicklungsassays mit dem Bristol-N2-Wildtyp durchgeführt, bei denen mit einer Kombination aus ML und PBO inkubiert wurde. Hierbei sollte die Auswirkung einer generellen CYP-Inhibierung auf die Entwicklungsfähigkeit der Würmer unter Versuchsbedingungen untersucht werden.

### **4.2.1 Entwicklungsassays unter Verwendung von makrozyklischen Laktonen und Piperonylbutoxid**

Insgesamt wurden zwei Testreihen mit dem *C. elegans*-Bristol-N2-Wildtyp durchgeführt (3.2.1.2.1), die sich in den verwendeten Konzentrationen von PBO und ML, den verwendeten ML sowie der Vorbehandlung der OP50-Futterbakterien unterschieden (3.2.1.2).

In der ersten Testreihe wurde eine PBO-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verwendet und ausschließlich mit IVM co-inkubiert (die Untersuchung von MOX war zu dem Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch nicht Teil des Projektes). Die OP50-Futterbakterien wurden nicht bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorbehandelt.

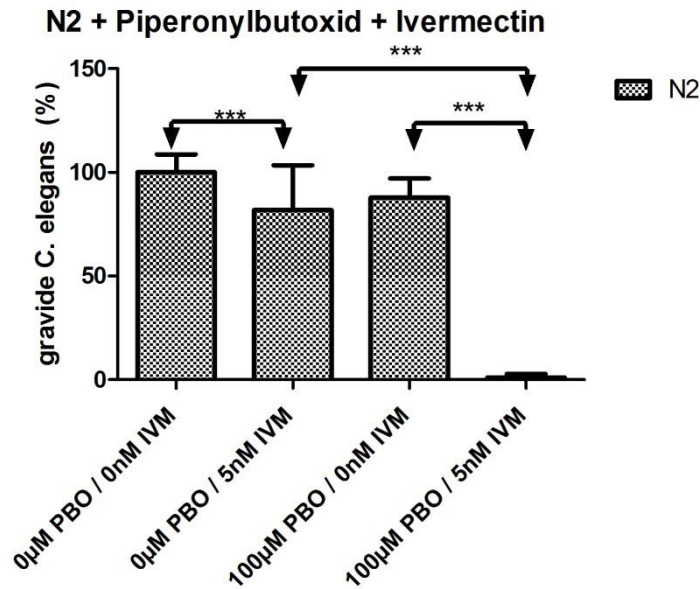


Abbildung 9: Ergebnisse der Entwicklungsassays (n=4) mit dem *C. elegans*-Bristol-N2-Wildtyps unter Verwendung von IVM (5 nM) und Piperonylbutoxid (100 µM), OP50-Futterbakterien sind nicht bei -80 °C vorbehandelt (Daten normalisiert, Säulen zeigen Mittelwerte, Fehlerbalken Standardabweichungen. Statistik: Oneway ANOVA, Signifikanzwerte: ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ )

Die Co-Inkubation von 5 nM IVM und 100 µM PBO resultierte in einer signifikanten und überadditiven Abnahme der Entwicklungsrate im Vergleich zu den beiden ausschließlich mit IVM oder PBO behandelten Ansätzen (Abbildung 9). Die ausschließliche Inkubation mit PBO führte zu keiner signifikanten Abnahme im Vergleich zum Kontrollansatz und die ausschließliche Inkubation mit IVM zu einer zwar signifikanten, aber deutlich geringeren Abnahme.

In der zweiten Testreihe wurde mit bei -80 °C vorbehandelten OP50-Futterbakterien gearbeitet. Da sich gezeigt hatte, dass bei Verwendung derart vorbehandelter Futterbakterien die Wirkstoffe bei gleicher Konzentration eine stärkere Wirkung im Entwicklungsassay zeigten, wurden die Wirkstoffkonzentrationen angepasst: IVM und MOX wurden jeweils in einer Konzentration von 2 nM verwendet, PBO in einer Konzentration von 100 µM und 25 µM. Die Ergebnisse sind Abbildung 10 zu entnehmen. Es zeigte sich, dass im IVM-Ansatz bereits die Inkubation mit PBO zu einer deutlichen, wenn auch nicht signifikanten Verminderung der Entwicklungsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Die Co-Inkubation mit PBO und IVM führte zu einer weiter verminderten Entwicklung, die allerdings keinen signifikanten Unterschied zum nur mit PBO inkubierten Ansatz aufwies. Die alleinige Inkubation mit IVM resultierte in einer der Kontrollgruppe sehr ähnlichen und nicht signifikant unterschiedlichen Entwicklung.

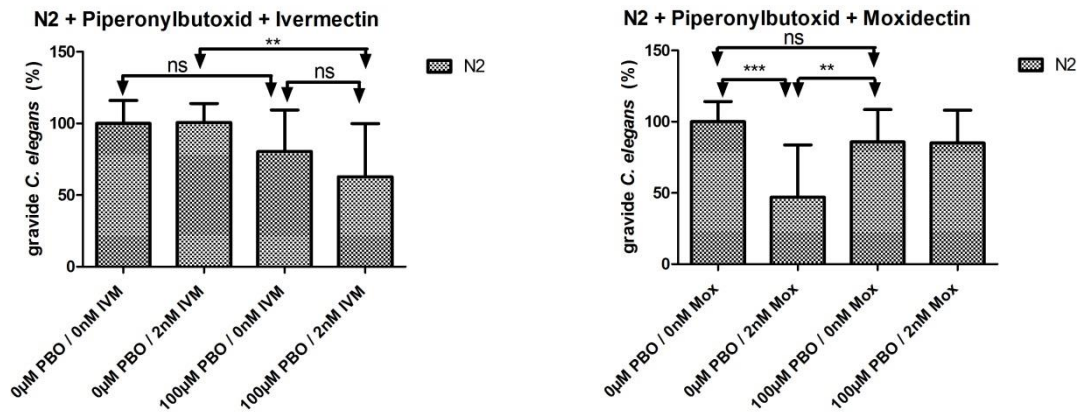


Abbildung 10: Ergebnisse der Entwicklungsassays (n=4) mit dem *C. elegans*-Bristol-N2-Wildtyps unter Verwendung von IVM (2 nM) bzw. MOX (2 nM) und Piperonylbutoxid (100 µM), OP50-Futterbakterien sind bei -80 °C vorbehandelt (Daten normalisiert, Säulen zeigen Mittelwerte, Fehlerbalken Standardabweichungen. Statistik: Oneway ANOVA, Signifikanzwerte: ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ )

Im MOX-Ansatz führte bereits die ausschließliche Inkubation mit MOX zu einer im Vergleich zum Kontrollansatz signifikanten Verminderung der Entwicklungsrate. Die alleinige Inkubation mit PBO resultierte in einer der Kontrollgruppe ähnlichen und signifikant nicht unterschiedlichen Entwicklung, allerdings zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur ausschließlich mit MOX durchgeführten Inkubation. Der mit PBO und MOX co-inkubierte Ansatz zeigte eine dem ausschließlich mit PBO inkubierten Ansatz sehr ähnliche und nicht signifikant unterschiedliche Entwicklungsrate.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Konzentration des PBO auf 25 µM gesenkt. Die Ergebnisse der Entwicklungsassays sind Abbildung 11 zu entnehmen. Es zeigte sich dass weder im IVM- noch MOX-Ansatz signifikante Unterschiede im Wachstum zwischen den einzelnen Inkubationsansätzen festzustellen waren.

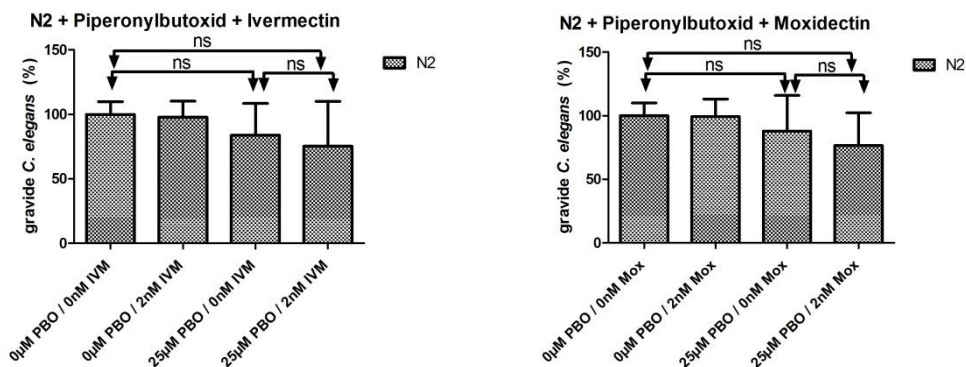


Abbildung 11: Ergebnisse der Entwicklungsassays (n=3) mit dem *C. elegans*-Bristol-N2-Wildtyps unter Verwendung von IVM (2 nM) bzw. MOX (2 nM) und Piperonylbutoxid (25 µM), OP50-Futterbakterien sind bei -80 °C vorbehandelt (Daten normalisiert, Säulen zeigen Mittelwerte, Fehlerbalken Standardabweichung. Statistik: Oneway ANOVA, Signifikanzwerte: ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ )

#### **4.2.2 Screening der *C. elegans*-CYP-loss-of-function-Mutantenstämme**

Um die verfügbaren 16 *C. elegans*-CYP-loss-of-function-Mutantenstämme (3.1.9) auf ihre Entwicklungsfähigkeit in Gegenwart von ML zu untersuchen, wurde ein Screeningprozess durchgeführt. Hierbei wurden die Mutanten in Entwicklungsassays (3.2.1.2) mit dem Bristol-N2-Wildtyp verglichen. Zur schnellerem Durchführbarkeit der Versuche wurden die ML-Konzentrationen dabei auf jeweils zwei begrenzt (2 und 6 nM für IVM und 3 und 5 nM für MOX). Angestrebt waren dreifache biologische Replikate für jeden Stamm, die tatsächlich erzielten Wiederholungen sind den Abbildungen zu entnehmen. Für drei Stämme konnten keine Ergebnisse im Screening erzielt werden: Die Stämme RB1613 und RB2216 zeigten im Entwicklungsassay auch in der Kontrollgruppe keine Entwicklung und Stamm VC249 war während des Screening-Vorganges aufgrund eines Problems in der Stammhaltung nicht verfügbar (Nachbestellung war notwendig).

In Abbildung 12 sind die Entwicklungsdaten der Stämme aufgeführt, die in mindestens einer ML-Konzentration signifikante Unterschiede im Vergleich zum Bristol-N2-Wildtyp aufwiesen (nicht signifikante Unterschiede sind nicht extra dargestellt).



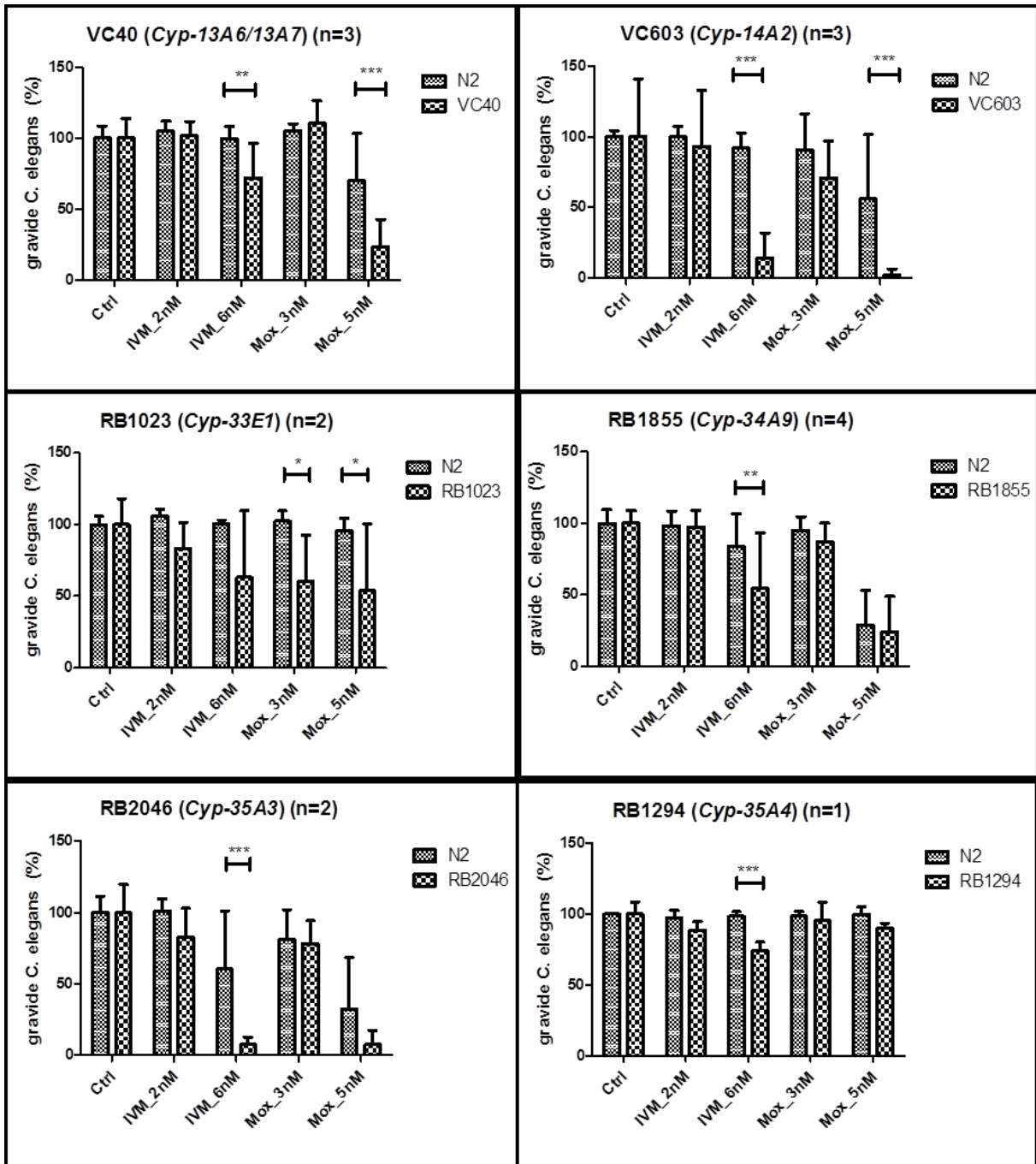


Abbildung 12: Übersicht über die *C. elegans*-CYP-loss-of-function-Mutanten, die im Screening signifikante Unterschiede in der Entwicklung im Vergleich zum N2-Wildtyp aufwiesen, *E. coli* OP50- Futterbakterien bei -80 °C vorbehandelt (Werte normalisiert; Säulen zeigen Mittelwerte, Fehlerbalken Standardabweichungen; Statistik: Oneway ANOVA, Signifikanzwerte: ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ )

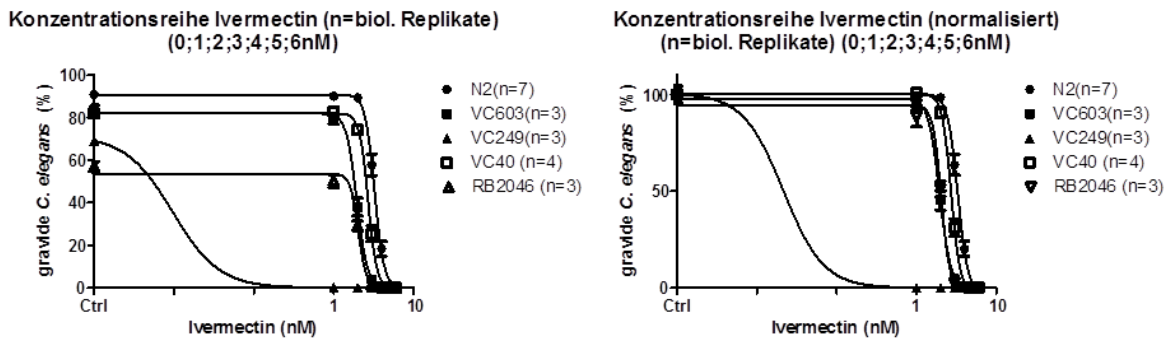
Die Entwicklungsdaten der Stämme, die keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung im Vergleich zum Bristol-N2-Wildtyp aufwiesen sind im Anhang (Seite 185, Abbildung 50) zu finden.

Für eine weiterführende Untersuchung im Entwicklungsassay wurden die Stämme VC603, VC40, RB2046 sowie der wiederbeschaffte VC249 ausgewählt. Die Kriterien für die Inkludierung der ersten drei Stämme waren dabei Anzahl und Grad der aufgetretenen

signifikanten Entwicklungsunterschiede sowie die Anzahl der erfolgreich durchgeführten Wiederholungen des Versuches (Anzahl biologischer Replikate).

### 4.2.3 Weiterführende Untersuchung ausgewählter Stämme sowie des VC249-Stammes

Im Rahmen der weiterführenden Untersuchung wurden die Stämme VC603, VC40, VC249 und RB2046 in feinauflösenderen Entwicklungsassays mit dem Bristol-N2-Wildtyp verglichen. Hiermit sollte unter den jeweils teildeletierten CYP-Genen das Kandidatengen ausgemacht werden, dessen Funktionsausfall den deutlichsten Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit der Würmer bei Anwesenheit von ML hat. Um eine im Vergleich zum Screeningprozess feine Bewertung der Entwicklungsfähigkeit zu erlauben, wurde der ML-Konzentrationsrahmen über eine breitere Spanne ausgedehnt: 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6 nM für IVM und 0; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 nM für MOX. Die *E. coli* OP50- Futterbakterien wurden bei -80 °C vorbehandelt.



Stamm	N2	VC603	VC249	VC40	RB2046
log(agonist) vs. response – variable slope			uneindeutig		
EC <sub>50</sub>	3,294 nM	1,952 nM	~0,02156 nM	2,711 nM	2,040 nM
EC <sub>50</sub> (95%-Konfidenzintervall)	3,178 - 3,414 nM	1,882 - 2,023 nM	sehr variabel	2,630 - 2,795 nM	1,965 - 2,117 nM
Bestimmtheitsmaß (R <sup>2</sup> )	0,9314	0,9746	0,9930	0,9753	0,9592

Abbildung 13: Entwicklungskurven der *C. elegans*-Stämme N2, VC603, VC249, VC40 und RB2046 in Gegenwart eines IVM-Gradienten mit den Konzentrationen 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6 nM, *E. coli* OP50- Futterbakterien bei -80 °C vorbehandelt (links oben: Daten X=Log(X) transformiert und nichtlinear Regressions-analysiert (log(agonist) vs. response -- Variable slope (four parameters)), rechts oben: transformierte Daten zusätzlich normalisiert, unten: Angaben beziehen sich auf normalisierte Daten)

Die Entwicklungskurven der untersuchten Stämme für den IVM-Ansatz finden sich in Abbildung 13, wie aufgrund der Screeningergebnisse zu erwarten zeigte der N2-Bristol-Wildtyp die größte Unempfindlichkeit gegenüber IVM. Von den CYP-defizienten Stämmen zeigte VC249 die größte Empfindlichkeit gegenüber IVM, bereits bei der ersten Wirkkonzentration von 1 nM kam seine Entwicklung vollständig zum Erliegen (aufgrund dieser



geringen Anzahl an Messpunkten war die zuverlässige Durchführung der nichtlinearen Regressionsanalyse und die eindeutige Berechnung der EC<sub>50</sub> nicht möglich). Die Entwicklungsrate des Stammes VC249 betrug im Kontrollansatz ungefähr 70 % und lag damit ungefähr 20 % unter der des N2-Bristol-Wildtyps.

Abbildung 14 zeigt die Entwicklungskurven für den MOX-Ansatz. Ebenso wie im IVM-Ansatz zeigte der N2-Bristol-Wildtyp die größte Unempfindlichkeit gegenüber MOX und der Stamm VC249 die größte Empfindlichkeit. Beim Stamm VC249 zeigte sich in der ersten MOX-Wirkkonzentration eine Entwicklung von ca. 10%, diese brach bei den folgenden Konzentrationen komplett ein (wie beim IVM-Ansatz war keine zuverlässige nichtlineare Regressionsanalyse sowie Berechnung der EC<sub>50</sub> möglich). Die Entwicklungsrate des Stammes VC249 betrug im Kontrollansatz ungefähr 70 % und lag damit ungefähr 20 % unter der des N2-Bristol-Wildtyps.

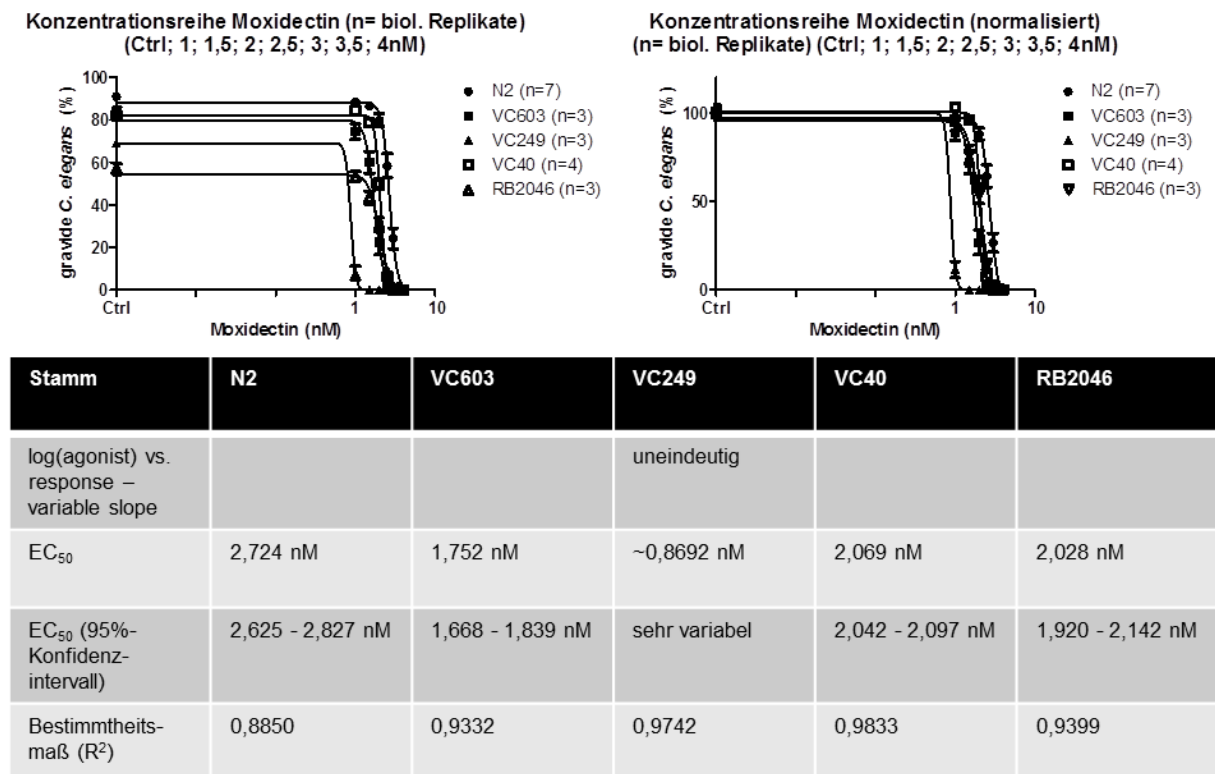


Abbildung 14: Entwicklungskurven der *C. elegans*-Stämme N2, VC603, VC249, VC40 und RB2046 in Gegenwart eines MOX-Gradienten mit den Konzentrationen 0; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 nM, *E. coli* OP50-Futterbakterien bei -80 °C vorbehandelt (links oben: Daten X=Log(X) transformiert und nichtlinear Regressions-analysiert (log(agonist) vs. response -- Variable slope (four parameters)), rechts oben: transformierte Daten zusätzlich normalisiert, unten: Angaben beziehen sich auf normalisierte Daten)

Aufgrund der beobachteten Empfindlichkeit des Stammes VC249 gegen IVM und MOX, die die der anderen ausgewählten Stämme übertrifft, wurde das im Stamm VC249 teildeletierte *cyp-14A5* als Kandidatengen für weitere Untersuchungen ausgewählt. Diesem Entschluss lag die Hypothese zugrunde, dass das CYP-14A5 am ML-Metabolismus in *C. elegans* beteiligt

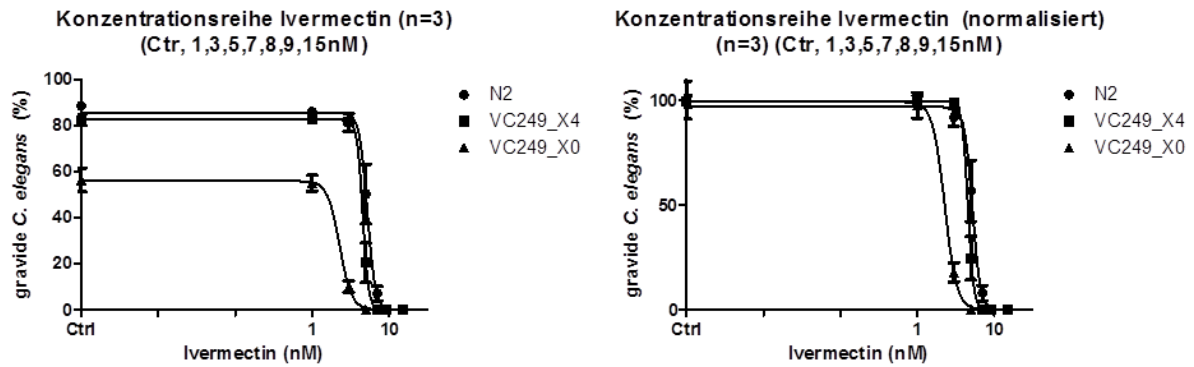
sein könnte, da der Stamm VC249 ohne funktionsfähiges CYP-14A5 die größte Empfindlichkeit unter den Mutanten gegenüber ML aufgewiesen hatte.

#### **4.2.4 Entwicklungsassay mit vierfach ausgekreuztem VC249-Stamm (VC249\_X4)**

Um den Einfluss der *cyp-14A5*-Deletionsmutation auf die Empfindlichkeit des Merkmalsträgers gegenüber ML verifizieren zu können, wurde die Mutation vierfach in den N2-Bristol-Wildtyp ausgekreuzt (3.2.1.3). Während des mehrmonatigen Auskreuzungsvorganges wurde sowohl das Teilprojekt „*cyp-14A5*-Expressionsanalyse in *C. elegans*“ (4.4) als auch das Teilprojekt „phylogenetische Untersuchungen: *cyp-14A*-homologe Gene in parasitischen Nematoden“ (4.5) durchgeführt.

Mit dem vierfach ausgekreuzten Stamm (VC249\_X4), dem Ursprungsstamm (VC249\_X0) und dem N2-Bristol-Wildtyp wurden dann erneut Entwicklungsassays durchgeführt. Hiermit sollte festgestellt werden, ob sich der vierfach ausgekreuzte Stamm in seiner Empfindlichkeit gegen ML wie der Ursprungsstamm verhielt.

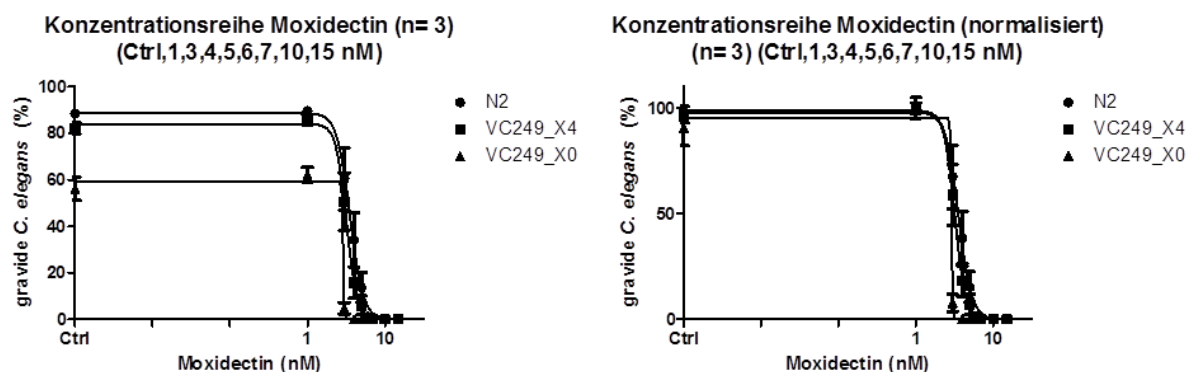
In einer ersten Versuchsreihe wurde im IVM-Ansatz mit Konzentrationen von 0; 1; 3; 5; 7; 8; 9; 15 nM gearbeitet, die *E. coli* OP50-Futterbakterien wurden nicht bei -80 °C vorbehandelt. Die Zeitdauer zwischen Start und Abstopps des Assays betrug gemittelt für den Bristol-N2-Wildtyp 62:29 h, für den Stamm VC249\_X4 62:31 h und für den VC249\_X0 69:44 h. Es zeigte sich weiterhin, dass der VC249\_X0-Stamm mit einer  $EC_{50}$  von 2,277 nM die stärkste, der N2-Bristol-Wildtyp mit einer  $EC_{50}$  von 5,207 nM die geringste Empfindlichkeit gegenüber IVM aufwies (Abbildung 15). Die Entwicklung des VC249\_X4-Stammes ( $EC_{50}$ : 4,549 nM) erwies sich allerdings als unempfindlicher im Vergleich zum VC249\_X0-Stamm und lag nur knapp unterhalb der des N2-Bristol-Wildtyps (Überschneidung der 95 %-Konfidenzintervalle der  $EC_{50}$  von VC249\_X4 und Bristol-N2-Wildtyp). Die Entwicklungsrate des Stammes VC249\_X0 betrug im Kontrollansatz knapp 60 % und lag damit ungefähr 25% unter der des N2-Bristol-Wildtyps und des VC249\_X4.



Stamm	N2	VC249_X4	VC249_X0
log(agonist) vs. response – variable slope			
EC <sub>50</sub>	5,207 nM	4,549 nM	2,277 nM
EC <sub>50</sub> (95%-Konfidenzintervall)	4,924 - 5,506 nM	3,844 - 5,383 nM	1,510 – 3,433 nM
Bestimmtheitsmaß (R <sup>2</sup> )	0,8830	0,9456	0,9249

**Abbildung 15:** Entwicklungskurven der *C. elegans*-Stämme N2, VC249\_X4 sowie VC249\_X0 in Gegenwart eines IVM-Gradienten mit den Konzentrationen 0; 1; 3; 5; 7; 8; 9; 15 nM, *E. coli* OP50- Futterbakterien nicht bei -80 °C vorbehandelt (links oben: Daten X=Log(X) transformiert und nichtlinear Regressions-analysiert (log(agonist) vs. response -- Variable slope (four parameters)), rechts oben: transformierte Daten zusätzlich normalisiert, unten: Angaben beziehen sich auf normalisierte Daten)

Im MOX-Ansatz wurde mit Konzentrationen von 0; 1; 3; 4; 5; 6; 7; 10; 15 nM gearbeitet, die *E. coli* OP50-Futterbakterien wurden nicht bei -80 °C vorbehandelt. Im Entwicklungsassay zeigte der Stamm VC249\_X0 mit einer EC<sub>50</sub> von ~2,9 nM die stärkste, der N2-Bristol-Wildtyp mit einer EC<sub>50</sub> von 3,554 nM die geringste Empfindlichkeit gegenüber MOX (Abbildung 16). Der Stamm VC249\_X4 lag in seiner Empfindlichkeit (EC<sub>50</sub>: 3,198 nM) zwischen der des VC249\_X0 und des N2-Bristol-Wildtyp, allerdings überschneidet sich dessen 95 %-Konfidenzintervall mit dem des N2-Bristol-Wildtyps. Die Entwicklungsrate des Stammes VC249\_X0 betrug im Kontrollansatz knapp 60 % und lag damit ungefähr 25 % unter der des N2-Bristol-Wildtyps und 20 % unter der des VC249\_X4. Allerdings ergaben sich für den Stamm VC249\_X0 nicht ausreichend viele Messpunkte um eine zuverlässige Durchführung der nichtlinearen Regressionsanalyse und die eindeutige Berechnung der EC<sub>50</sub> zu ermöglichen.

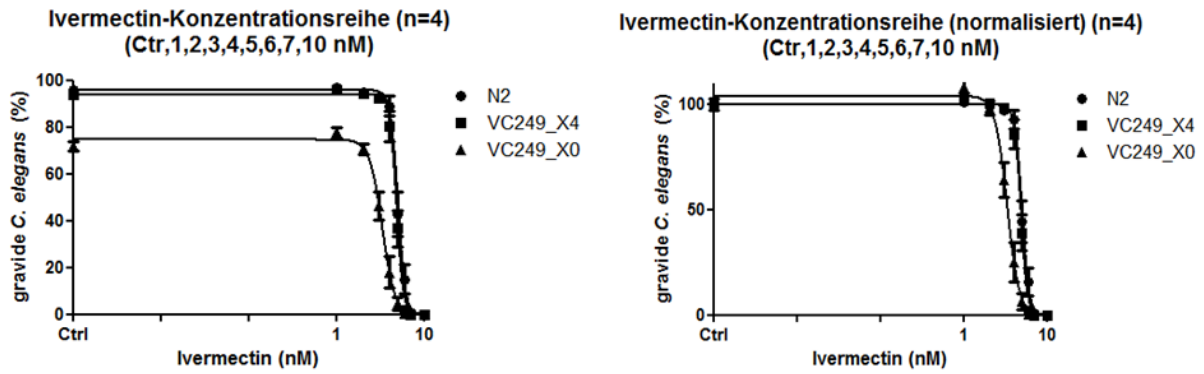


Stamm	N2	VC249_X4	VC249_X0
log(agonist) vs. response – variable slope			uneindeutig
EC <sub>50</sub>	3,554 nM	3,198 nM	~ 2,9 nM
EC <sub>50</sub> (95%-Konfidenzintervall)	3,235 – 3,905 nM	2,984 – 3,428 nM	sehr variabel
Bestimmtheitsmaß (R <sup>2</sup> )	0,7984	0,8531	0,9374

**Abbildung 16:** Entwicklungskurven der *C. elegans*-Stämme N2, VC249\_X4 sowie VC249\_X0 in Gegenwart eines MOX-Gradienten mit den Konzentrationen 0; 1; 3; 4; 5; 6; 7; 10; 15 nM, *E. coli* OP50- Futterbakterien nicht bei -80 °C vorbehandelt (links oben: Daten X=Log(X) transformiert und nichtlinear Regressions analysiert (log(agonist) vs. response -- Variable slope (four parameters)), rechts oben: transformierte Daten zusätzlich normalisiert, unten: Angaben beziehen sich auf normalisierte Daten)

In einer zweiten Versuchsdurchführung wurden die Konzentrationen der ML verringert, um besonders im Fall von MOX eine größere Anzahl an Messpunkten zu erhalten und somit zuverlässige Durchführung der nichtlinearen Regressionsanalyse und der EC<sub>50</sub>-Berechnung zu ermöglichen, das Versuchssetting wurde ansonsten nicht verändert. Die Konzentrationen für IVM betragen 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 10 nM, die für MOX 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 10 nM. Die Zeitdauer zwischen Start und Abstoppen des Assays betrug gemittelt für den Bristol-N2-Wildtyp 63:47 h, für den Stamm VC249\_X4 63:43 h und für den VC249\_X0 67:07 h.

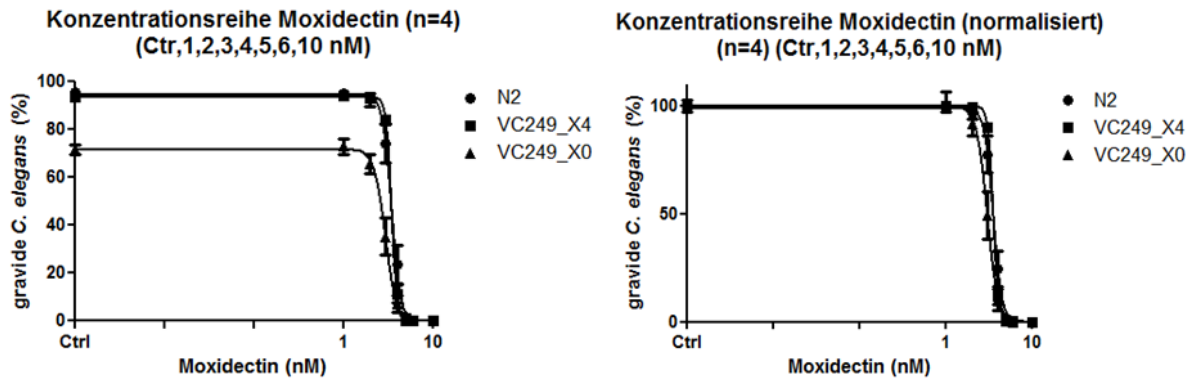
Im IVM-Ansatz zeigte der Stamm VC249\_X0 mit einer EC<sub>50</sub> von 3,264 nM die stärkste, der N2-Bristol-Wildtyp mit einer EC<sub>50</sub> von 4,944 nM die geringste Empfindlichkeit (Abbildung 17). Der Stamm VC249\_X4 ähnelte in seiner Entwicklung mit einer EC<sub>50</sub> von 4,766 nM dem N2-Bristol-Wildtyp, für beide Stämme ergab sich eine Überschneidung ihrer EC<sub>50</sub>-95%-Konfidenzintervalle. Die Entwicklungsrate des Stammes VC249\_X0 betrug im Kontrollansatz ungefähr 70 % und lag damit ca. 20 % unter der des N2-Bristol-Wildtyps und des VC249\_X4.



Stamm	N2	VC249_X4	VC249_X0
log(agonist) vs. response – variable slope			
EC <sub>50</sub>	4,944 nM	4,766 nM	3,264 nM
EC <sub>50</sub> (95%-Konfidenzintervall)	4,793 – 5,100 nM	4,638 – 4,898 nM	3,088 – 3,450 nM
Bestimmtheitsmaß (R <sup>2</sup> )	0,8994	0,9269	0,8904

Abbildung 17: Entwicklungskurven der *C. elegans*-Stämme N2, VC249\_X4 sowie VC249\_X0 in Gegenwart eines IVM-Gradienten mit den Konzentrationen 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 10 nM, *E. coli* OP50- Futterbakterien nicht bei -80 °C vorbehandelt (links oben: Daten X=Log(X) transformiert und nichtlinear Regressionsanalysiert (log(agonist) vs. response – Variable slope (four parameters)), rechts oben: transformierte Daten zusätzlich normalisiert, unten: Angaben beziehen sich auf normalisierte Daten)

Im MOX-Ansatz zeigte der Stamm VC249\_X0 mit einer EC<sub>50</sub> von 2,971 nM die größte, der N2-Bristol-Wildtyp mit einer EC<sub>50</sub> von 3,493 nM die geringste Empfindlichkeit (Abbildung 18). Der Stamm VC249\_X4 (EC<sub>50</sub>: 3,489 nM) zeigte eine dem N2-Bristol-Wildtyp sehr ähnliche Empfindlichkeit, die EC<sub>50</sub>-95%-Konfidenzintervalle der beiden Stämme zeigten Überlappung. Die Entwicklungsrate des Stammes VC249\_X0 betrug im Kontrollansatz ungefähr 70 % und lag damit ca. 20 % unter der des N2-Bristol-Wildtyps und des VC249\_X4.



Stamm	N2	VC249_X4	VC249_X0
log(agonist) vs. response – variable slope			
EC <sub>50</sub>	3,493 nM	3,489 nM	2,971 nM
EC <sub>50</sub> (95%-Konfidenzintervall)	3,345 – 3,647 nM	3,425 – 3,554 nM	2,799 – 3,152 nM
Bestimmtheitsmaß (R <sup>2</sup> )	0,9095	0,9847	0,8736

Abbildung 18: Entwicklungskurven der *C. elegans*-Stämme N2, VC249\_X4 sowie VC249\_X0 in Gegenwart eines MOX-Gradienten mit den Konzentrationen 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 10 nM, *E. coli* OP50- Futterbakterien nicht bei -80 °C vorbehandelt (links oben: Daten X=Log(X) transformiert und nichtlinear Regressions-analysiert (log(agonist) vs. response -- Variable slope (four parameters)), rechts oben: transformierte Daten zusätzlich normalisiert, unten: Angaben beziehen sich auf normalisierte Daten)

Abschließend kann gesagt werden, dass in keinem der vier Ansätze der Stamm VC249\_X4 in seiner Empfindlichkeit gegenüber ML dem VC249\_X0 gleicht. Vielmehr ist eine starke Ähnlichkeit mit der Empfindlichkeit des N2-Bristol-Wildtyp zu erkennen.

### 4.3 Auskreuzung der *cyp-14A5*-Deletionsmutation in den Bristol-N2-Wildtyp

Für die genauere Charakterisierung des Kandidatengens *cyp-14A5* in *C. elegans* (4.2.3) wurde eine vierfache Auskreuzung des teildeliierten Gens (Allel *gk152*) aus dem Stamm VC249 in den N2-Bristol-Wildtyp vorgenommen (3.2.1.3). Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der vier erfolgreichen Auskreuzungsrunden, markiert sind die zur Weiterzucht ausgewählten, für das Allel *gk152* homozygoten Populationen.

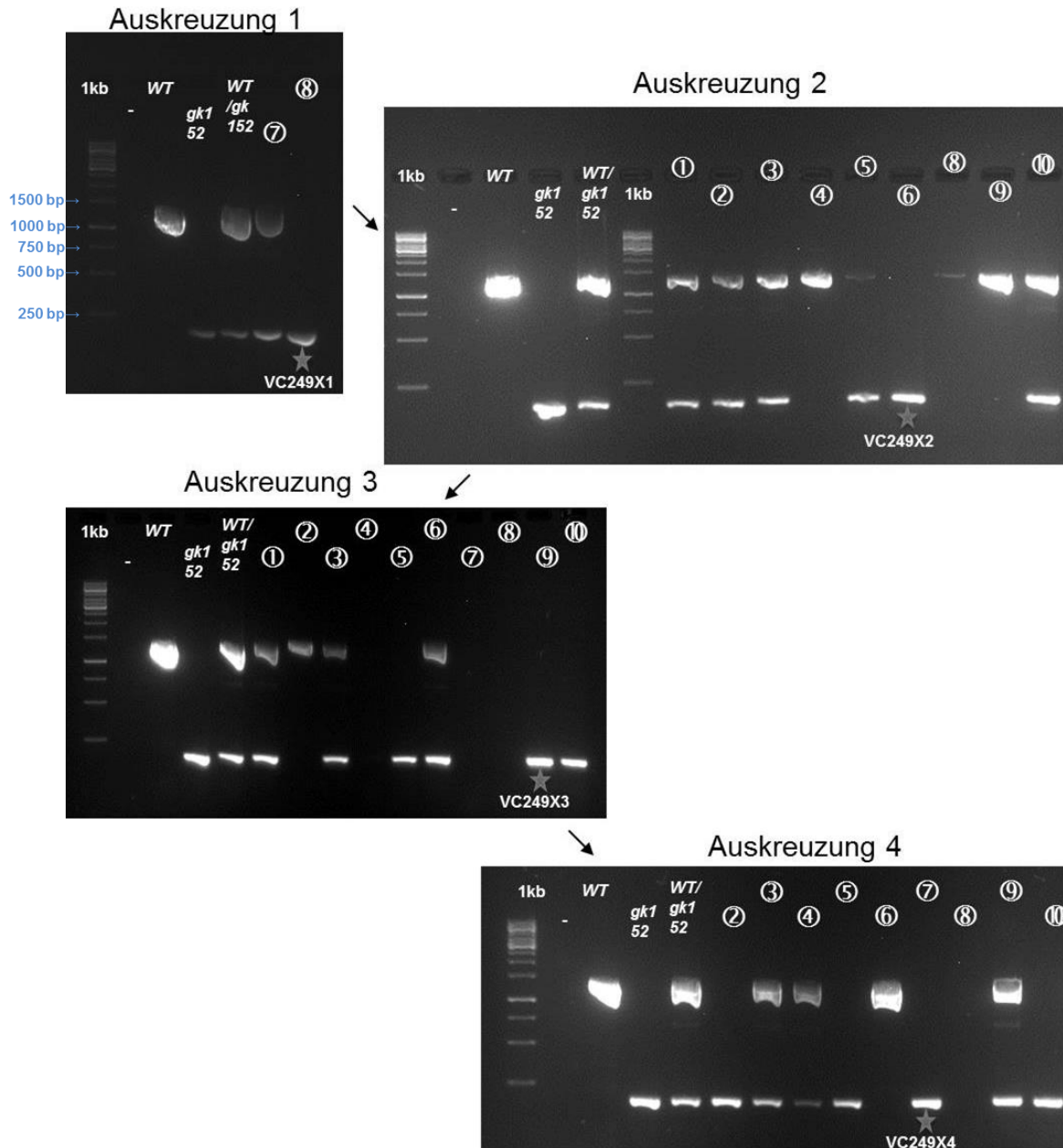


Abbildung 19: Ergebnisse der PCR-Analysen der vier erfolgreichen Auskreuzungen des Allels *gk152* aus dem *C. elegans*-Stamm VC249 in den *C. elegans*-Bristol-N2-Wildtyp) („-“: Negativkontrolle, Positivkontrolle: WT: Wildtyp-Allel, *gk152*: teildeliiertes Allel, WT/*gk152*: Mischansatz. Zahlen in Kreisen bezeichnen *C. elegans*-Teilpopulationen, Sterne die für die nächste Kreuzung ausgewählte *gk152*-Teilpopulation. Für die erste Auskreuzungsrunde sind nur die PCR-Untersuchungen von zwei der zehn Teilpopulationen gezeigt)



#### 4.4 *cyp-14A5*-Expressionsanalyse in *C. elegans*

Zur Untersuchung des Einflusses der ML IVM und MOX auf die Expression des *cyp-14A5*-Gens in *C. elegans* wurde eine quantitative Real-Time-PCR etabliert. Auf die Etablierung folgte die Untersuchung der *cyp-14A5*-Genexpression in mit ML inkubierten N2-Bristol-Wildtyp-Würmern.

##### 4.4.1 Etablierung und Durchführung

##### 4.4.1.1 Klonierung der Ziel- und Referenzgenfragmente

Für die quantitative Real-Time-PCR mussten insgesamt fünf einzelne PCRs etabliert werden: vier für die Referenzgene *ama-1*, *tba-1*, Y45F10D.4 und *pmp-3* sowie eine für das Zielgen *cyp-14A5* (Primer s. Tabelle 2). Am Anfang stand die Durchführung von Temperaturgradienten-PCRs mit Annealing-Temperaturen zwischen 60 und 70 °C zur Gewinnung ausreichender Fragmentmengen für die anschließenden Klonierungen (PCR s. 3.2.3.3.2), als Template für die PCRs diente hierbei cDNA aus dem N2-Bristol-Wildtyp (RNA aus 3.2.3.1.5, cDNA-Synthese: 3.2.3.2.1). Die Ergebnisse der Temperaturgradienten-PCRs sind den Abbildung 20 (*ama-1*), Abbildung 21 (*tba-1*, Y45F10D.4 und *pmp-3*) und Abbildung 22 (*cyp-14A5*) zu entnehmen.

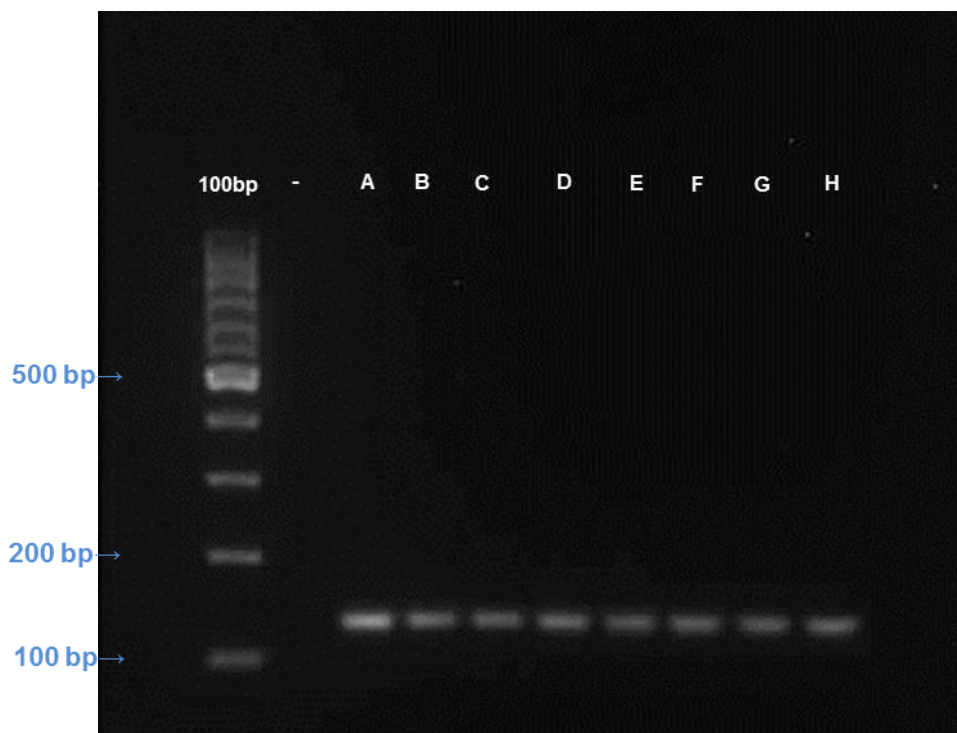


Abbildung 20: PCR-Temperaturgradient für das *ama-1*-Referenzgenfragment („-“: Negativkontrolle. Temperaturgradient: A: 70 °C, B: 69,5 °C, C: 68,4 °C, D: 66,4 °C, E: 64 °C, F: 62,7 °C, G: 60,7 °C, H: 60 °C)



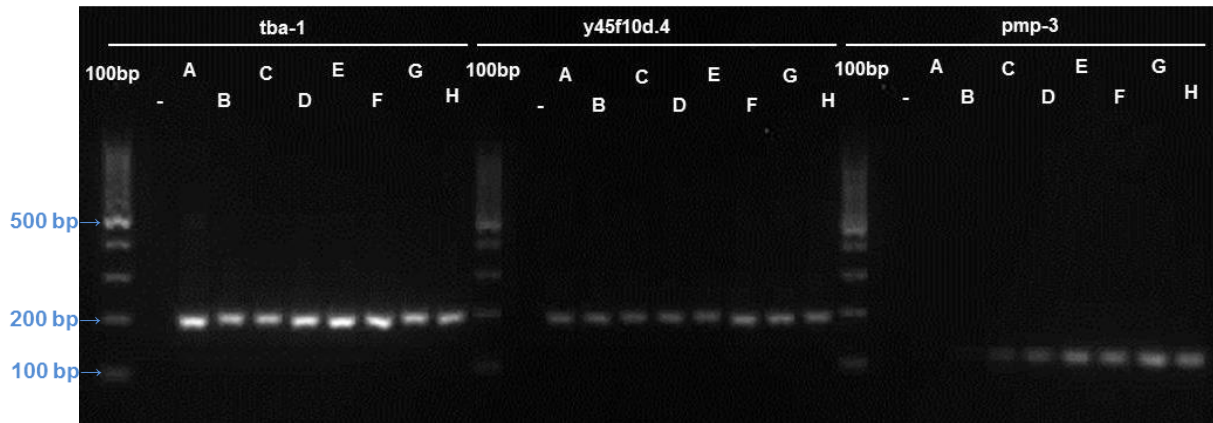


Abbildung 21: PCR-Temperaturgradient für die *tba-1*-, *Y45F10D.4*- und *pmp-3*-Referenzfragmente („-“: Negativkontrolle. Temperaturgradient: A: 70 °C, B: 69,5 °C, C: 68,4 °C, D: 66,4 °C, E: 64 °C, F: 62,7 °C, G: 60,7 °C, H: 60 °C)

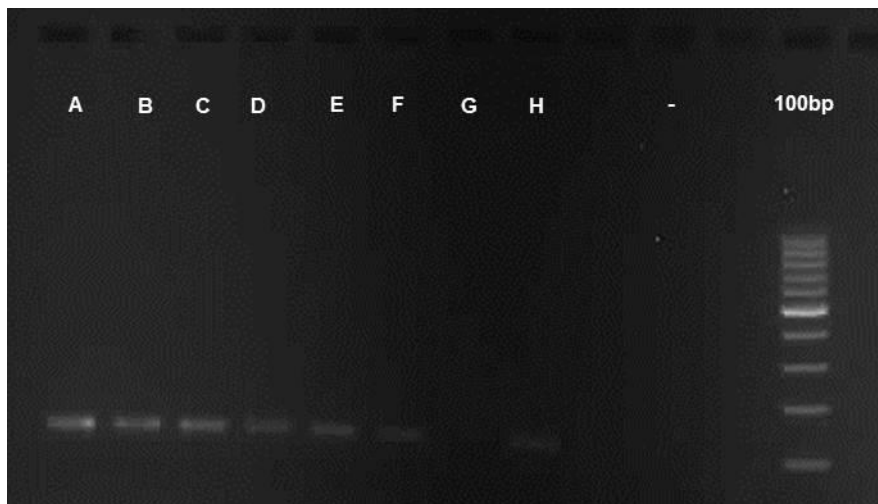
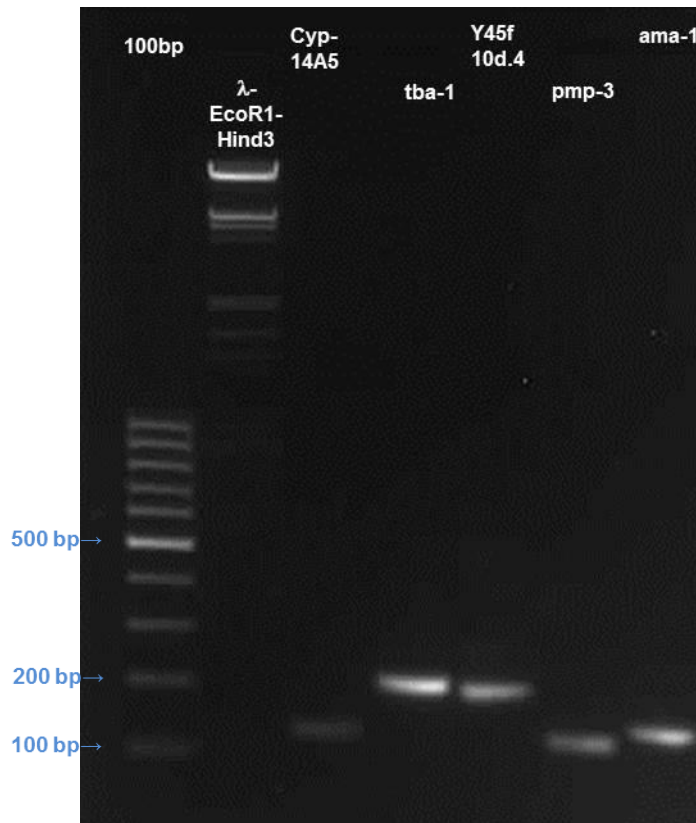


Abbildung 22: PCR-Temperaturgradient für das *cyp-14A5*-Zielfragment („-“: Negativkontrolle. Temperaturgradient: A: 70 °C, B: 69,5 °C, C: 68,4 °C, D: 66,4 °C, E: 64 °C, F: 62,7 °C, G: 60,7 °C, H: 60 °C)

Für die anschließende Klonierung wurden pro Referenz-/Zielgen die deutlichsten Banden ausgewählt und die enthaltende DNA jeweils aus den Gelstücken isoliert, zusammengeführt und aufgereinigt. Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden zur Kontrolle erneut elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 23), außer den Zielfragmenten traten keine weiteren Banden auf und die Größe der Fragmente erwies als unverändert.



**Abbildung 23:** Aus dem Gel extrahierte und aufgereinigte PCR-Produkte der Ziel- und Referenzgenfragmente (*cyp-14A5*, *tba-1*, *Y45F10D.4*, *pmp-3* und *ama-1*)

Nach der erfolgten Klonierung (3.2.3.7.2) wurden pro Ziel-/Referenzgen vier Transformandenkolonien in Flüssigkultur überführt und später der DNA-Isolation zugeführt. Die isolierten Plasmide wurden zur erneuten Überprüfung der Länge der ligierten Fragmente mittels PCR untersucht (3.2.3.3.2). Dabei wurden die isolierten Plasmide 1:1000 verdünnt als Template benutzt, als Positivkontrolle diente cDNA aus dem N2-Bristol-Wildtyp. Die Ergebnisse der PCR-Analyse sind Abbildung 24 (*cyp-14A5* und *Y45F10D.4*) und Abbildung 25 (*pmp-3*, *tba-1* und *ama-1*) zu entnehmen.

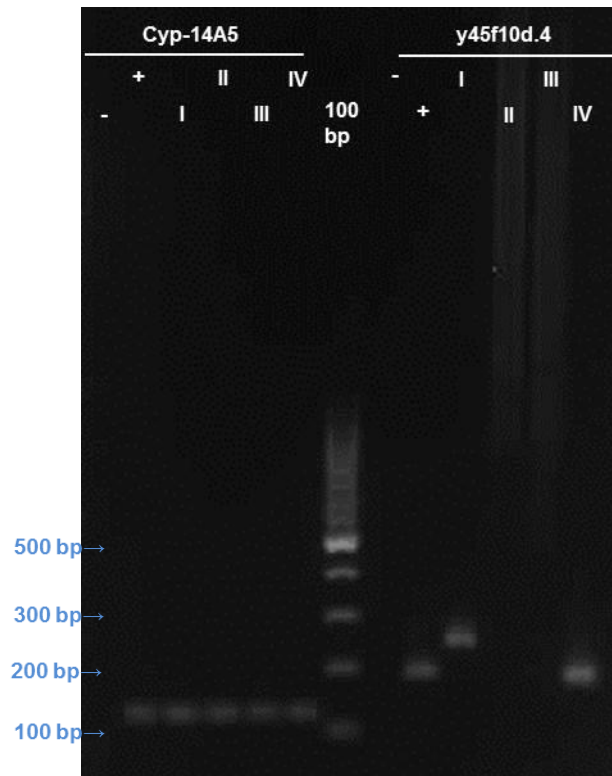


Abbildung 24: PCR-Überprüfung der Identität der Plasmidinserts für je vier Transformandenkolonien aus der Klonierung der *cyp-14A5*- und *Y45F10D.4*-Genfragmente

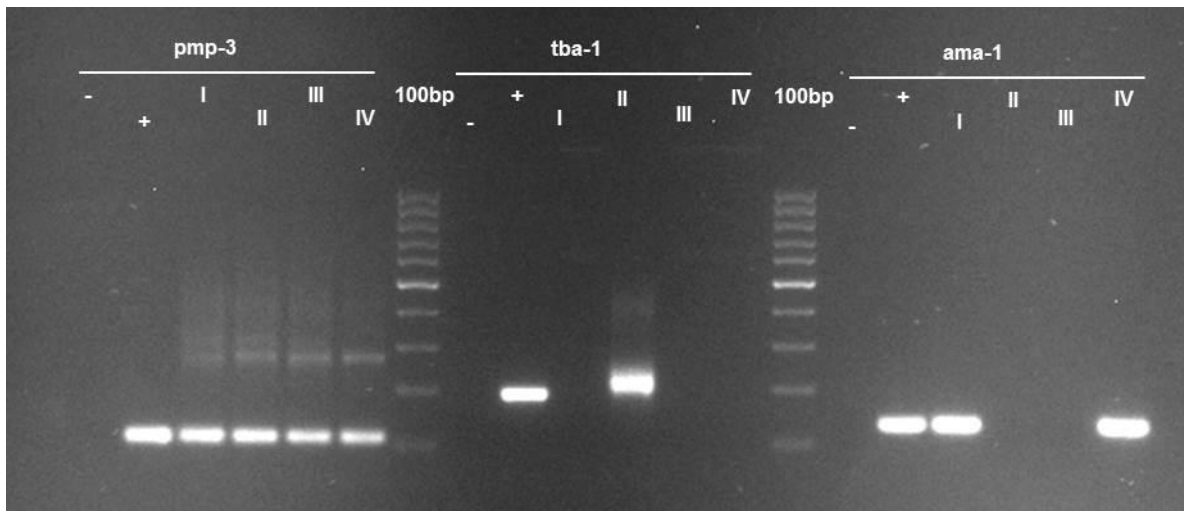


Abbildung 25: PCR-Überprüfung der Identität der Plasmidinserts für je vier Transformandenkolonien aus der Klonierung der *pmp-3*-, *tba-1*- und *ama-1*-Genfragmente

Für die anschließende Sequenzierung (3.2.3.8) wurden pro Ziel-/Referenzgen folgende Plasmidisolationen ausgewählt: *cyp-14A5*: I, *Y45F10D.4*: I, *pmp-3*: I, *tba-1*: II, *ama-1*: I.

Die Ergebnisse der BLASTn-Analyse der sequenzierten Fragmente sind Abbildung 26 (*cyp-14A5* und *Y45F10D.4*) und Abbildung 27 (*ama-1*-, *pmp-3* und *tba-1*) zu entnehmen. In allen fünf Fällen ergab sich eine hundertprozentige Übereinstimmung des sequenzierten Fragments mit

dem entsprechenden Datenbankeintrag hinsichtlich der Sequenzidentität sowie der Fragmentlänge.

Download ▾ GenBank Graphics					
Caenorhabditis elegans Protein CYP-14A5 (cyp-14A5) mRNA, complete cds					
Sequence ID: <a href="#">ref NM_072034.4</a> Length: 1479 Number of Matches: 1					
Range 1: 4 to 139 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <span style="float: right;">▼ Next Match ▲ Previous Match</span>					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
252 bits(136)	6e-66	136/136(100%)	0/136(0%)	Plus/Minus	
Query 40	TATTATCGGCTGGGA	ACTGCAGAAGATTCCC	GAAAAATGGTAGTGG	AAATGGCCCTTTTG	99
Sbjct 139	TATTATCGGCTGGGA	ACTGCAGAAGATTCCC	GAAAAATGGTAGTGG	AAATGGCCCTTTTG	80
Query 100	GATATTTTCTCACTTT	CCAATAAAAAGATAT	CACATATGAAATGATA	AAATACAGATAAAG	159
Sbjct 79	GATATTTTCTCACTTT	CCAATAAAAAGATAT	CACATATGAAATGATA	AAATACAGATAAAG	20
Query 160	CAACGATGAAAACGCT				175
Sbjct 19	CAACGATGAAAACGCT				4

Download ▾ GenBank Graphics					
Caenorhabditis elegans Protein Y45F10D.4 (Y45F10D.4) mRNA, complete cds					
Sequence ID: <a href="#">ref NM_070257.3</a> Length: 462 Number of Matches: 1					
Range 1: 105 to 295 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <span style="float: right;">▼ Next Match ▲ Previous Match</span>					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
353 bits(191)	2e-96	191/191(100%)	0/191(0%)	Plus/Plus	
Query 1	CGAGAACCCGCGAAAT	GTCGGATCACTTGACA	AAGAACGATCCAAGCG	TCCGGAACAGGAAT	60
Sbjct 105	CGAGAACCCGCGAAAT	GTCGGATCACTTGACA	AAGAACGATCCAAGCG	TCCGGAACAGGAAT	164
Query 61	CGTCGGCGCTCCAGCT	TGTGGAGATGTCATGAA	ATTGCAGATTCGAGTC	GACGATAACGG	120
Sbjct 165	CGTCGGCGCTCCAGCT	TGTGGAGATGTCATGAA	ATTGCAGATTCGAGTC	GACGATAACGG	224
Query 121	AAAAATCATCGAAGCCA	AAATCAAACATTCGGAT	GTGGAAAGTCAATTGC	CCTCATCTTC	180
Sbjct 225	AAAAATCATCGAAGCCA	AAATCAAACATTCGGAT	GTGGAAAGTCAATTGC	CCTCATCTTC	284
Query 181	CCTGGCAACCG				191
Sbjct 285	CCTGGCAACCG				295

Abbildung 26: BLASTn-Analyse der sequenzierten *cyp-14A5*- und Y45F10D.4-Genfragmentplasmidinserts

Download ▾ GenBank Graphics					
Caenorhabditis elegans DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1 ( <i>ama-1</i> ), partial mRNA					
Sequence ID: <a href="#">ref NM_068122.6 </a> Length: 5571 Number of Matches: 1					
Range 1: 4041 to 4173 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <span style="float: right;">▾ Next Match ▲ Previous Match</span>					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
246 bits(133)	5e-62	133/133(100%)	0/133(0%)	Plus/Minus	
Query 1	TGCCAAATGTCGGTAATTGACATAGGATCCGTCGAACGAGATGACATTGTCCATTTCTCG				60
Sbjct 4173	TGCCAAATGTCGGTAATTGACATAGGATCCGTCGAACGAGATGACATTGTCCATTTCTCG				4114
Query 61	CTCGATAGCCTTTCTGACCGCCTCGATTCCGAGCACTTCAAAGATCTCGCAGATATCGTT				120
Sbjct 4113	CTCGATAGCCTTTCTGACCGCCTCGATTCCGAGCACTTCAAAGATCTCGCAGATATCGTT				4054
Query 121	GGATGTCGTTTCCA	133			
Sbjct 4053	GGATGTCGTTTCCA	4041			

Download ▾ GenBank Graphics					
Caenorhabditis elegans Peroxisomal Membrane Protein related ( <i>pmp-3</i> ), partial mRNA					
Sequence ID: <a href="#">ref NM_001269679.1 </a> Length: 1983 Number of Matches: 1					
Range 1: 847 to 961 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <span style="float: right;">▾ Next Match ▲ Previous Match</span>					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
213 bits(115)	6e-52	115/115(100%)	0/115(0%)	Plus/Minus	
Query 1	ACACCGTCGAGAAGCTGTAGATGAGGTACAGGTAGAAGAATGCATTCGGTGAACAATTC				60
Sbjct 961	ACACCGTCGAGAAGCTGTAGATGAGGTACAGGTAGAAGAATGCATTCGGTGAACAATTC				902
Query 61	CATTCAATTCTGCAGGTGAAACGTCGTCATAGAGATGAGTGATGAACACGGGAAC	115			
Sbjct 901	CATTCAATTCTGCAGGTGAAACGTCGTCATAGAGATGAGTGATGAACACGGGAAC	847			

Download ▾ GenBank Graphics					
Caenorhabditis elegans TuBulin, Alpha ( <i>tba-1</i> ), partial mRNA					
Sequence ID: <a href="#">ref NM_001264284.1 </a> Length: 1350 Number of Matches: 1					
Range 1: 977 to 1168 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <span style="float: right;">▾ Next Match ▲ Previous Match</span>					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
355 bits(192)	9e-95	192/192(100%)	0/192(0%)	Plus/Plus	
Query 21	TCAACACTGCCATCGCCGCCATCAAGACCAAGAGAACCATTCAATTCGTTGACTGGTGCC				80
Sbjct 977	TCAACACTGCCATCGCCGCCATCAAGACCAAGAGAACCATTCAATTCGTTGACTGGTGCC				1036
Query 81	CAACTGGATTCAAGGTCGGAATCAACTACCAGCCACCAACTGTTGTTCCAGGAGGAGATC	140			
Sbjct 1037	CAACTGGATTCAAGGTCGGAATCAACTACCAGCCACCAACTGTTGTTCCAGGAGGAGATC	1096			
Query 141	TCGCCAAGGTACCACGTGCCGTATGTAIGCTCTCCAACACCACCGCCATCGCTGAAGCCT	200			
Sbjct 1097	TCGCCAAGGTACCACGTGCCGTATGTAIGCTCTCCAACACCACCGCCATCGCTGAAGCCT	1156			
Query 201	GGTTCGCTTGG	212			
Sbjct 1157	GGTTCGCTTGG	1168			

Abbildung 27: BLASTn-Analyse der sequenzierten *ama-1*-, *pmp-3* und *tba-1*-Genfragmentplasmidinserts

Im Anschluss wurden die Ursprungskulturen der fünf sequenzierten Plasmide einem Midiprep-Verfahren (3.2.3.1.4) zugeführt, um ausreichende Mengen Plasmid-DNA für die folgenden Real-Time-PCR-Analysen zu gewinnen.

#### 4.4.1.2 Etablierung und Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR

Zu Beginn der Etablierung der quantitativen Real-Time-PCR wurde eine Temperaturgradienten-Real-Time-PCR mit Annealing-Temperaturen zwischen 58 und 66 °C für die fünf Ziel-/Referenzgenfragmente durchgeführt, um die optimale Konsens-Annealing-Temperatur zu bestimmen. Als Templates dienten dabei die Plasmidpräparationen aus dem Midiprep-Verfahren, nach Erfahrungen aus Vorversuchen wurden diese 1:1000 verdünnt eingesetzt. Die Real-Time-PCR wurde wie in Kapitel 3.2.3.9.2 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse der Temperaturgradient-Real-Time-PCR für die einzelnen Ziel-/Referenzgene in Form von Cq-Werten sind Abbildung 28 zu entnehmen.

A	Sample	<b>tba-1</b>	<b>y45...</b>	<b>pmp-3</b>	<b>Cyp14A5</b>	<b>ama-1</b>	T <sub>a</sub> : 66,0 °C
	Cq	<b>13,19</b>	<b>12,98</b>	<b>15,46</b>	<b>16,03</b>	<b>19,87</b>	
B	Sample	<b>tba-1</b>	<b>y45...</b>	<b>pmp-3</b>	<b>Cyp14A5</b>	<b>ama-1</b>	T <sub>a</sub> : 65,6 °C
	Cq	<b>12,85</b>	<b>12,94</b>	<b>15,70</b>	<b>15,66</b>	<b>18,44</b>	
C	Sample	<b>tba-1</b>	<b>y45...</b>	<b>pmp-3</b>	<b>Cyp14A5</b>	<b>ama-1</b>	T <sub>a</sub> : 64,7 °C
	Cq	<b>13,18</b>	<b>13,12</b>	<b>15,66</b>	<b>15,36</b>	<b>16,81</b>	
D	Sample	<b>tba-1</b>	<b>y45...</b>	<b>pmp-3</b>	<b>Cyp14A5</b>	<b>ama-1</b>	T <sub>a</sub> : 63,1 °C
	Cq	<b>13,19</b>	<b>13,14</b>	<b>15,75</b>	<b>15,21</b>	<b>15,94</b>	
E	Sample	<b>tba-1</b>	<b>y45...</b>	<b>pmp-3</b>	<b>Cyp14A5</b>	<b>ama-1</b>	T <sub>a</sub> : 61,2 °C
	Cq	<b>13,09</b>	<b>13,12</b>	<b>16,13</b>	<b>15,40</b>	<b>16,16</b>	
F	Sample	<b>tba-1</b>	<b>y45...</b>	<b>pmp-3</b>	<b>Cyp14A5</b>	<b>ama-1</b>	T <sub>a</sub> : 59,6 °C
	Cq	<b>13,07</b>	<b>13,06</b>	<b>16,24</b>	<b>15,29</b>	<b>16,87</b>	
G	Sample	<b>tba-1</b>	<b>y45...</b>	<b>pmp-3</b>	<b>Cyp14A5</b>	<b>ama-1</b>	T <sub>a</sub> : 58,5 °C
	Cq	<b>13,14</b>	<b>13,16</b>	<b>16,42</b>	<b>15,52</b>	<b>17,24</b>	
H	Sample	<b>Neg Ctrl</b>	<b>Neg Ctrl</b>	<b>Neg Ctrl</b>	<b>Neg Ctrl</b>	<b>Neg Ctrl</b>	T <sub>a</sub> : 58,0 °C
	Cq	<b>N/A</b>	<b>N/A</b>	<b>N/A</b>	<b>N/A</b>	<b>N/A</b>	

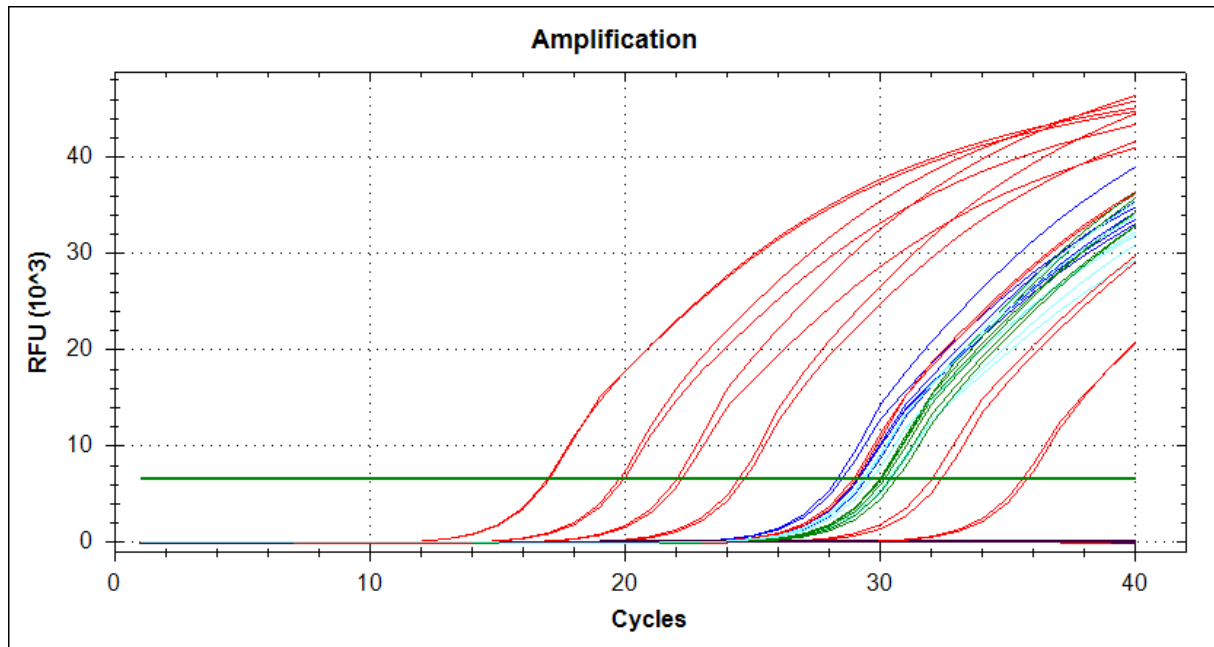
Abbildung 28: Real-Time-PCR mit Annealing-Temperaturgradient für die Ziel- und Referenzgenfragmente von *tba-1*, *Y45F10D.4*, *pmp-3*, *cyp-14A5* und *ama-1*. Angegeben sind reine Cq-Werte. (Plasmidtemplates wurden 1:1000 verdünnt)

Als Annealing-Temperatur für alle folgenden qPCR-Assays wurde 62,0 °C gewählt. Nach Evaluierung des Plasmid-DNA-Gradienten (serielle Verdünnungen von  $4 \times 10^7$  bis  $4 \times 10^0$  Kopien pro 1 µl von jedem Ziel-/Referenzgenplasmid) war die quantitative Real-Time-PCR einsatzbereit.

Die Inkubation der *C. elegans*-N2-Bristol-Wildtyp-Würmer mit IVM und MOX wurde wie in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben vorgenommen. Die Extraktion der RNA ist Kapitel 3.2.3.1.7 zu entnehmen, die Herstellung der cDNA in Kapitel 3.2.3.2.2.

In Abbildung 29 ist exemplarisch der Verlauf einer quantitativen Real-Time-PCR für das Zielgen *cyp-14A5* gezeigt. Deutlich zu erkennen sind die rot dargestellten Kurven des

Plasmidgradienten, von den acht Verdünnungsstufen sind nur die ersten sieben oberhalb des Cut-Off-Wertes detektiert worden. Die Negativkontrollen (schwarze Kurven) liegen allesamt unter dem Cut-Off-Wert. Die drei zu untersuchenden Inkubationsprobengruppen (Kurvenfarben: türkis: nicht-behandelter Kontrollansatz, blau: IVM-behandelter Ansatz, grün: MOX-behandelter Ansatz) liegen in einem Feld von Cq-Werten zwischen 28,3 und 30,62.



**Abbildung 29:** Verlauf einer quantitativen Real-Time-PCR für das Zielgen *cyp-14A5* über 40 Zyklen (Kurven: rot: Plasmid-DNA-Gradient, schwarz: Negativkontrollen, türkis: nicht-behandelter Kontrollansatz, blau: IVM-behandelter Ansatz, grün: MOX-behandelter Ansatz. Waagerechte grüne Linie indiziert Cut-Off-Wert. Nicht gezeigt sind die Kurven des „cDNA-Mix“-Ansatzes)

Die Effizienzen der Plasmidgradienten der verschiedenen Referenzgene und des Zielgens sind Tabelle 14 zu entnehmen.

**Tabelle 14:** Effizienzen der Referenz- und Zielgenplasmidgradienten (nach Angaben von CFX Manager™ Software Gene Study)

Fragment	Effizienz (%)
<i>ama-1</i>	102,1
<i>cyp-14A5</i>	105,8
<i>pmp-3</i>	100,6
<i>tba-1</i>	95,6
Y45F10D.4	99,3

Neben der reinen Detektion wurden auch Schmelztemperaturanalysen der fünf Ziel-/Referenzgenfragmente durchgeführt (Tabelle 15).



Tabelle 15: Ergebnisse der Schmelztemperaturanalyse der Referenz- und Zielgenfragmente

Fragment	Schmelztemperatur
<i>ama-1</i>	81,5 - 82 °C
<i>cyp-14A5</i>	77,5 °C
<i>pmp-3</i>	79 - 79,5 °C
<i>tba-1</i>	85 °C
Y45F10D.4	82,5 - 83 °C

Abschließend kann gesagt werden, dass die Etablierung der quantitativen Real-Time-PCR für die Detektion des Zielgens *cyp-14A5* sowie der Referenzgene Y45F10D.4, *pmp-3*, *tba-1* und *ama-1* erfolgreich war.

#### 4.4.2 Ergebnis der *cyp-14A5*-Expressionsanalyse

Nach Durchführung der quantitativen Real-Time-PCRs für die Proben aller drei biologischen Replikate und der Verrechnung der Einzelergebnisse mittels der Software Bio-Rad CFX Manager ergab sich das in Abbildung 30 gezeigte Ergebnis:

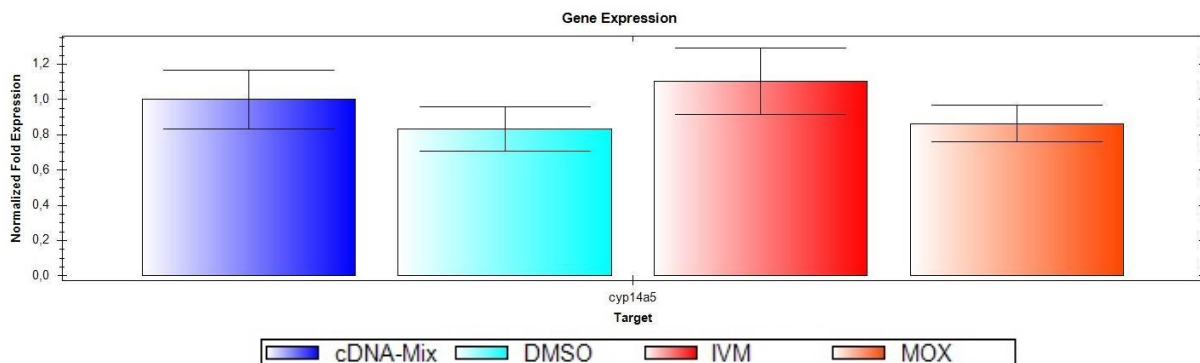


Abbildung 30: Ergebnis der *cyp-14A5*-Expressionsanalyse in den Inkubationsansätzen *C. elegans* N2-Bristol-Wildtyp mit DMSO (Kontrollansatz), IVM und MOX. Der Ansatz „cDNA-Mix“ diente der Verrechnung der verschiedenen Einzel-PCR-Analysen. (normalized expression, Fehlerbalken indizieren Standardfehler)

Es zeigte sich, dass die Expression von *cyp-14A5* in den drei Inkubationsansätzen (DMSO (Kontrollansatz), IVM und MOX) stark ähnelt und die Mittelwerte der normalisierten Expression bei sich überlappenden Standardfehlern nur um 0,2 voneinander abwichen. Durch die überlappenden Standardfehler kann eine signifikante Unterschiedlichkeit der Expression in den drei Ansätzen ausgeschlossen werden.

Abschließend kann gesagt werden, dass das *cyp-14A5*-Gen beim *C. elegans* N2-Bristol-Wildtyp bei einer den kompletten Entwicklungszyklus begleitenden Inkubation mit IVM (2 nM) oder MOX (1,5 nM) keine signifikanten Expressionsänderungen im Vergleich zur nicht mit ML behandelten Kontrollgruppe erfährt.



## 4.5 Phylogenetische Untersuchungen: *cyp-14A*-homologe Gene in parasitischen Nematoden

Auf Grundlage der Ergebnisse der *C. elegans*-Entwicklungsassays (4.2.3) sollte das als Kandidatengen angesprochene *cyp-14A5* weiterführend untersucht werden. Hierzu gehörte auch eine Suche nach homologen Genen in parasitischen Nematoden. Auf Grundlage dieser Informationen wurden nachfolgend degenerierte Primer für die Suche nach homologen Genen in der cDNA parasitischer Nematoden erstellt.

### 4.5.1 *In silico*-Suche nach *cyp-14A*-Homologen

Im Rahmen der *in silico*-Suche nach *cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden wurde das CYP-14A5 auf Sequenzebene mittels verschiedener BLAST-Verfahren mit den Genomen parasitischer Nematoden verglichen.

#### 4.5.1.1 Local-BLAST gegen das *H. contortus* Genom (PRJEB506)

Beruhend auf den Sequenzen des Genoms von *H. contortus* (Accession: PRJEB506; beschrieben von (Laing, Kikuchi et al. 2013)) wurde mittels der Software BioEdit ein local-BLASTP durchgeführt. Dabei wurde die AA-Sequenz des CYP-14A5 mit den in der Datei „hc\_finalgenemodels\_renamed.aa“ verfügbaren Sequenzen („AA sequence for coding sequences of gene models“) abgeglichen.

BLASTP 2.2.10 [Oct-19-2004]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

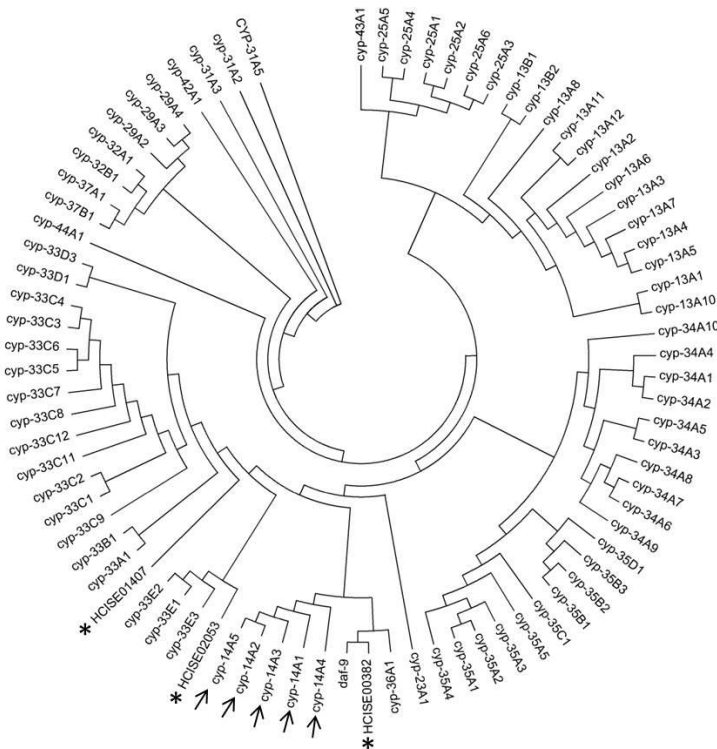
Query=  
(492 letters)

Database: C:\Program  
Files\BioEdit\database\Hc\_finalgenemodels\_renamed.aa  
24,781 sequences; 10,044,144 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
HCISE00382500.t1_1	285	4e-077
HCISE02053000.t1_1	265	4e-071
HCISE01407900.t1_1	249	2e-066

**Abbildung 31: Ergebnisse der local-BLASTP-Analyse der CYP-14A5-AA-Sequenz gegen das *H. contortus*-Genom (PRJEB506)**

Die local-BLASTP-Analyse ergab drei Treffer in der untersuchten Version des *H. contortus*-Genoms. Die AA-Sequenzen dieser drei Treffer wurden zusammen mit dem *C. elegans*-CYPom in einen phylogenetischen Baum gerechnet (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Phylogenetischer Baum der *C. elegans* CYPs und der ersten drei Hits des *H. contortus* local-BLAST (AA-Sequenzen; Pfeile zeigen *C. elegans*-CYP-14A-Familie, Sterne zeigen Fundsequenzen)**

Dem phylogenetischen Baum ist zu entnehmen, dass keine der drei gefundenen Sequenzen im Schwestergruppenverhältnis zu oder innerhalb der *C. elegans*-CYP-14A-Gruppe steht.

#### 4.5.1.2 NCBI-BLAST

Hierbei wurde ein NCBI-TBLASTN durchgeführt, die AA-Sequenz des CYP-14A5 wurde mit den bekannten Sequenzen des Taxons Nematoda mit Ausnahme des Taxons *Caenorhabditis* abgeglichen.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Strongyloides ratti, WGS project CACX01000000 data, strain ED321 Heterogonic, contig RATTI_contig_74345	281	325	96%	1e-80	32%	<a href="#">CACX01001912.1</a>
Strongyloides ratti, WGS project CACX01000000 data, strain ED321 Heterogonic, contig RATTI_contig_75037	231	552	98%	4e-80	36%	<a href="#">CACX01002003.1</a>
Panagrellus redivivus	278	278	98%	5e-79	32%	<a href="#">AOMH01002000.1</a>
Strongyloides ratti, WGS project CACX01000000 data, strain ED321 Heterogonic, contig RATTI_contig_75488	277	277	87%	9e-79	36%	<a href="#">CACX01002159.1</a>
Strongyloides ratti, WGS project CACX01000000 data, strain ED321 Heterogonic, contig RATTI_contig_74970	270	270	99%	2e-76	33%	<a href="#">CACX01001956.1</a>
Strongyloides ratti, WGS project CACX01000000 data, strain ED321 Heterogonic, contig RATTI_contig_75308	269	269	89%	5e-76	33%	<a href="#">CACX01002061.1</a>

**Abbildung 33: Ergebnisse des NCBI-TBLASTN von CYP-14A5 gegen das gesamte Taxon Nematoda mit Ausnahme der *Caenorhabditis*-Gruppe (alles AA-Sequenzen)**

Unter den ersten sechs Treffern fanden sich fünf Contig-Einträge zu *Strongyloides ratti*, die insgesamt 13 verschiedene Sequenzen enthielten. Zusammen mit den *C. elegans*-CYP-AA-Sequenzen wurde ein phylogenetischer Baum berechnet:



BLASTP matches:	BLAST e-value	Species	Hit	Other Orthologs:	Species	Ortholog
	1e-228	<i>C. elegans</i>	WP:CE03474		<i>M. musculus</i>	ENSEMBL:ENSMUSP00000026
	2.8e-215	<i>C. remanei</i>	RP:RP16636		<i>H. contortus</i>	HCOI01920700.t2
	7.91e-209	<i>C. brenneri</i>	CN:CN15552		<i>C. sp.11</i>	Csp11.Scaffold629.g10131.t1
	8.3e-208	<i>C. briggsae</i>	BP:CBP01341		<i>C. angaria</i>	Cang_2012_03_13_00064.g313
	9.91e-205	<i>C. japonica</i>	JA:JA44229		<i>C. sp.5</i>	Csp5_scaffold_07844.g3819
	4e-104	<i>P. pacificus</i>	PP:PP38627		<i>B. xylophilus</i>	BUX.c08583.1
	3.1e-77	<i>B. malayi</i>	BM:BM23014		<i>C. sp.5</i>	Csp5_scaffold_01729.g2276
	3.9e-73	<i>M. musculus</i>	SW:Q91W64		<i>H. contortus</i>	HCOI01920700.t1
	1.2e-68	<i>H. sapiens</i>	ENSEMBL:ENSP00		<i>A. suum</i>	GS_22886
	4e-52	<i>D. melanogaster</i>	FLYBASE:CG6816			

Abbildung 35: Ergebnisse der BLASTP-Analyse des *C. elegans*-CYP-14A5 nach wormbase.org (Stand: 13.11.2013; die Abbildung ist aus dem Laborbuch gescannt, da die digitale Version unbrauchbar war)

Zusammen mit den *C. elegans*-CYP-AA-Sequenzen wurde ein phylogenetischer Baum berechnet:

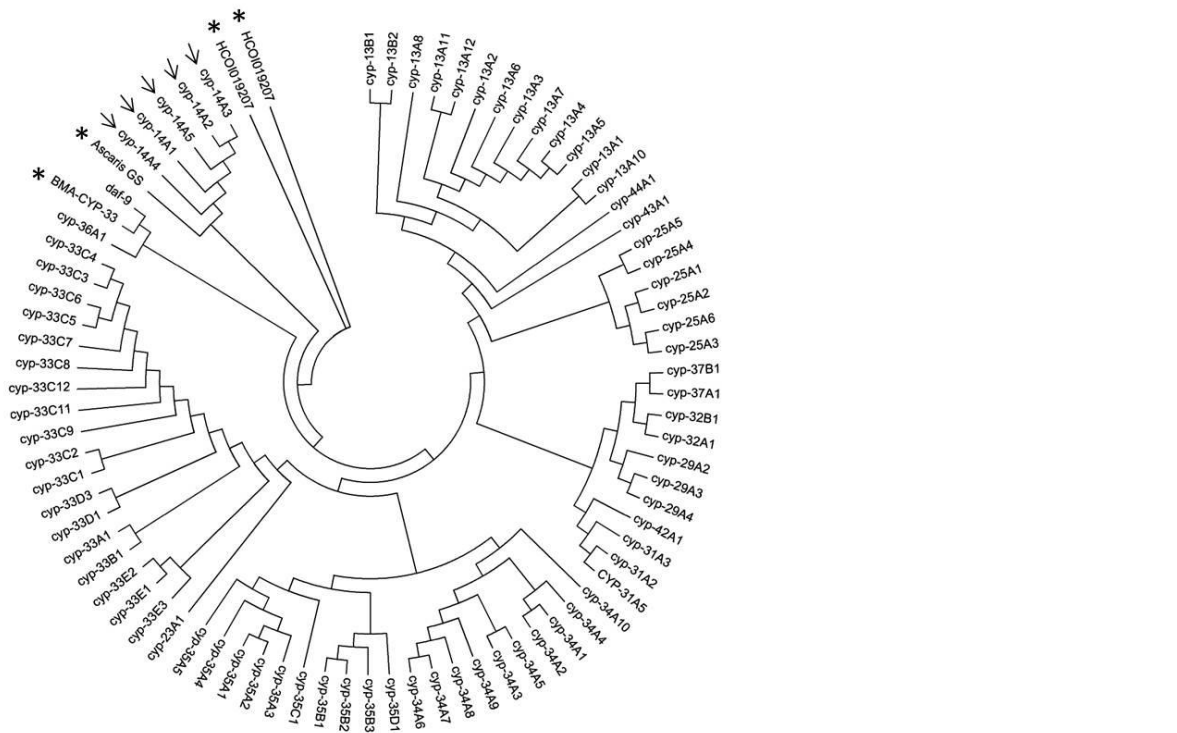


Abbildung 36: Phylogenetischer Baum der *C. elegans*-CYPs und der vier Sequenzen (*Brugia malayi*, *H. contortus*, *A. suum*) aus der wormbase.org-Homologieübersicht (AA-Sequenzen; Pfeile zeigen *C. elegans*-CYP-14A-Familie, Sterne zeigen Fundsequenzen)

Dem phylogenetischen Baum (Abbildung 36) ist zu entnehmen, dass von den vier Sequenzen die aus *A. suum* im Schwestergruppenverhältnis zur *C. elegans*-CYP-14A-Gruppe steht.

#### 4.5.1.4 NemaBLAST

Im auf der Website <http://nematode.net> verfügbaren NemaBLAST (Variante: „vs transcript contigs, isotigs & genes“) wurde in einer TBLASTN-Analyse die AA-Sequenz des CYP-14A5 gegen die NemaGene-Datensätze von *Trichinella spiralis*, *Trichuris vulpis*, *Trichuris muris*, *A. suum*, *Brugia malayi*, *Dirofilaria immitis*, *Onchocerca volvulus*, *Toxocara canis*, *Strongyloides ratti*, *Strongyloides stercoralis*, *Dictyocaulus viviparus*, *O. ostertagi* und *T. circumcincta* abgeglichen (die Optionen „Filtering“ und „Masking“ wurden deaktiviert).

```
TBLASTN 2.0MP-washu [04-May-2006] [linux26-x64-I32LPF64 2006-05-10T17:22:28]
Copyright (C) 1996-2006 Washington University, Saint Louis, Missouri USA.
All Rights Reserved.
Reference: Gish, W. (1996-2006) http://blast.wustl.edu
Query= CYP-14A5
      (492 letters)
Database: stercoralisNemaGene spiralisNemaGene vulpisNemaGene suumNemaGene
          rattinNemaGene immitisNemaGene
          PRED_and_GSCACCONTIGS_and_BenDatuEST.fna BMA1.cds ostertagiNemaGene
          canisNemaGene murisNemaGene Dictyocaulusviviparus_NemaGene
          OnchocercaVolvulus... (truncated)
          356,661 sequences; 255,898,657 total letters.
Searching...10....20....30....40....50....60....70....80....90....100% done

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:
                                     Reading High   Smallest
                                     Frame Score Probability
                                     N
ASCF_3847_1990 284 1479 228 Cytochrome_P450_family_member... +3 1050 8.4e-106 1
Oost_isotig04624 gene=isogroup00607 length=1573 numCon... -1 888 5.3e-98 2
Oost_isotid04626 aene=isoaroup00607 lenath=1573 numCon... -1 888 5.3e-98 2
```

Abbildung 37: Die ersten drei Ergebnisse der NemaBLAST-TBLASTN-Analyse des *C. elegans*-CYP-14A5

Unter den Ergebnissen der TBLASTN-Analyse (Abbildung 37) fanden sich neben einer Sequenz aus *A. suum* mehrere Sequenzen aus *O. ostertagi*, wobei letztere zum Zeitpunkt der Analyse nicht online abrufbar waren. Die Berechnung des phylogenetischen Baumes wurde auf Grundlage der *A. suum*-Sequenz und der *C. elegans*-CYP-Sequenzen durchgeführt (AA-Sequenzen).

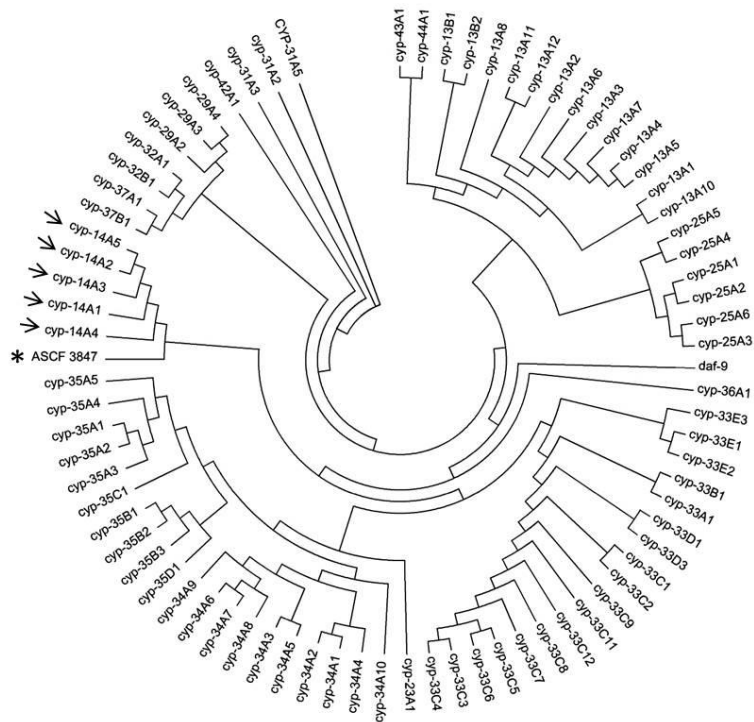


Abbildung 38: Phylogenetischer Baum der *C. elegans* CYPs und der *A. suum*-Sequenz aus der NemaBLAST-TBLASTN-Analyse (AA-Sequenzen; Pfeile zeigen *C. elegans*-CYP-14A-Familie, Sterne zeigen Fundsequenzen)

Dem phylogenetischen Baum ist zu entnehmen, dass die *A. suum*-Sequenz im Schwestergruppenverhältnis zur *C. elegans*-CYP-14A-Gruppe steht.

#### 4.5.1.5 Alignment der beiden *A. suum*-Sequenzen aus wormbase.org und NemaBLAST

Zur genaueren Analyse der beiden *A. suum*-Sequenzen, die im phylogenetischen Baum jeweils im Schwestergruppenverhältnis zur *C. elegans*-CYP-14A-Gruppe standen (s. 4.5.1.3 und 4.5.1.4), wurde ein Alignment mittels des Softwaretools MUSCLE berechnet (Abbildung 39). Diesem ist zu entnehmen, dass die beiden Sequenzen starke Ähnlichkeit aufweisen, die durch die NemaBLAST-TBLASTN-Analyse gefundene Sequenz allerdings deutlich länger ist. Sie wurde zusammen mit den Sequenzen der *C. elegans*-cyp-14A-Gruppe für die Erstellung der degenerierten Primer (3.1.5.1) herangezogen.



```

Ascaris_GS22886_Wormbase      MILPALAILSLLLILYILSYKQVNSRYPKGPFVPLPLIGNLHQIEMKYKTHLYLERLSKVYGP
Ascaris_ASCF_3847_NemaBlast  MILPALAILSLLLILYILSYKQVNSRYPKGPFVPLPLIGNLHQIEMKYKTHLYLERLSKVYGP
*****

Ascaris_GS22886_Wormbase      VFTIFLPKPTVITRFDALKEALLKKGIDFAGRPDGYPDVVFQGTENGIIIFSQGENWME
Ascaris_ASCF_3847_NemaBlast  VFTIFLPKPTVITRFDALKEALLKKGIDFAGRPDGYPDVVFQGTENGIIIFSQGENWME
*****

Ascaris_GS22886_Wormbase      QRRTSLHILRDLGLGKQVVEQQVLRSDVDFLHQLEAETDKDHIDFRWPIQFCVANVITEI
Ascaris_ASCF_3847_NemaBlast  QRRTSLHILRDLGLGKQVVEQQVLRSDVDFLHQLEAETDKDHIDFRWPIQFCVANVITEI
*****

Ascaris_GS22886_Wormbase      LFGYHHDHNDCEEFKRIAEIVRSVVGDVRSRHKMIYFAQQFPPIIAKIPIVNRFVRRITTE
Ascaris_ASCF_3847_NemaBlast  LFGYHHDHNDCEEFKRIAEIVRSVVGDVRSRHKMIYFAQQFPPIIAKIPIVNRFVRRITTE
*****

Ascaris_GS22886_Wormbase      AEKVRKYFFNAL-----
Ascaris_ASCF_3847_NemaBlast  AEKVKQYVRSEVDKHIREYDANSQAETFIHAYLSEMAKVGRRLSYEQLVDIATDFFLAGM
****:.*. . :

Ascaris_GS22886_Wormbase      -----
Ascaris_ASCF_3847_NemaBlast  ETTTTTLRWGVLLMVAYNVDVQEKMRREEIFSIVGREVERMVDKPNMPYCSAVIMEVQRIA

Ascaris_GS22886_Wormbase      -----
Ascaris_ASCF_3847_NemaBlast  NILPFNVLHRTLRETTIANKQIPNDTLVLAQISTILSSSPVFEENIFQPMRFLHEDGKT

Ascaris_GS22886_Wormbase      -----
Ascaris_ASCF_3847_NemaBlast  FRKDTMEHFIPFGIGKRQCAGEPLARVELFLIFTNLLRKYRLEVPPDGYLPNLDPIPAAL

Ascaris_GS22886_Wormbase      -----
Ascaris_ASCF_3847_NemaBlast  AFPRNYNVKIVPL
    
```

Abbildung 39: Alignment der beiden *A. suum* Sequenzen (via MUSCLE)

#### 4.5.2 Detektion von *cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden mittels PCR mit degenerierten Primern

Zur Detektion von *C. elegans-cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden wurden PCR-Ansätze unter Verwendung von degenerierten Primern (3.1.5.1) durchgeführt. Insgesamt wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt, in der ersten Versuchsreihe wurde cDNA, hergestellt aus der RNA nativer Nematoden, als Template für die PCR verwendet (3.1.10). In der zweiten Versuchsreihe wurde ausschließlich mit cDNA gearbeitet, die aus zuvor in IVM-Lösung inkubierten *C. oncophora* L3 (3.2.2.2) hergestellt wurde.

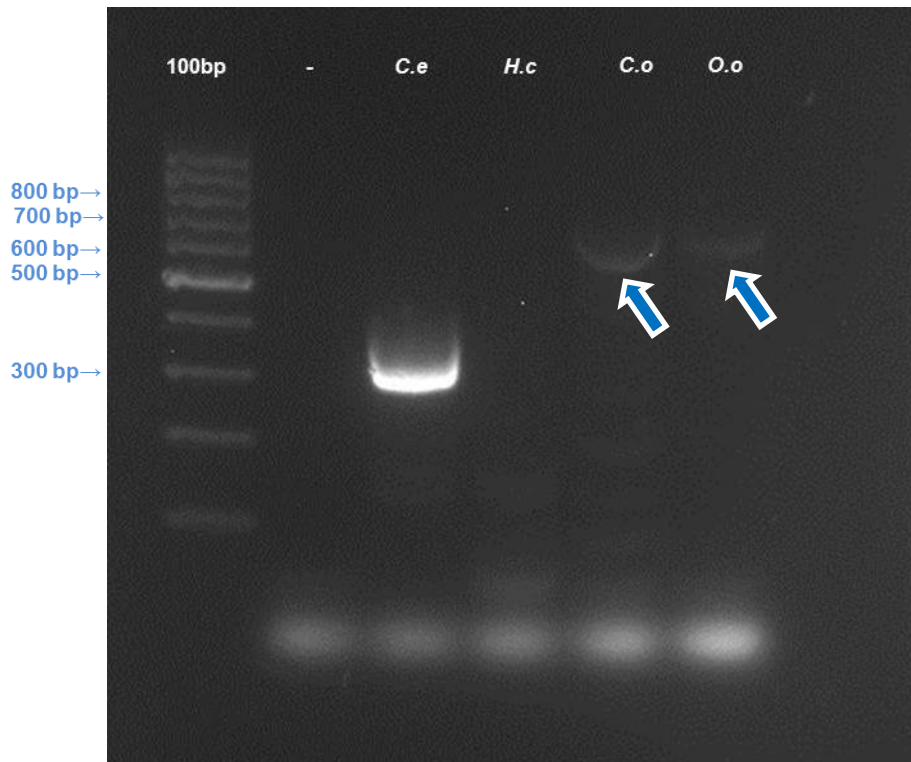
##### 4.5.2.1 Detektion in nicht-induzierten parasitischen Nematoden

In dieser Versuchsreihe wurde mit cDNA von *H. contortus*, *C. oncophora*, *O. ostertagi* sowie *C. elegans* N2-Bristol-Wildtyp gearbeitet (letzteres als Kontrollansatz). Für genauere Informationen zu den verwendeten Isolaten siehe 3.1.10, für Details über die RNA-Extraktion aus *H. contortus* und *C. elegans* sowie die anschließende cDNA-Synthese sei auf 3.2.3.1.5 und 3.2.3.2.3 verwiesen.

Die PCR wurde unter Verwendung der AccuPrime™ Taq DNA Polymerase (3.2.3.3.1) mit den fünf möglichen Kombinationen der degenerierten Primer (3.1.5.1) durchgeführt.

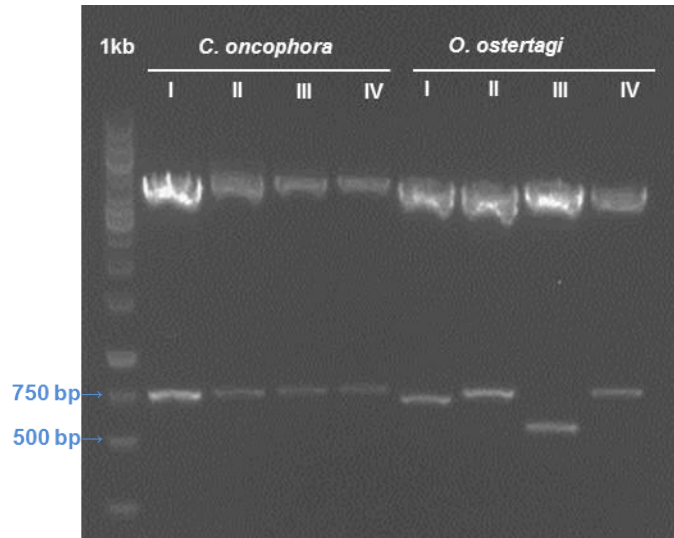


Von den fünf Primerkombinationen ergab einzig die Kombination „CYP14deg\_1for - CYP14deg\_1rev“ deutliche Banden im Gelbild (Abbildung 40). Die theoretische Fragmentgröße für den *C. elegans*-Kontrollansatz betrug ca. 563 bp, im Gel lag die *C. elegans*-Bande jedoch tiefer als erwartet, es war von einer Fragmentgröße von etwa 300 bp auszugehen. Die *C. oncophora* – und *O. ostertagi*-Ansätze ergaben je eine Bande von ca. 550 bp (*C. oncophora*) bzw. 600 bp (*O. Ostertagi*). Diese Banden wurden ausgeschnitten (3.2.3.6), die DNA aus dem Gel extrahiert (3.2.3.1.8) und mit dem Ausgangsprimerpaar reamplifiziert.



**Abbildung 40:** Ergebnisse der PCR mit degenerierten Primern für die Primerkombination "CYP14deg\_1for-CYPdeg\_1rev" mit cDNA aus *C. elegans*, *H. contortus*, *C. oncophora* und *O. ostertagi* (Pfeile markieren die für die weitere Untersuchung ausgewählten Banden)

Die beiden Fragmente wurden kloniert (3.2.3.7.3), von den erhaltenden Transformanden wurden pro Ansatz vier angezüchtet und die Plasmide isoliert (3.2.3.1.3). Die erhaltenden Plasmide wurden EcoR1-verdaut (3.2.3.7.4) (Abbildung 41).



**Abbildung 41: EcoRI-Verdau der Plasmide aus je vier Kolonien der klonierten deg1for-deg1rev-Fragmente aus *C. oncophora* und *O. ostertagi***

Im Falle der Fragmente aus *C. oncophora* zeigte sich ein homogenes Bild, alle vier Banden befanden sich auf einer Höhe von ca. 750 bp; damit allerdings höher als im Ursprungsgel (Abbildung 40). Die Fragmente aus *O. ostertagi* zeigten ein unterschiedliches Bandenmuster, die Fragmentgrößen lagen im Bereich von ca. 550 bp, ca. 700 bp und ca. 750 bp. Für die anschließende Sequenzierung wurde Ansatz „*C. oncophora* I“ sowie „*O. ostertagi* II und III“ ausgewählt.

BLASTX-Analysen der sequenzierten Fragmente ergaben, dass es sich bei Fragment „*C. oncophora* I“ und „*O. ostertagi* II“ um gleichartige bakterielle Kontaminationen handelte (in beiden Fällen wurden konservierte „protoporphyrinogen oxidase“- Motive gefunden). Für das Fragment „*O. ostertagi* III“ ergab die BLASTX-Analyse keine konservierten Motive und auch keine Ähnlichkeit zu CYP-Sequenzen. Die ersten zehn Treffer der Analyse sind Abbildung 42 zu entnehmen.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phosphotyrosine interaction region and PDZ domain containing protein [Haemonchus co</a>	263	263	93%	6e-79	77%	<a href="#">CDJ92501.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein Y032_0171q312 [Ancylostoma ceylanicum]</a>	203	203	94%	1e-58	56%	<a href="#">EYB94467.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">phosphotyrosine interaction domain protein [Necator americanus]</a>	120	120	57%	5e-28	62%	<a href="#">XP_013298724.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein NECAME_03430 [Necator americanus]</a>	100	100	43%	6e-23	69%	<a href="#">XP_013298725.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein ANCDUO_07198 [Ancylostoma duodenale]</a>	98.6	98.6	38%	1e-22	75%	<a href="#">KIH62521.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein DICVIV_05638 [Dictyocaulus viviparus]</a>	93.6	93.6	41%	1e-19	65%	<a href="#">KJH48276.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">C. briggsae CBR-LIN-10 protein [Caenorhabditis briggsae]</a>	96.7	96.7	55%	2e-19	57%	<a href="#">XP_002638661.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Protein CBR-LIN-10, isoform b [Caenorhabditis briggsae]</a>	95.9	95.9	55%	3e-19	59%	<a href="#">CCG58565.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Protein lin-10 [Caenorhabditis elegans]</a>	93.6	93.6	53%	2e-18	56%	<a href="#">NP_001020996.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein ANCCEY_06295 [Ancylostoma ceylanicum]</a>	87.0	87.0	32%	1e-17	72%	<a href="#">EPB74616.1</a>

**Abbildung 42: Ergebnisse des BLASTX der Sequenz des „*O. ostertagi* III“ -Fragments**

Abschließend kann gesagt werden, dass in den nativen parasitischen Nematoden keine *cyp-14A*-homologen Sequenzen gefunden wurden.

#### 4.5.2.2 Detektion in Ivermectin-induzierten *C. oncophora*

Nachdem der erste Versuch *cyp-14A*-homologe Gene in nativen parasitischen Nematoden zu finden nicht zum Erfolg führte, wurden in einem zweiten Ansatz L3 von *C. oncophora* für 24 h in 10 µM IVM-Lösung inkubiert (3.2.2.2) und anschließend der RNA-Isolation (3.2.3.1.6)/cDNA-Synthese (3.2.3.2.1) zugeführt. Darauf folgend wurde eine PCR unter Verwendung der AccuPrime™ Taq DNA Polymerase (3.2.3.3.1) mit den fünf möglichen Kombinationen der degenerierten Primer (3.1.5.1) durchgeführt. Es wurde ausschließlich mit der *C. oncophora*-cDNA als Template gearbeitet, Kontrollansätze mit *C. elegans*-cDNA wurden nicht durchgeführt. Einzig der Ansatz mit der Primerkombination „CYP14deg\_1for - CYP14deg\_1rev“ ergab eine deutliche Bande im Gelbild (Abbildung 43). Diese wurde ausgeschnitten (3.2.3.6), die enthaltene DNA extrahiert (3.2.3.1.8) und die Fragmente der Klonierung zugeführt.

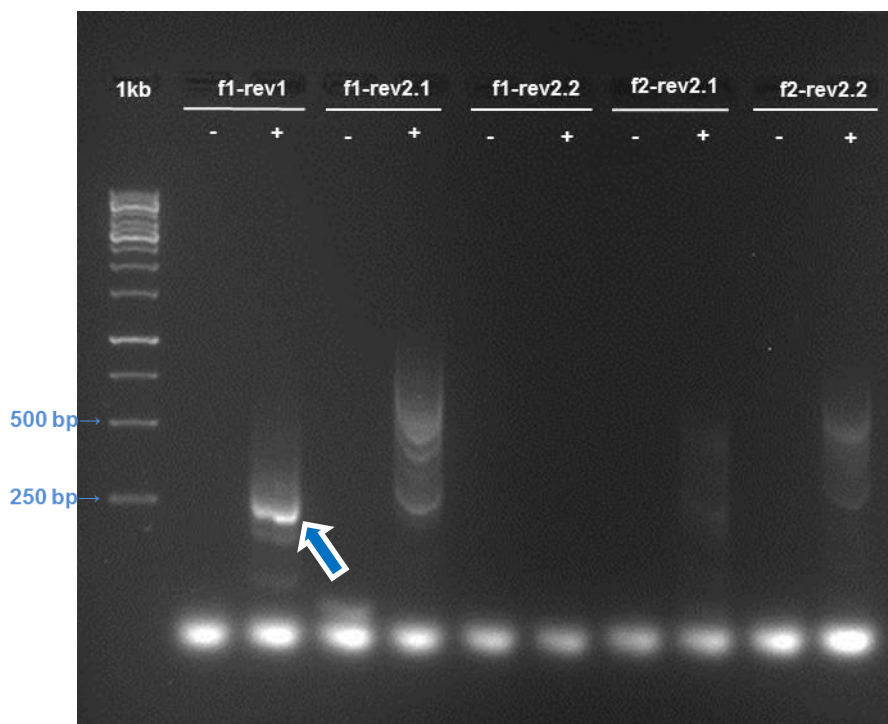


Abbildung 43: Ergebnisse der PCR mit degenerierten Primern in allen Primerkombinationen mit der cDNA aus IVM-induzierten *C. oncophora* L3 als Template („-“: Negativkontrolle, „+“: mit Template; Pfeil markiert die für die weitere Untersuchung ausgewählte Bande)

Obgleich die Klonierung mit dem designierten Invitrogen™ TOPO® TA Cloning® Kit wiederholt nicht funktionierte, führte die Benutzung des Agilent Technologies StrataClone Blunt PCR Cloning Kit zum Erfolg. Zuvor mussten allerdings die Sticky Ends der Fragmente mit Hilfe der

Thermo Scientific Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase zu Blunt Ends aufgefüllt werden (3.2.3.3.3).

Von den erhaltenen Transformanten wurden je vier angezüchtet und die Plasmide isoliert (3.2.3.1.3). Alle vier Plasmidisolate wurden sequenziert.

Die Sequenzen der Fragmente I, III und IV zeigten starke Ähnlichkeit zueinander und ergaben in der BLASTX-Analyse fast identische Ergebnisse, bei allen drei Fragmenten wurden konservierte „nucleotidyl transferase superfamily“-Motive gefunden. Exemplarisch sind die ersten zehn Treffer der BLASTX-Analyse von „Fragment III“ Abbildung 44 zu entnehmen.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Aminoacyl-tRNA synthetase domain containing protein [Haemonchus contortus]</a>	118	118	88%	9e-29	76%	<a href="#">CDJ81716.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">putative tyrosine-tRNA ligase [Dictyocaulus viviparus]</a>	103	103	88%	1e-23	62%	<a href="#">KJH52989.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">tRNA ligase class I [Oesophagostomum dentatum]</a>	97.4	97.4	88%	1e-21	59%	<a href="#">KHJ92730.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">tyrosine-tRNA ligase [Necator americanus]</a>	97.8	97.8	88%	2e-21	61%	<a href="#">XP_013309130.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">hypothetical protein Y032_0289q1515 [Ancylostoma ceylanicum]</a>	89.7	89.7	87%	1e-18	57%	<a href="#">EYB85895.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Protein CBG19783 [Caenorhabditis briggsae]</a>	68.9	68.9	82%	4e-11	48%	<a href="#">CAP36935.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">hypothetical protein CAEBREN_23930 [Caenorhabditis brenneri]</a>	67.4	67.4	82%	9e-11	48%	<a href="#">EGT32507.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">hypothetical protein CRE_14235 [Caenorhabditis remanei]</a>	66.6	66.6	82%	2e-10	47%	<a href="#">XP_003097737.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">tyrosinyl(Y) Amino-acyl tRNA Synthetase [Caenorhabditis elegans]</a>	66.2	66.2	82%	2e-10	47%	<a href="#">NP_740947.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">hypothetical protein WUBG_08063 [Wuchereria bancrofti]</a>	53.9	53.9	83%	3e-06	39%	<a href="#">EJW81029.1</a>

**Abbildung 44: Ergebnisse der BLASTX-Analyse der Sequenz von Fragment III (nicht gezeigt ist die Angabe zum Vorhandensein von konservierten „nucleotidyl transferase superfamily“-Motiven)**

Die Sequenz von Fragment II ergab in der BLASTX-Analyse keinen Treffer. Von den verfügbaren BLAST-Varianten ergab einzig die TBLASTX-Analyse diverse Treffer, unter denen sich aber keine Nematoden Proteine befanden. Erst der NemaBLAST (Variante: „vs transcript contigs, isotigs & genes“) ergab bei Benutzung der BLASTN-Analyse gegen sämtliche Nematoden-Clades zwei Treffer, einen für *Oesophagostomum dentatum* und einen für *Heterodera glycines* (Abbildung 45).

```

BLASTN 2.OMP-washu [04-May-2006] [linux26-x64-I32LPF64 2006-05-10T17:22:28]
Copyright (C) 1996-2006 Washington University, Saint Louis, Missouri USA.
All Rights Reserved.

Reference: Gish, W. (1996-2006) http://blast.wustl.edu

Notice: this program and its default parameter settings are optimized to find
nearly identical sequences rapidly. To identify weak protein similarities
encoded in nucleic acid, use BLASTX, TBLASTN or TBLASTX.

Query= Co_IVM_deg_02
      (331 letters)

Database: caninumNemaGene incognitaNemaGene stercoralisNemaGene
          spiralisNemaGene pacificusNemaGene punctataNemaGene glycinesNemaGene
          ceylanicumNemaGene penetransNemaGene vulpisNemaGene suumNemaGene
          contortusNemaGene malayiNemaGene rostochiensisNemaGe... (truncated)
          957,488 sequences; 887,669,454 total letters.
Searching....10....20....30....40....50....60....70....80....90....100% done

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:

          High Score   Smallest Sum of P(N)
Oden_isotig18435 gene=isogroup05515 length=220 numCont... 147 0.99 1
HG06638 175 0.9994 1

```

**Abbildung 45: Ergebnisse der NemaBLAST-BLASTN-Analyse der Sequenz von Fragment II gegen sämtliche Nematoden-Clades**

Die Sequenz aus *Heterodera glycines* ergab in den NCBI-BLAST-Analysen nur in der TBLASTX-Analyse Treffer, unter denen sich allerdings keine Nematoden befanden.

Die Sequenz aus *O. dentatum* ergab in der BLASTX-Analyse die in Abbildung 46 dargestellten, zum Teil im Phylum Nematoda lokalisierten Treffer; es wurden keine konservierten Motive gefunden. Unter den gefundenen Treffern befanden sich keine CYP-Sequenzen. Die in der TBLASTX-Analyse gefundenen Treffer beinhalteten keinerlei Nematoden.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">hypothetical protein ANCCEY_02397 [Ancylostoma ceylanicum]</a>	83.2	83.2	69%	7e-19	82%	<a href="#">EPB78556.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">hypothetical protein CRE_30597 [Caenorhabditis remanei]</a>	52.8	52.8	55%	4e-07	66%	<a href="#">XP_003088700.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">hypothetical protein Tcan_18428 [Toxocara canis]</a>	54.3	54.3	61%	6e-07	54%	<a href="#">KHN84218.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncharacterized protein CELE_C33A12.4 [Caenorhabditis elegans]</a>	50.4	50.4	55%	2e-06	61%	<a href="#">NP_501685.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypothetical protein CBG20015 [Caenorhabditis briggsae]</a>	49.7	49.7	55%	5e-06	66%	<a href="#">XP_002633940.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">hypothetical protein ASU_05263 [Ascaris suum]</a>	48.1	48.1	49%	2e-05	59%	<a href="#">ERG84513.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">hypothetical protein ANCDUO_12384 [Ancylostoma duodenale]</a>	40.0	40.0	34%	0.013	80%	<a href="#">KIH57424.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">hypothetical protein [Streptomyces varsoviensis]</a>	37.0	37.0	36%	0.95	48%	<a href="#">WP_048832073.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">hypothetical protein [Streptomyces varsoviensis]</a>	36.6	36.6	36%	1.1	48%	<a href="#">WP_037963076.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: gem-associated protein 8-like [Crassostrea gigas]</a>	36.2	36.2	31%	2.1	43%	<a href="#">XP_011431758.1</a>

**Abbildung 46: Ergebnisse des BLASTX der Sequenz des Oden\_isotig18435-Fragmentes**

Abschließend kann gesagt werden, dass in den mit IVM induzierten *C. oncophora* L3 keine *cyp-14A*-homologen Sequenzen gefunden wurden.

## 4.6 Massenspektrometrische Detektion von Ivermectin- und Moxidectinmetaboliten in *C. oncophora*

Zur Klärung der Frage, ob L3 von *C. oncophora* als Vertreter der parasitischen Nematoden in der Lage sind ML zu metabolisieren, wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurden Würmer in homogener Form mit IVM bzw. MOX inkubiert und die Ansätze anschließend massenspektrometrisch auf Metabolitkandidaten untersucht. Zum anderen wurden zusätzlich zu den ML-Wurm-Inkubationsansätzen weitere Kontroll-Inkubationsansätze durchgeführt. Ziel dieses Vorgehens war es, die durch die massenspektrometrische Analyse dieser Inkubationsansätze gewonnenen Daten gegeneinander abzugleichen, um einen Pool von m/z-Werten zu gewinnen, der nur in der Inkubation von *C. oncophora* mit dem jeweiligen ML vorkommt. Diese m/z-Werte wurden auf Übereinstimmung mit den Massen der Metabolitkandidaten überprüft.

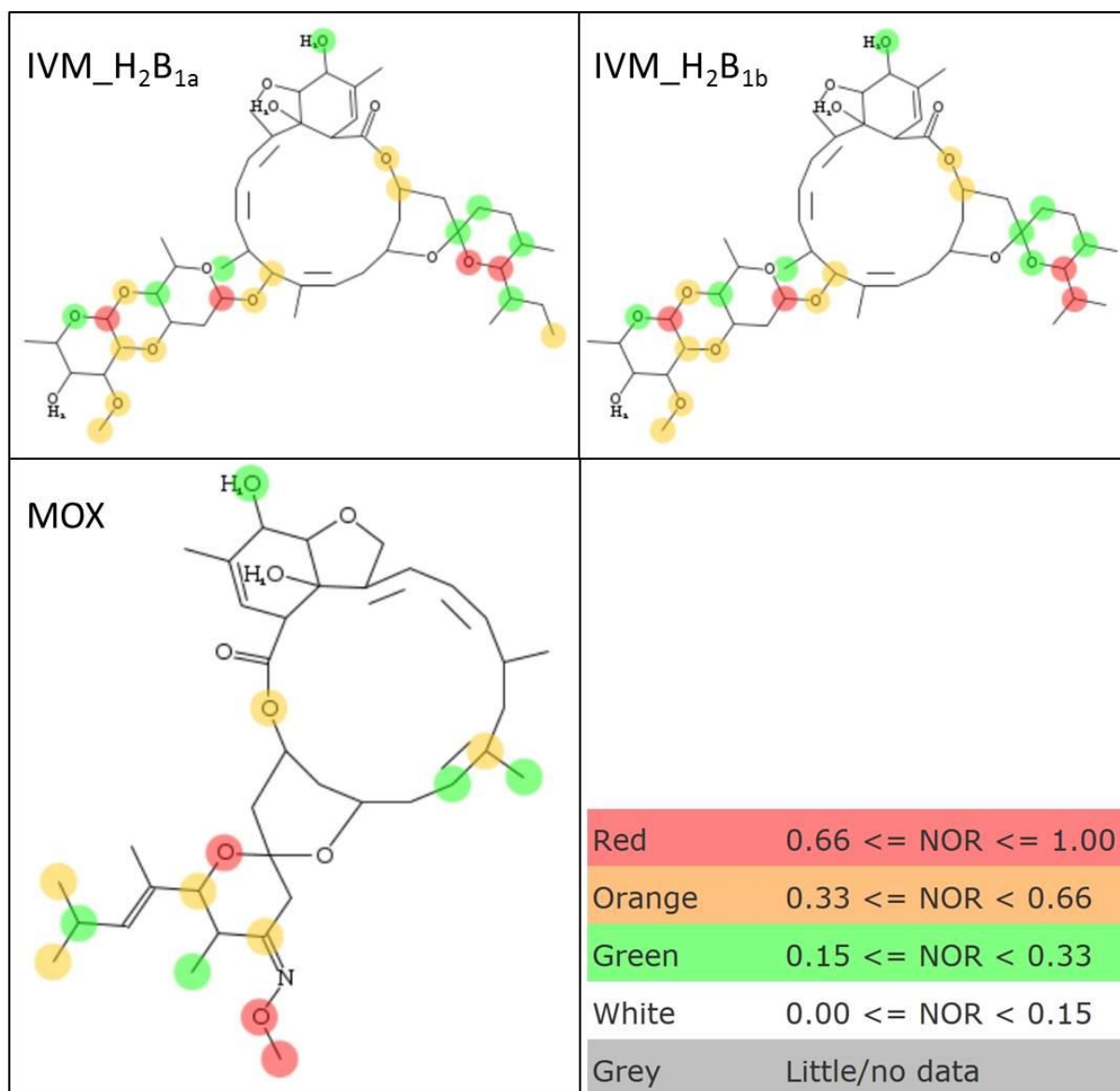
### 4.6.1 Metabolite und Metabolitkandidaten von Ivermectin und Moxidectin

Für eine erste Annäherung über die Art und Weise, wie CYPs die beiden ML IVM und MOX metabolisieren könnten, wurde eine *in silico* Simulationen der Detoxifikationsphase-I-Metabolisierung der beiden ML durchgeführt (3.2.5.3). Des Weiteren wurden die in der Literatur bekannten Metabolite von IVM und MOX zusammengetragen sowie softwaregestützte Berechnungen möglicher Metabolite durchgeführt.

#### 4.6.1.1 Bevorzugte Metabolisierungspositionen von Ivermectin und Moxidectin nach MetaPrint2D

Die Metabolisierungssimulation wurde mit dem Tool MetaPrint2D durchgeführt (3.2.5.3.2). Die Ergebnisse der Simulation für die beiden IVM-Komponenten und MOX sind Abbildung 47 zu entnehmen. Dabei ist zu beachten, dass die verschiedene Färbung der einzelnen Atome die in der Datenbank hinterlegte Häufigkeit angibt, mit der dieser Molekülteil im Falle einer Metabolisierung von der Transformation betroffen ist (NOR-Wert). Die Grafik gibt keine Auskunft über die Art der möglichen Metabolisierungsreaktionen (siehe hierzu 4.6.1.3.2).





**Abbildung 47: Berechnung der Phase-I-Metabolisierungspositionen von IVM und MOX gemäß MetaPrint2D (der NOR-Wert eines Atoms gibt Auskunft über die beschriebene Häufigkeit für eine dortig stattfindende Transformation im Falle einer Metabolisierung des Moleküls)**

Ursprünglich wurde noch eine weitere Simulation mit dem Programm SMARTCyp durchgeführt. Allerdings ging aus Entwicklerangaben hervor, dass bei der Analyse von chem. Verbindungen welche aus mehr als 40 Nicht-Wasserstoffatomen bestehen (zutreffend für IVM und MOX) die berechneten Reaktionspositionen nicht mit den experimentell beobachteten übereinstimmen (<http://www.farma.ku.dk/smartcyp/interpret.php>, Stand 28.10.2015, 13:16 Uhr)). Daher wurde auf die Einbeziehung und Darstellung der Simulationsergebnisse verzichtet.

#### 4.6.1.2 In der Literatur beschriebene Ivermectin- und Moxidectinmetabolite

In der Literaturrecherche wurden nachgewiesene Metabolite der beiden ML zusammengetragen, unabhängig davon in welchem Organismus sie gefunden wurden. Von den gefundenen Metaboliten wurden ausschließlich die Summenformeln

übernommen/berechnet, da für eine reine Suche in den massenspektrometrischen Daten die Isomerie der Metabolite unbedeutend ist. Die beschriebenen ML-Metabolite sind Tabelle 16, Tabelle 17 und Tabelle 18 zu entnehmen, dazu sind die Änderungen in der Masse im Bezug zum Ausgangsstoff, die Summenformel, die exakte Masse des Metaboliten, die daraus resultierenden Adduktmassen sowie die Quellangabe aufgeführt. Insgesamt ließen sich für IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> fünf, für IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub> zwei und für MOX fünf Metabolite finden.

**Tabelle 16: IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>-Metabolite laut Literaturangaben (angegeben sind nur die tatsächlich gebildeten Adduktklassen. Literaturquellen: a) (Vokřál, Jedličková et al. 2013), b) (Zeng, Andrew et al. 1998), c) (Lee Chiu, Taub et al. 1987) )**

Molekülname	Massen- änderung	Summen- formel	exakte Masse	Adduktmassen		Quelle
				[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	
IVM_H <sub>2</sub> B <sub>1a</sub>		C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub>	874,507859	<b>892,541682</b>	<b>897,497077</b>	
Hydroxy-IVM	(+O)	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>15</sub>	890,502775	<b>908,536598</b>	<b>913,491993</b>	a)
Dihydroxy-IVM	(+O <sub>2</sub> )	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>16</sub>	906,497690	<b>924,531513</b>	<b>929,486908</b>	b)
Demethyl-IVM	(-CH <sub>2</sub> )	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	860,492210	<b>878,526033</b>	<b>883,481428</b>	a)
Hydroxy-Demethyl-IVM	(+O, -CH <sub>2</sub> )	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>15</sub>	876,487125	<b>894,520948</b>	<b>899,476343</b>	a)
Hydroxy-Monosaccharid-IVM	(+O, -C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> )	C <sub>41</sub> H <sub>62</sub> O <sub>12</sub>	746,424130	<b>764,457953</b>	<b>769,413348</b>	c)

**Tabelle 17: I IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub>-Metabolite laut Literaturangaben (angegeben sind nur die tatsächlich gebildeten Adduktklassen. Literaturquellen: c) (Lee Chiu, Taub et al. 1987), d) (Gonzalez Canga, Sahagun Prieto et al. 2009))**

Molekülname	Massen- änderung	Summen- formel	exakte Masse	Adduktmassen		Quelle
				[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	
IVM_H <sub>2</sub> B <sub>1b</sub>		C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	860,492210	<b>878,526033</b>	<b>883,481428</b>	
Hydroxy- IVM	(+O)	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>15</sub>	876,487125	<b>894,520948</b>	<b>899,476343</b>	c)
Demethyl- IVM	(-CH <sub>2</sub> )	C <sub>46</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub>	846,476560	<b>864,510383</b>	<b>869,465778</b>	d)



**Tabelle 18: MOX-Metabolite laut Literaturangaben (angegeben sind nur die tatsächlich gebildeten Adduktclassen. Literaturquelle: e) (Afzal, Stout et al. 1994), f) (Stout, Dacunha et al. 1994))**

Molekülname	Massen- änderung	Summen- formel	exakte Masse	Adduktmassen		Quelle
				[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	
MOX		C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>8</sub>	639,377119	<b>640,384395</b>	<b>662,366337</b>	
Monohydroxy- MOX	(+O)	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>9</sub>	655,372034	<b>656,379310</b>	<b>678,361252</b>	e)
Dihydroxy- MOX	(+O <sub>2</sub> )	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>10</sub>	671,36695	<b>672,374225</b>	<b>694,356167</b>	e)
Keto- MOX	(-NCH <sub>3</sub> )	C <sub>36</sub> H <sub>50</sub> O <sub>8</sub>	610,350570	<b>611,357846</b>	<b>633,339788</b>	e)
Keto- Hydroxy- MOX	(-NCH <sub>3</sub> , +O)	C <sub>36</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	626,345485	<b>627,352761</b>	<b>649,334703</b>	e)
Monohydroxy- Demethyl- MOX	(+O, -CH <sub>2</sub> )	C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>9</sub>	641,356383	<b>642,363659</b>	<b>664,345601</b>	f)

#### 4.6.1.3 Berechnete Metabolite von Ivermectin und Moxidectin

Zusätzlich zu den literaturbekannten Metaboliten von IVM und MOX sollten Metabolitkandidaten berechnet werden, deren Entstehung im Rahmen der Detoxifikationsphase I potentiell möglich ist. Hierzu wurden zwei Programme verwendet, einmal das Metabolizer- (3.2.5.3.3) sowie ferner das MetaPrint2D-React-Tool (3.2.5.3.2).

4.6.1.3.1 Per Metabolizer (Chemaxon) berechnete Metabolite von Ivermectin und Moxidectin  
Die Berechnung der Metabolitkandidaten erfolgte für die beiden IVM-Komponenten sowie das MOX für je zwei Generationen durch eine „exhaustive search“ unter Verwendung der „biotransformation library“ (detaillierte Beschreibung: 3.2.5.3.3). Für IVM\_H2B1a wurden insgesamt 323 unterschiedliche Metabolite berechnet, die 19 Gruppen von verschiedenen Isomeren ergaben (Tabelle 19); d. h. die Mitglieder jeder Gruppe haben die gleiche Summenformel (und damit die gleiche exakte Masse), unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer chemischen Struktur. Zusätzlich zu den Isomer-Gruppen sind die Massen ihrer im Massenspektrometer gebildeten Addukte angegeben.

**Tabelle 19: Die 323 mit Hilfe des ChemAxon-Metabolizers berechnete Metabolitkandidaten von IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>, gezeigt sind die exakten Massen der 19 verschiedenen Isomer-Gruppen sowie deren Adduktmassen (Berechnungsdetails: 2 generations, exhaustive search, biotransformation library)**

exakte Masse der Isomergruppe	Adduktmassen	
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
870,4765569	888,5103799	893,4657749
872,492207	890,52603	895,481425
873,500032	891,533855	896,48925
875,5156821	893,5495051	898,5049001
876,5235071	894,5573301	899,5127251
878,5391572	896,5729802	901,5283752
886,5078571	904,5416801	909,4970751
888,4871216	906,5209446	911,4763396
888,5235071	906,5573301	911,5127251
890,5027717	908,5365947	913,4919897
890,5391572	908,5729802	913,5283752
892,5184218	910,5522448	915,5076398
894,5340718	912,5678948	917,5232898
902,5391572	920,5729802	925,5283752
904,5184218	922,5522448	927,5076398
906,4976863	924,5315093	929,4869043
906,5340718	924,5678948	929,5232898
908,5133364	926,5471594	931,5025544
910,5289864	928,5628094	933,5182044

Für IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub> wurden insgesamt 291 unterschiedliche Metabolite berechnet, die insgesamt 19 Gruppen von verschiedenen Isomeren ergaben (Tabelle 20). Zusätzlich zu den Isomeren sind die Massen ihrer im Massenspektrometer gebildeten Addukte angegeben.

**Tabelle 20: Die 291 mit Hilfe des ChemAxon-Metabolizers berechnete Metabolitkandidaten von IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub>, gezeigt sind die exakten Massen der 19 verschiedenen Isomer-Gruppen sowie deren Adduktmassen (Berechnungsdetails: 2 generations, exhaustive search, biotransformation library)**

exakte Masse der Isomergruppe	Adduktmassen	
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
856,4609069	874,4947299	879,4501249
858,4765569	876,5103799	881,4657749
859,484382	877,518205	882,4736
861,500032	879,533855	884,48925
862,5078571	880,5416801	885,4970751
864,5235071	882,5573301	887,5127251
872,492207	890,52603	895,481425
874,4714716	892,5052946	897,4606896
874,5078571	892,5416801	897,4970751
876,4871216	894,5209446	899,4763396
876,5235071	894,5573301	899,5127251
878,5027717	896,5365947	901,4919897
880,5184218	898,5522448	903,5076398
888,5235071	906,5573301	911,5127251
890,5027717	908,5365947	913,4919897
892,4820363	910,5158593	915,4712543
892,5184218	910,5522448	915,5076398
894,4976863	912,5315093	917,4869043
896,5133364	914,5471594	919,5025544

Für MOX wurden insgesamt 125 unterschiedliche Metabolite berechnet, die insgesamt 19 Gruppen von verschiedenen Isomeren ergaben (Tabelle 21). Zusätzlich zu den Isomeren sind die Massen ihrer im Massenspektrometer gebildeten Addukte angegeben.

**Tabelle 21: Die 125 mit Hilfe des ChemAxon-Metabolizers berechnete Metabolitkandidaten von MOX, gezeigt sind die exakten Massen der 19 verschiedenen Isomer-Gruppen sowie deren Adduktmassen (Berechnungsdetails: 2 generations, exhaustive search, biotransformation library)**

exakte Masse der Isomergruppe	Adduktmassen	
	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
635,3458175	636,3530935	658,3350355
637,3614676	638,3687436	660,3506856
638,3692926	639,3765686	661,3585106
640,3849427	641,3922187	663,3741607
641,3927677	642,4000437	664,3819857
643,4084178	644,4156938	666,3976358
651,3771177	652,3843937	674,3663357
653,3563822	654,3636582	676,3456002
653,3927677	654,4000437	676,3819857
655,3720323	656,3793083	678,3612503
655,4084178	656,4156938	678,3976358
657,3876824	658,3949584	680,3769004
659,4033324	660,4106084	682,3925504
667,4084178	668,4156938	690,3976358
669,3876824	670,3949584	692,3769004
671,3669469	672,3742229	694,3561649
671,4033324	672,4106084	694,3925504
673,382597	674,389873	696,371815
675,398247	676,405523	698,387465

#### 4.6.1.3.2 Auf Vorhersage von MetaPrint2D-React berechnete Metabolite von Moxidectin

Während die Berechnung von Metabolitkandidaten mit dem Metabolizer-Tool auf der Anwendung definierter Reaktionsschritte beruhte, folgte die auf dem MetaPrint2D-React-Tool beruhende Vorhersage für mögliche MOX-Metabolite einem Brute-Force-Ansatz: Am Anfang stand die vom Programm durchgeführte Berechnung der möglichen Metabolisierungspositionen sowie der dort möglichen Reaktionstypen. Anschließend erfolgte der Ausschluss der darunter befindlichen Detoxifikationsphase-II-Reaktionen (Sulfatierung und Glucuronidierung). Die vorhergesagten elf Metabolisierungspositionen sowie Detoxifikationsphase-I-Reaktionen sind Abbildung 48 zu entnehmen (die Abbildung zeigt eine modifizierte Ausgabegrafik des MetaPrint2D-React-Tool, die verschiedenen Farben geben Auskunft über die vorhergesagten Reaktionstypen (nicht die Reaktionswahrscheinlichkeiten)).

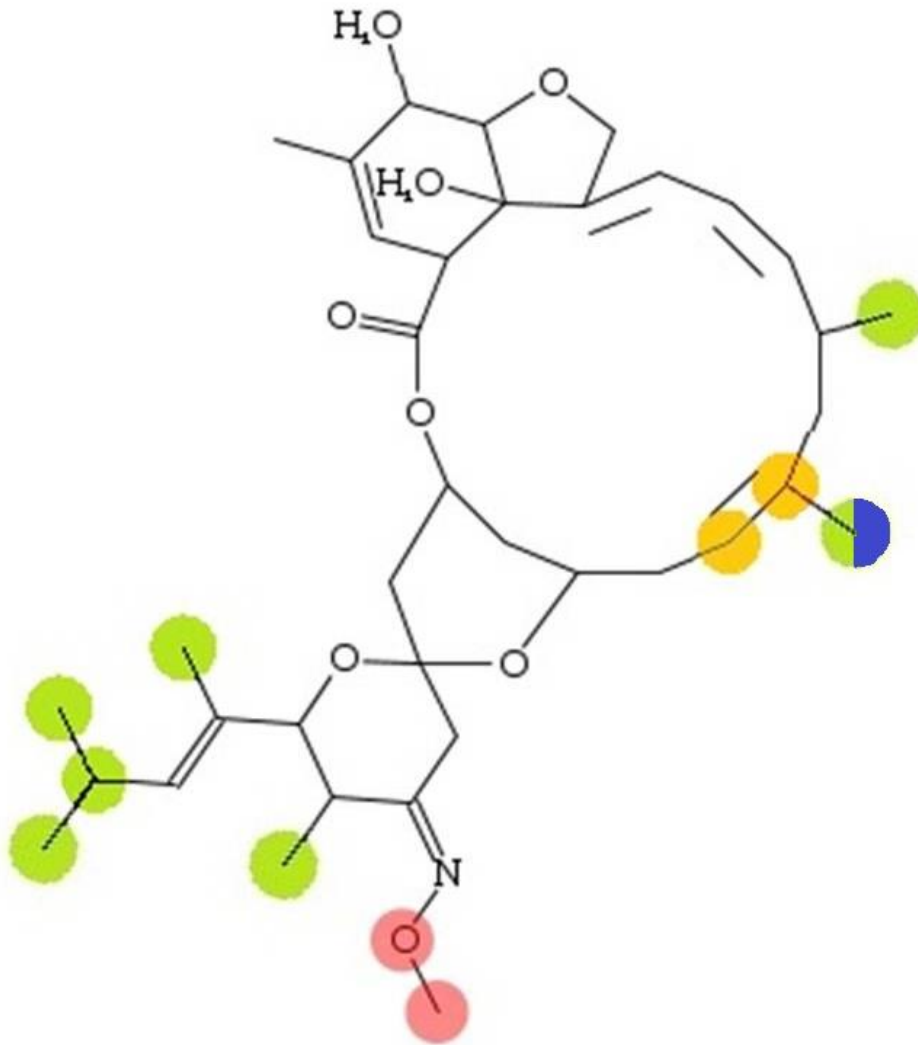


Abbildung 48: Die elf möglichen Detoxifikationsphase-I-Metabolisierungspositionen am MOX-Molekül gemäß dem MetaPrint2D-React-Tool (Bild aus mehreren Abbildungen zusammengefügt und farblich editiert, Farben geben Auskunft über mögliche Metabolisierungsreaktion (nicht über Metabolisierungswahrscheinlichkeit): rot: Demethylierung, blau: Oxidation, grün: Hydroxylierung, orange: Reduktion)

Auf Grundlage der durch die einzelnen Reaktionen verursachten Modifikationen am Molekül wurde eine Übersicht erstellt, aus der hervorging, welcher Reaktionstyp an welcher Position welchen Effekt auf die Summenformel des MOX haben würde (Tabelle 22).

**Tabelle 22: Reaktionsübersicht für die Berechnung der MOX-Metabolitkandidaten auf Grundlage des MetaPrint2C-React-Tools (die elf Metabolisierungspositionen beziehen sich auf Abbildung 48)**

Reaktionstyp	Effekt auf Summenformel	Metabolisierungsposition										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Hydroxylierung	+ O	+ O		+ O				+ O	+ O	+ O	+ O	+ O
Oxidation (=O)	+ O ; - H2			+ O ; - H2								
Oxidation (=O-OH)	+ O2; -H2			+ O2; -H2								
Reduktion	+H2		+H2*		+H2*							
Demethylierung	- CH2					- CH2*	- CH2*					

\*: gleichnamige Reaktionen wirken trotz verschiedener berechneter Metabolisierungspositionen nur eine Molekülmodifikation

Aus den Angaben des MetaPrint2D-React-Tool ging hervor, dass obwohl sowohl Reduktion als auch Demethylierung an je zwei Molekülpositionen denkbar sind, beide Reaktionstypen zu jeweils nur einer chemischen Modifikation führen, da die jeweils andere Position nach erfolgter Erstreaktion nicht mehr reaktiv zugänglich ist. Bei der Berechnung der Metabolite wurden Reduktion und Demethylation daher mit der Möglichkeit eines je einmaligen Auftretens bewertet.

Auf Grundlage dieser Informationen wurden zwei Matrices erstellt, die jeweils von der theoretisch kleinsten bis zur theoretisch größten Summenformel unter Berücksichtigung der in Tabelle 22 gezeigten chemischen Modifikationen reichten (unabhängig von ihrer chemischen Realisierbarkeit). Es waren zwei Matrices nötig, da mit der Demethylierung eine Änderung in der Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül einhergehen würde und die Matrices nur zwei Dimensionen (Änderung der Anzahl der Wasserstoff- und Sauerstoffatome) anzeigen konnten. Die Listen der Summenformeln für die C36- (demethyliert) und C37-Körper sowie die entsprechenden exakten Massen und berechneten Adduktmassen sind im Anhang (Tabelle 26, Seite 186) zu finden.

IVM erwies sich aufgrund seiner zusätzlichen Seitenkette als zu komplex für diese Methode, es konnten daher keine IVM-Metabolite mit Hilfe des MetaPrint2D-React-Tools berechnet werden.

#### **4.6.2 Untersuchung der LC/MS-Messläufen der mit Makrozyklischen Laktone inkubierten *C. oncophora*-Ansätze auf bekannte und berechnete Ivermectin- und Moxidectinmetabolite**

Nach Sammlung der ML-Metabolitkandidaten aus der Literatur, bzw. der erfolgten Berechnung, wurden ihre Adduktmassen mit den aus der massenspektrometrischen Analyse des Inkubationsansatzes „ML und *C. oncophora*“ gewonnenen m/z-Werten abgeglichen. Zuvor wurde noch eine Bestimmung der Messgenauigkeit vorgenommen, um Aussage über den nötigen Grad an Übereinstimmung der Adduktmassen der Metabolitkandidaten mit den m/z-Werten der MS-Analyse zu treffen, mit dem eine sichere Identifizierung von m/z-Werten gewährleistet werden konnte.

##### **4.6.2.1 Evaluierung der Genauigkeit der LC/MS-Messung**

Hierbei sollte festgestellt werden, wie viele Nachkommastellen bei der Suche nach Übereinstimmungen zwischen den experimentell gewonnenen m/z-Werten (in XCMS\_online) und den berechneten Adduktmassen der Metabolitkandidaten berücksichtigt werden sollten. Moderne Massenspektrometer liefern eine akkurate Massenmessung auf vier und mehr Nachkommastellen (Brenton and Godfrey 2010), doch können sog. Matrixeffekte – d.h. störende Einflüsse von Probenbestandteilen – sich negativ auf diese Genauigkeit auswirken (Taylor 2005, Patel 2011). Zur Evaluierung wurden die Adduktmassen der bekannten exakten Massen der jeweiligen ML den mittels XCMS\_online ermittelten m/z-Werten der ML-Addukte aus der Messreihe „ML ohne *C. oncophora*“ gegenübergestellt (Tabelle 23). Für die Identifizierung dieser m/z-Werte wurde dabei auch die Intensität herangezogen (durch die hohe Konzentration der ML war die Intensität ihrer m/z-Werte prominent). Da es sich bei den von XCMS\_online ermittelten m/z-Werten um Medianangaben handelte, wurde für diese ihr gesamter Messbereich berücksichtigt (da dieser von XCMS\_online nur bei „Single Job“-

Analysen angegeben wird, ist die Messbereichsangabe bei den „Pairwise Job“-Analysen nicht verfügbar. Allerdings beruhen die „Pairwise Job“- auf denselben Datensätzen wie die „Single Job“-Analysen).

**Tabelle 23: Vergleich der exakten Massen der ML mit den aus den LC/MS-Messungen gewonnenen m/z-Werten zur Bestimmung der Anzahl an verlässlichen Nachkommastellen für die Metabolit-Suche**

<b>IVM_H2B1A</b>						
exakte Masse	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 892,5417	Messbereich	RT (min)	[M+Na] <sup>+</sup> 897,4971	Messbereich	RT (min)
XCMS_online	m/z [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> (median)			m/z [M+Na] <sup>+</sup> (median)		
Single Jobs:						
ML+Wasser	892,5420	892,5404 - 892,5421	7:49	897,4967	897,4954 - 897,4984	7:49
ML+Medium	892,5421	892,5407 - 892,5423	7:44	897,4967	897,4958 - 897,4989	7:44
ML+Wurm	892,5422	892,5407 - 892,5423	7:53	897,4966	897,4958 - 897,4974	7:53
Pairwise Jobs:						
Ctrl+Wasser vs ML+Wasser	892,5420		7:49	897,4967		7:49
ML+Wasser vs ML+Medium	892,5421		7:44	897,4967		7:44
ML+Wasser vs ML+Wurm	892,5421		7:53	897,4967		7:53
<b>IVM_H2B1B</b>						
exakte Masse	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 878,5260	Messbereich	RT (min)	[M+Na] <sup>+</sup> 883,4814	Messbereich	RT (min)
XCMS_online	m/z [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> (median)			m/z [M+Na] <sup>+</sup> (median)		
Single Jobs:						
ML+Wasser	878,5263	878,5256 - 878,5266	7:26	883,4815	883,4809 - 883,4818	7:26
ML+Medium	878,5264	878,5260 - 878,5268	7:19	883,4816	883,4812 - 883,4819	7:19
ML+Wurm	878,5266	878,5262 - 878,5272	7:28	883,4818	883,4814 - 883,4823	7:28
Pairwise Jobs:						
Ctrl+Wasser vs ML+Wasser	878,5263		7:26	883,4815		7:26
ML+Wasser vs ML+Medium	878,5263		7:20	883,4816		7:20
ML+Wasser vs ML+Wurm	878,5263		7:29	883,4816		7:29



<b>Moxidectin</b>						
	[M+H] <sup>+</sup>	Messbereich	RT (min)	[M+Na] <sup>+</sup>	Messbereich	RT (min)
exakte Masse (nach BFR)	640,3844			662,3663		
	m/z [M+H] <sup>+</sup> (median)			m/z [M+Na] <sup>+</sup> (median)		
XCMS_online						
Single Jobs:						
ML+Wasser	640,3841	640,3838 - 640,3843	7:21	662,3660	662,3660 - 662,3664	7:21
ML+Medium	640,3841	640,3837 - 640,3843	7:26	662,3661	662,3658 - 662,3665	7:26
ML+Wurm	640,3840	640,3836 - 640,3843	7:16	662,3660	662,3657 - 662,3664	7:16
Pairwise Jobs:						
Ctrl+Wasser vs ML+Wasser	640,3841		7:21	662,3660		7:21
ML+Wasser vs ML+Medium	640,3841		7:26	662,3661		7:26
ML+Wasser vs ML+Wurm	640,3841		7:26	662,3660		7:26

Aus Tabelle 23 ist ersichtlich, dass im Falle von IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1B</sub> und MOX die exakte Masse und die per XCMS\_online ermittelten m/z-Medianwerte bis auf die dritte Nachkommastelle übereinstimmen. Nur bei IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1B</sub> zeigt sich eine Diskrepanz in der dritten Nachkommastelle bei den m/z-Medianwerten der beiden Addukte. Da allerdings die Werte ihrer exakten Massen

im Messbereich der jeweiligen „Single Job“-Medianwerte enthalten sind, wurde von einer Übereinstimmung auf drei Nachkommastellen ausgegangen. Die Massengenauigkeit des verwendeten Massenspektrometers wird von Seiten des Herstellers auf <2 ppm angegeben, dies ist im Einklang mit den gemessenen Werten (ermittelt mittels <http://homepages.warwick.ac.uk/staff/M.P.Barrow/massaccuracy.html>).

Abschließend kann gesagt werden, dass für die Bewertung der Identität von m/z-Werten eine Übereinstimmung auf drei Nachkommastellen als geeignet befunden wurde, sofern eine Übereinstimmung zumindest im Messbereich der m/z-Medianwertangabe gegeben war.

#### **4.6.2.2 Mit den ML-Metabolitkandidat-Adduktmassen übereinstimmende experimentell ermittelte m/z-Werte**

Ausgehend von der im letzten Kapitel gemachten Feststellung bei m/z-Werten drei Nachkommastellen bei der Suche nach Metabolitkandidaten zu berücksichtigen, wurden die m/z-Wertlisten der „ML und *C. oncophora*“-„Single Job“-Analysen auf Adduktmassen von Metabolitkandidaten untersucht. Die im Falle des IVM-Ansatzes überprüften Metabolitkandidaten für IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> sind Tabelle 16 und Tabelle 19 zu entnehmen, die für IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub> Tabelle 17 und Tabelle 20. Die für den MOX-Ansatz überprüften Metabolitkandidaten finden sich in Tabelle 18, Tabelle 21 und Tabelle 26.

In Tabelle 24 sind die diejenigen Metabolitkandidaten aufgelistet, zu denen sich für mindestens eine Adduktmasse Übereinstimmungen mit den m/z-Medianwerten aus der MS-Analyse ergaben (Übereinstimmung auf drei Nachkommastellen zumindest im Messbereich der m/z-Medianwerte).

**Tabelle 24: Mit den Adduktmassen berechneter/aus der Literatur bekannter ML-Metabolite übereinstimmende m/z-Medianwerte aus den „ML und *C. oncophora*“-„Single Job“-Analysen für beide IVM-Komponenten und MOX. (Übereinstimmung auf drei Nachkommastellen zumindest im Messbereich der m/z-Medianwerte. Rot markiert sind die Metabolitkandidaten, bei denen für beide Addukte m/z-Wert-Übereinstimmungen gefunden wurden. „Quelle“ indiziert Herkunft des Metabolitkandidaten: Lit: aus Literatur bekannt, MB: per Metabolizer-Tool berechnet, MP2D-r: per MetaPrint2D-React-Tools berechnet) (Tabelle erstreckt sich über die nächsten zwei Seiten)**

IVM_H <sub>2</sub> B <sub>1a</sub>									
theo. Masse	m/z-Wert XCMS_online	Messbereich	RT (min)	theo. Masse	m/z-Wert XCMS_online	Messbereich	RT (min)	Summenformel	Quelle
[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>			[M+Na] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>				
878,5260	878,5266		7,28	883,4814	883,4818		7,28	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	Lit
890,5260	890,526		6,53	895,4814	895,4819		6,54	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	MB
892,5417	892,5422	892,5407 - 892,5423	7,53	897,4971	897,4966	897,4958 - 897,4974	7,53	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub>	MB
894,5573	894,5575		7,86	899,5127	899,5129		7,86	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>14</sub>	MB
906,5573	906,5567		7,78	911,5127	911,513		7,75	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> O <sub>14</sub>	MB
----	---		---	911,4763	911,4768	911,5121 - 911,5134	7,18		MB

IVM_H <sub>2</sub> B <sub>1b</sub>									
theo. Masse	m/z-Wert XCMS_online	Messbereich	RT (min)	theo. Masse	m/z-Wert XCMS_online	Messbereich	RT (min)	Summenformel	Quelle
[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>			[M+Na] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>				
878,5260	878,5266		7,28	883,4814	883,4818		7,28	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	Lit, MB
890,5260	890,526		6,53	895,4814	895,4819		6,54	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	MB
892,5417	892,5422	892,5407 - 892,5423	7,53	897,4971	897,4966	897,4958 - 897,4974	7,53	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub>	MB
894,5573	894,5575		7,86	899,5127	899,5129		7,86	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>14</sub>	MB
906,5573	906,5567		7,78	911,5127	911,513	911,5121 - 911,5134	7,75	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> O <sub>14</sub>	MB

## Moxidectin

theo. Masse	m/z-Wert XCMS_online	Messbereich	RT (min)	theo. Masse [M+Na] <sup>+</sup>	m/z-Wert XCMS_online	Messbereich	RT (min)	Summen- formel	Quelle
611,3578	---		---	633,3398	633,3397		6:24		Lit, Mb, MP2D- r
<b>626,3687</b>	<b>626,3689</b>		<b>6:91</b>	<b>648,3507</b>	<b>648,3508</b>		<b>6:90</b>	<b>C<sub>36</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>8</sub></b>	<b>Lit</b>
628,3849	628,383	628,3828 - 628,3862	1:51	---	---		---		MB
629,3928	629,3911	629,3861 - 629,3940	1:53	---	---		---		MP2D-r
636,3531	636,3535		6:72	---	---		---		MB
638,3687	638,369	638,3689 - 638,3692	6:32	---	---		---		MB
<b>640,3844</b>	<b>640,384</b>		<b>7:16</b>	<b>662,3663</b>	<b>662,366</b>		<b>7:16</b>	<b>C<sub>37</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>8</sub></b>	<b>Lit, MB, MP2D- r</b>
<b>654,3637</b>	<b>654,3639</b>		<b>7:62</b>	<b>676,3456</b>	<b>676,3456</b>		<b>6:72</b>	<b>C<sub>37</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>9</sub></b>	<b>MB, MP2D-r</b>
<b>654,4000</b>	<b>654,4001</b>		<b>7:47</b>	<b>676,3820</b>	<b>676,382</b>	<b>676,3813 - 676,3823</b>	<b>7:47</b>	<b>C<sub>38</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>8</sub></b>	<b>MB</b>
<b>656,3793</b>	<b>656,3804</b>	<b>656,3797 - 656,3810</b>	<b>6:83</b>	<b>678,3613</b>	<b>678,3614</b>		<b>6:82</b>	<b>C<sub>37</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>9</sub></b>	<b>Lit, MP2D-r</b>
668,4157	668,4072	668,4070 - 668,4113	1:49	---	---		---		MP2D-r
670,3591	670,3584		6:64	---	---		---		MP2D-r
672,4106	672,4132	672,4089 - 672,4168	1:56	---	---		---		MP2D-r
---	---		---	747,3437	747,3436		7:16		MP2D-r

Im Messlauf IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> wurden zu sechs Metabolitkandidatenaddukten passende m/z-Werte gefunden, bei fünf zeigte sich eine Übereinstimmung für beide Adduke (rot markiert). Im Messlauf IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub> wurden zu fünf Metabolitkandidatenaddukten passende m/z-Werte gefunden, eine Übereinstimmung für beide Adduke fand sich für alle fünf Funde (rot markiert, identisch mit denen aus dem IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>-Ansatz). Im Messlauf MOX wurden zu 14 Metabolitkandidatenaddukten passende m/z-Werte gefunden, bei fünf zeigte sich eine Übereinstimmung für beide Adduke (rot markiert).

In den Fällen, in denen sich für einen Metabolitkandidaten für beide berechneten Adduktmassen m/z-Werte finden ließen (rot markiert in Tabelle 24), wurde untersucht, ob sich die betreffenden m/z-Werte auch im Ansatz „ML ohne *C. oncophora*“ finden ließen und falls ja, inwiefern sich die Intensitäten der m/z-Werte in den beiden Messläufen unterschieden (Tabelle 25). Im Falle von IVM wurde nicht mehr zwischen seinen beiden Komponenten unterschieden, da für beide die gleichen Metabolitkandidaten gefunden wurden (Tabelle 24).

Tabelle 25: Intensitäten der m/z-Werte der Metabolitkandidatenaddukte für IVM und MOX in der massenspektrometrischen Analyse der Ansätze „ML ohne *C. oncophora*“ und „ML mit *C. oncophora*“

<b>Ivermectin</b>									
m/z-Wert XCMS_online	Intensität	IVM + <i>C. oncophora</i>	Änderung Intensität	m/z-Wert XCMS_online	Intensität	IVM + <i>C. oncophora</i>	Änderung Intensität	Summenformel	mögl. Modifikation
[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	IVM	<i>oncophora</i>		[M+Na] <sup>+</sup>	IVM	<i>oncophora</i>			
878,5266	1.141.947	956.369	1,2x ↓	883,4818	2.432.500	2.326.601	1x ↓	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	Demethylierung*
890,526	51.765	42.250	1,2x ↓	895,4819	174.97	214.089	1,2x ↑	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	Dehydrierung
892,5422	56.494.903	47.138.570	1,2 x ↓	897,4966	111.600.660	104.755.343	1,1x ↓	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub>	Reinstoff_H <sub>2</sub> B <sub>1a</sub>
894,5575	659.292	587.408	1,1x ↓	899,5129	1.447.283	1.527.778	1,1x ↑	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>14</sub>	Reduktion
906,5567	1.223.514	1.168.067	1x ↓	911,513	958.936	1.035.293	1,1x ↑	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> O <sub>14</sub>	Methylierung
*entspricht: IVM_H <sub>2</sub> B <sub>1b</sub>									
<b>Moxidectin</b>									
m/z-Wert XCMS_online	Intensität	MOX + <i>C. oncophora</i>	Änderung Intensität	m/z-Wert XCMS_online	Intensität	MOX + <i>C. oncophora</i>	Änderung Intensität	Summenformel	mögl. Modifikation
[M+H] <sup>+</sup>	MOX	<i>oncophora</i>		[M+Na] <sup>+</sup>	MOX	<i>oncophora</i>			
626,3689	222.586	228.241	1x ↑	648,3508	1.028.352	994.294	1x ↓	C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>8</sub>	Demethylierung
640,384	24.927.541	23.978.893	1x ↓	662,366	42.501.618	41.609.897	1x ↓	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>8</sub>	Ursprungsstoff
654,3639	76.062	25.668	3x ↓	676,3456	311.329	153.825	2x ↓	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>9</sub>	Oxidation
654,4001	223.197	162.228	1,4x ↓	676,382	774.268	692.965	1,1x ↓	C <sub>38</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>8</sub>	Methylierung
656,3804	101.387	40.963	2,5x ↓	678,3614	389.120	153.800	2,5x ↓	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>9</sub>	Hydroxylierung

Es stellte sich heraus, dass jeder m/z-Wert auch im entsprechenden „ML ohne *C. oncophora*“-Ansatz aufzufinden war. Des Weiteren zeigte sich, dass die Intensitäten der einzelnen m/z-Werte nur geringe Unterschiede aufwiesen und teilweise höhere Intensitäten im Ansatz „ML ohne *C. oncophora*“ aufwiesen als im Inkubationsansatz mit Wurmhomogenisat. Die Intensitäten der zu den Ausgangsstoffen gehörigen m/z-Werte wiesen im Vergleich der Ansätze „ML ohne *C. oncophora*“ und „ML mit *C. oncophora*“ eine nur sehr geringfügige Abnahme auf (1x bzw. 1,2x). Tabelle 25 zeigt neben den zu den m/z-Werten gefundenen Metabolitkandidaten gehörigen Summenformeln auch die Reaktionen, die das Entstehen der Kandidaten theoretisch erklären könnten. Es ist zu beachten, dass den Summenformeln der vermeintlichen Metabolitkandidaten auch andere Konstitutionsisomere zugrunde liegen können und keine Aussage über die Struktur der durch die Summenformeln beschriebenen Moleküle gemacht werden kann.

Abschließend kann gesagt werden, dass neben den m/z-Werten der Ausgangs-ML für IVM vier (inklusive der die IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub>-Komponente ergebende Demethylvariante der IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>-Komponente) und für MOX drei Übereinstimmungen mit den Adduktmassen von berechneten/literaturbekannten Metabolitkandidaten gefunden wurden. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die zu den gefundenen m/z-Werten passenden Summenformeln tatsächlich die Metabolitkandidaten repräsentieren oder ob es sich um Isomere handelt.

#### **4.6.3 Meta-Analyse zur Identifikation von Massen, die einzig im Inkubationsansatz „ML und *C. oncophora*“ vorhanden sind**

Die genaue Durchführung der Meta-Analyse mit der anschließenden Auswertung ist Kapitel 3.2.5.5 zu entnehmen, es ergab sich folgendes Ergebnis:

Für den Ansatz „IVM und *C. oncophora*“ fanden sich 126 für diesen Ansatz spezifische m/z-Werte im Bereich zwischen 161,9 und 1046,6. Eine genaue Auflistung der m/z-Werte und deren Retentionszeiten sind Tabelle 27 im Anhang zu entnehmen. Keiner dieser m/z-Werte entsprach dem eines berechneten oder aus der Literatur bekannten Metaboliten.

Für den Ansatz „MOX und *C. oncophora*“ fanden sich 131 für diesen Ansatz spezifische m/z-Werte im Bereich zwischen 174,8 und 1026,7. Eine genaue Auflistung der m/z-Werte und deren Retentionszeiten sind Tabelle 28 im Anhang zu entnehmen. Keiner dieser m/z-Werte entsprach dem eines berechneten oder aus der Literatur bekannten Metaboliten.

## 5 Diskussion

Um das bisher nur sehr begrenzten Wissen über die Rolle der CYPs am ML-Metabolismus in Nematoden zu erweitern und möglicherweise die Aufklärung von ML-Resistenzmechanismen voranzubringen, wurden in der vorliegenden Arbeit CYPs von Nematoden auf ihre mögliche Beteiligung am ML-Metabolismus überprüft. Dabei wurde primär mit dem Modellnematoden *C. elegans* gearbeitet.

Zum Auffinden von CYP-Kandidaten wurde zum einen das *C. elegans*-CYPom mit CYPs anderer Organismen verglichen, die in ihrer biologischen Funktion in irgendeiner Form mit ML interagieren. Zum anderen wurden in Entwicklungsassays verschiedene *C. elegans*-CYP-loss-of-function-Mutantenstämme hinsichtlich ihrer Entwicklungsfähigkeit in Gegenwart von definierten IVM- bzw. MOX-Konzentrationen mit dem *C. elegans*-Wildtyp verglichen. Der derart ermittelte CYP-Kandidat wurde phylogenetischen Vergleichen mit bekannten Genomsequenzen parasitischer Nematoden unterzogen. Auf Basis dieser Informationen wurden degenerierte Primer für eine PCR-Detektion von homologen Genen in der cDNA von gastrointestinal-parasitischen Wiederkäuernematoden entwickelt. Außerdem wurde der Einfluss der beiden verwendeten ML auf die Expression des ermittelten *C. elegans*-CYP-Kandidaten per quantitativer Real-Time-PCR untersucht. Abschließend wurde anhand von *C. oncophora* L3 die Fähigkeit von parasitischen Nematoden zum ML-Stoffwechsel mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen untersucht.

### 5.1 Das CYPom von *C. elegans* und ML-assoziierte CYPs anderer Organismen

Die Sammlung der CYPs bei *C. elegans* ergab zum Endpunkt der praktischen Projektarbeitsphase im August 2015 eine Anzahl von 76 CYPs (ausgehend von proteinkodierenden Sequenzen), aufgeteilt in 16 Familien mit je ein bis 18 Mitgliedern (Tabelle 11). Die Gesamtzahl der CYPs unterlag während der Zeit der Entstehung der vorliegenden Arbeit Schwankungen, bei der ersten Erhebung im März 2011 wurden 77 proteinkodierende CYP-Sequenzen gefunden, im Sommer 2012 erhöhte sich die Gesamtanzahl auf 78. Mit dieser Anzahl an CYPs wurden sämtliche phylogenetischen Berechnungen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Die aktuelle Zahl von 76 ergab sich durch die zwischenzeitliche Identifizierung von zwei CYPs als Pseudogene (Tabelle 12).

Die stark unterschiedliche Verteilung der CYPs in den verschiedenen Familien wirkt auf den ersten Blick überraschend, passt allerdings zu dem bisher vorhandenen Wissen zur Evolution von CYPs, nach dem im CYPom jeder Spezies wenige CYP-Familien mit vielen Mitgliedern und viele CYP-Familien mit einem oder wenigen Mitgliedern existieren (Sezutsu, Le Goff et al. 2013). Verantwortlich für die Entwicklung dieser Form von Diversität werden Genduplikationen



gemacht, die zur starken Entwicklung einzelner CYP-Familien – sog. „blooms“ – führen können (Feyereisen 2011). Die Rate der Genduplikationen in *C. elegans* soll um zwei Größenordnungen höher sein als die der Punktmutationen (Lipinski, Farslow et al. 2011). Diese Beobachtung würde der Entstehung des „blooming“ von CYP-Familien in diesem Organismus zuarbeiten, da den Punktmutationen in diesem Szenario genug „Arbeitsmaterial“ an CYP-Genen zur Ausbildung der Familien zur Verfügung stünde (Sezutsu, Le Goff et al. 2013).

Die Literatursuche nach CYPs, die in anderen Organismen in ihrer biologischen Funktion mit ML interagieren, ergab Funde für sieben verschiedene Organismen (die drei Invertebraten *Anopheles gambiae*, *Pediculus. h. humanus* und *Tetranychus urticae* sowie die vier Vertebraten *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Ovus musimon* und *Rattus norvegicus*) (Tabelle 13). Verrechnet in einem phylogenetischen Baum mit den 78 *C. elegans*-CYPs zeigte sich Clusterverhalten der vertebraten CYPs gemäß ihrer Unterfamilien über die Artgrenzen hinweg (Abbildung 7). Die verschiedenen Cluster lagen dabei über den Baum verteilt. Aufgrund der Definition der CYP-Unterfamilien über eine Sequenzidentität  $\geq 55\%$  überrascht die Beobachtung des artübergreifenden Clusters gemäß der Familiennamen nicht. Gleiches gilt für die Sequenzen von *A. gambiae* und *P. h. humanus*, auch in diesem Fall gruppierten sich die CYPs gemäß ihrer Unterfamilie. Das CYP-392A16 aus *T. urticae* gruppierte sich abseits der anderen invertebraten Nicht-*C. elegans*-CYPs im Schwesternverhältnis zum *C. elegans*-CYP-36A1 und macht dieses damit zum interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen, zumal für das CYP-392A16 als einziges der invertebraten CYPs die Fähigkeit zum ML-Metabolismus gezeigt wurde (Riga, Tsakireli et al. 2014). Ebenfalls Priorität in der weiterführenden Untersuchung sollte den *C. elegans*-CYPs der Familie 25 gewährt werden, da diese im Schwesterngruppenverhältnis zu der Nicht-*C. elegans*-CYP-Gruppe stehen, welche aus dem Cluster der vertebraten CYP-3A-Mitgliedern sowie dem Cluster der CYPs von *A. gambiae* und *P. h. humanus* besteht (Tabelle 7). Verstärkend kommt dazu, dass für zwei der drei vertebraten CYP-3A-Mitglieder die Fähigkeit zum ML-Metabolismus gezeigt wurde (Tabelle 13). Weitere den Nicht-*C. elegans*-CYP-Gruppen benachbarte *C. elegans*-CYPs sind die 14A-Unterfamilie, das CYP-43A1, CYP-44A1 sowie daf-9. Zwei Vertreter der 14A-Unterfamilie sowie das CYP-44A1 wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits untersucht (4.2.2), den weiteren könnte im Rahmen fortführender Untersuchungen Priorität gegenüber den anderen, noch nicht untersuchten *C. elegans*-CYPs eingeräumt werden.

Neben dieser phylogenetischen Berechnung zur Annäherung an CYP-Kandidaten wurde das CYP-392A16 aus *T. urticae* aufgrund seines invertebraten Ursprunges und seiner Fähigkeit zum ML-Metabolismus noch einer BLASTP-Analyse gegen das *C. elegans*-CYPom unterzogen. Im Kontrast zu dem Ergebnis der phylogenetischen Analyse lagen die ersten zehn

Treffer hierbei in den Familien 14 und 33 (Abbildung 8), das in der phylogenetischen Berechnung im Schwesternverhältnis stehende CYP-36A1 fand sich erst an 15. Position wieder. Als Konsequenz sollte die CYP-33-Gruppe ebenfalls prioritär in weiteren Untersuchungen behandelt werden, in der vorliegenden Arbeit konnte nur einer der insgesamt 18 Vertreter untersucht werden (4.2.2).

Zusammenfassend sei gesagt, dass für die weitere Untersuchung der *C. elegans*-CYPs im Hinblick auf eine eventuelle Beteiligung am ML-Metabolismus auf Grundlage der erhobenen Daten die Priorisierung von CYP-36A1, den übrigens Vertretern der CYP-14- sowie CYP-33-Familie, CYP-43A1 und der CYP-25-Familie vorgeschlagen wird. Daf-9 mag ebenfalls untersucht werden, allerdings ist für dieses CYP bereits eine Rolle in der Regulation des Dauerlarvenstadiums beschrieben (Gerisch and Antebi 2004), was eine weitere Funktion als Detoxifikationsenzym zwar nicht gänzlich ausschließt, aber doch weniger wahrscheinlich erscheinen lässt.

Laing et al. konnten zeigen, dass die vierstündige Inkubation des IVM-resistenten *C. elegans*-Stammes DA1316 mit verschiedenen Konzentrationen von IVM u. a. zu der Hochregulation von *cyp-37B1* führte (Laing, Ivens et al. 2012). Während die Autoren anfänglich der Hypothese nachgingen, die Inkubation mit IVM würde zu einer Hochregulation von Xenobiotika metabolisierenden Enzymen führen, führten sie die Hochregulation des *cyp-37B1* später auf die IVM-induzierte Paralyse des Pharynx und den damit einhergehenden Hungerzustand zurück (dem CYP-37B1 wurde eine Rolle in der Fettmobilisation als Antwort auf den Hungerzustand zugesprochen). Trotzdem sollte aufgrund der noch nicht vollständig geklärten Funktion des CYP-37B1 erwogen werden, die Liste der prioritär zu untersuchenden *C. elegans*-CYPs um dieses zu erweitern, zumal in der Literatur auch dessen Hochregulation als Antwort auf Xenobiotika-Kontakt beschrieben ist (Custodia, Won et al. 2001, Reichert and Menzel 2005, Menzel, Yeo et al. 2007).

## **5.2 Das Screening der *C. elegans*-CYPs im Entwicklungsassay und die Auswirkung der CYP-Inhibierung auf die ML-Empfindlichkeit von *C. elegans***

Neben der Untersuchung von verschiedenen *C. elegans*-Stämme mit jeweils spezifischen CYP-Deletionsmutationen sollte die Rolle der Gesamt-CYPs auf die Empfindlichkeit des *C. elegans*-Wildtyps-Bristol-N2 gegen ML untersucht werden. Hierzu wurden die Würmer mit definierten ML-Konzentrationen und dem unspezifischen CYP-Inhibitor Piperonylbutoxid (PBO) inkubiert, bzw. co-inkubiert (4.2.1). Bei PBO handelt es sich um einen CYP-Inhibitor, der als Insektizid-Synergist breite Anwendung in der Bekämpfung von Schadinsekten findet (Feyereisen 2015). Darüber hinaus wird er in der Forschung verwendet, darunter auch bei der

Arbeit mit Ecdysozoa wie der Milbe *T. urticae* (Kim, Park et al. 2006) oder parasitischen Nematoden wie *H. contortus* und *T. colubriformis* (Kotze, Dobson et al. 2006) sowie *C. oncophora* und *O. ostertagi* (AlGusbi, Krucken et al. 2014). In letzterer Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Co-Inkubation mit PBO zu einer erhöhten Empfindlichkeit der L3 gegenüber IVM führt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Entwicklungsversuche sollten untersuchen, ob sich diese Beobachtung auch auf den Modellnematoden *C. elegans* übertragen lässt.

Insgesamt wurden zwei Testreihen durchgeführt, die sich in den verwendeten ML, der verwendeten ML-Konzentration sowie der Art der Vorbehandlung der Futterbakterien unterschieden.

In der ersten Testreihe wurde ausschließlich mit IVM gearbeitet, da MOX zu diesem Zeitpunkt noch nicht in das Projekt inkludiert war. Die verwendete IVM-Konzentration von 5 nM ging dabei auf die damalige Ergebnislage der Entwicklungsassays mit dem *C. elegans*-Wildtyp N2 zurück und stellte eine die Entwicklung moderat hemmende Konzentration da. Die PBO-Konzentration von 100 µM ging auf die Empfehlung unseres kanadischen Kooperationspartners zurück (persönliche Kommunikation Frau Susan Stasiuk, Ph.D). Die *E. coli* OP-50 Futterbakterien wurden nicht bei -80 °C vorbehandelt, dieser Schritt ergab sich erst im weiteren Verlauf des Projektes im Rahmen von Problemlösungsansätzen. In der Testreihe führte die Co-Inkubation von PBO und IVM zu einer überadditiven Abnahme der Entwicklungsrate der Würmer gegenüber den Einzelinkubationen mit PBO oder IVM (Abbildung 9). Dieser Beobachtung nach scheinen die CYPs einen massiven Einfluß auf die IVM-Empfindlichkeit zu haben.

In der zweiten Testreihe wurde neben IVM auch MOX verwendet (letzteres um das Spektrum der untersuchten ML um einen Vertreter der Milbemycine zu erweitern), beides in einer Konzentration von 2 nM. Die PBO-Konzentration betrug im ersten Teilversuch 100 nM, später wurde aus in Kürze zu erläuternden Gründen mit 25 nM gearbeitet. Die Futterbakterien wurden bei allen Entwicklungsassays der zweiten Testreihe bei -80 °C vorbehandelt, dies war eine Reaktion auf die in vorherigen Entwicklungsassays beobachtete nachlassende Wirkung des IVM. Während zu Zeiten der ersten Testreihe im März 2013 die Verwendung unbehandelter Futterbakterien wiederholbar-verlässliche Ergebnisse im Entwicklungsassay lieferte, zeigte sich in den Monaten danach eine stete Abnahme der Wirkstoffwirksamkeit. Deswegen wurde zum Zeitpunkt der zweiten Testreihe im Oktober 2013 die Vorbehandlung der Futterbakterien angewendet, da durch diese wieder wiederholbar-zuverlässige Ergebnisse im Entwicklungsassay möglich waren.

Die Versuche unter Verwendung der 100  $\mu\text{M}$ -PBO-Konzentration ergaben ein von den Ergebnissen der ersten Testreihe abweichendes Bild: Während die PBO-IVM-Co-Inkubation eine erkennbare, wenn aber auch nicht signifikant unterschiedliche Abnahme der Entwicklung bewirkte, schien die PBO-MOX-Co-Inkubation eher zu einem „Rescue“ der durch das MOX bewirkten Abnahme der Entwicklung zu führen (Abbildung 10). Da im IVM-Versuch bereits die Inkubation mit PBO zu einer erkennbaren, wenn auch nicht signifikanten Abnahme der Entwicklung führte, wurde im zweiten Teilversuch der zweiten Testreihe mit einer PBO-Konzentration von 25 nM gearbeitet. Hierbei ergaben sich weder für den Ansatz mit IVM noch mit MOX signifikante Entwicklungsminderungen in irgendeinem Inkubationsansatz (Abbildung 11).

Aufgrund des sehr heterogenen Bildes, das die beiden Testreihen ergaben, ist eine Bewertung der Rolle der CYPs auf die Empfindlichkeit bei *C. elegans* schwierig. PBO ist als unspezifischer CYP-Inhibitor zwar theoretisch in der Lage alle CYPs zu inhibieren, doch ist hierfür Aktivität der jeweiligen CYPs nötig (Feyereisen 2015). Da allerdings davon auszugehen ist, dass die CYPs von *C. elegans* – so denn sie denn am ML-Metabolismus beteiligt sind – durch ihre damit verbundene metabolische Tätigkeit aktiv sind, sollte eine Inhibition stattfinden.

Es stellt sich die Frage nach der Auswirkung der  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  Behandlung der Futterbakterien. Nach den gesammelten Erfahrungen bewirkt die Verwendung nicht-behandelter Futterbakterien eine schwächere Entwicklungshemmung bei gleicher ML-Konzentration als bei Verwendung von  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  behandelten Futterbakterien. In späteren Entwicklungsassays ergab sich bei der Verwendung von vorbehandelten Futterbakterien unzureichende Entwicklung der Würmer, die nur durch den erneuten Wechsel zu nicht-vorbehandelten Futterbakterien zu beheben war. Insgesamt verbleibt die Bedeutung der Vorbehandlung unklar, in zukünftigen Versuchen sollte ein derartiger Wechsel zwischen vorbehandelten und nicht-vorbehandelten Futterbakterien vermieden werden.

Abschließend soll gesagt sein, dass auf Grundlage der erhobenen Daten keine umfassende Aussage über die Beteiligung von CYPs am ML-Metabolismus in *C. elegans* getätigt werden kann. Zur weiteren Untersuchung sollten Entwicklungsversuche mit CPR-defizienten Stämmen wie dem MJ69 durchgeführt werden, dessen CPR- und damit CYP-Aktivität zusätzlich noch durch den Einsatz von RNAi-Technik reduziert werden kann (Kulas, Schmidt et al. 2008).

Für die Untersuchung der Rolle einzelner CYPs am ML-Metabolismus bei *C. elegans* wurden Entwicklungsassays mit deletionsmutierten CYP-loss-of-function-Stämmen sowie dem N2-Wildtyp durchgeführt (4.2.2). Von den 16 verfügbaren Stämmen konnten 13 untersucht werden, von den übrigen drei Stämmen zeigten zwei kein Wachstum und ein Stamm war

wegen eines Problems in der Stammhaltung beim initialen Screening nicht verfügbar. Von den 13 Stämmen zeigten sechs signifikante Unterschiede in der Entwicklung unter definierten ML-Konzentrationen im Vergleich zum N2-Wildtyp (Abbildung 12), sieben zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 50). Angestrebt waren mindestens drei Versuchsdurchläufe pro Stamm, doch konnte dieses Ziel nicht in allen Fällen eingehalten werden. Von den sechs Stämmen mit signifikanten Entwicklungsunterschieden wurden die drei mit den deutlichsten Abweichungen vom N2-Wildtyp ausgewählt (VC40, VC603 und RB2046) und zusammen mit dem wiederbeschafften VC249 sowie dem N2-Wildtyp einer detaillierteren Untersuchung im Entwicklungsassay unterzogen (4.2.3). Hierbei zeigte der VC249 die am deutlichsten verminderte Entwicklungsfähigkeit unter ML-Einfluss: Schon die kleinste IVM-Konzentration von 1 nM verhinderte die Entwicklung komplett (Abbildung 13). Bei der kleinsten MOX-Konzentration von 1 nM ergab sich noch eine Entwicklungsrate von ~10 %, ab der nächstgrößeren Konzentration von 1,5 nM war die Entwicklung komplett unterbunden (Abbildung 14). Es bleibt zu beachten, dass der Stamm VC249 auch in der Kontrolle nur eine Entwicklungsrate von ~70 % erreichte (im Gegensatz zum N2-Wildtyp mit ~90 %), trotzdem wurde der Stamm VC249 - und damit das in diesem Stamm deletionsmutierte CYP-14A5 - aufgrund der am stärksten ausgeprägten Entwicklungsverminderung unter den detailuntersuchten Stämmen als Kandidat für weitere Untersuchungen ausgewählt. Das Screening weiterer *C. elegans*-CYPs mittels RNAi-Technik konnte aufgrund des zeitlich weit fortgeschrittenen Gesamtprojektes nicht mehr angegangen werden.

Über das CYP-14A5 aus *C. elegans* (accession number: NM\_072034) ist bekannt, dass es eine Rolle in der Hydroxylation des Xenobiotikums PCB52 spielt (Schafer, Muller et al. 2009) und seine Genexpression durch  $\gamma$ -Strahlung hochreguliert wird (White, Gagnon et al. 2009). Darüber hinaus wurde diskutiert ob es eine Rolle in der „recovery“ der Dauerlarve spielt, diese Hypothese konnte aber nicht bestätigt werden (Penn and Crossgrove 2010). Die Tatsache, dass für das CYP-14A5 eine Rolle am Metabolismus eines Xenobiotikums und die Induzierbarkeit seiner Genexpression durch äußere Faktoren nachgewiesen wurde, machte es zu einem interessanten Kandidaten, der auf verschiedene Art und Weise weiter untersucht werden sollte.

Eine Voraussetzung für die genauere Untersuchung des CYP-14A5 war die Herstellung eines *C. elegans*-Stammes, der bis auf die *cyp-14A5*-Deletion genetisch dem N2-Wildtyp entsprach. Dies hatte folgenden Hintergrund: Da die Identifizierung der Deletionsmutation im Stamm VC249 während seiner Herstellung auf Seiten des zuständigen Labors lokusspezifisch per PCR durchgeführt wurde (Barstead and Moerman 2006), war nicht auszuschließen, dass durch die anfängliche Zufallsmutagenese noch weitere, unerkant gebliebene Mutationen im

Genom des VC249 vorhanden waren. Solche unerkannt gebliebenen Mutationen könnten potentiell (mit)verantwortlich für den beobachteten Phänotyp (also der ausgeprägten Empfindlichkeit gegenüber den ML) sein. Durch das vierfache Auskreuzen der *cyp-14A5*-Deletionsmutation in den N2-Wildtyp sollten solche eventuell vorhandenen Mutationen ausgeschlossen werden. Für die Diskussion des Auskreuzungsvorganges selbst sei auf Kapitel 5.3 verwiesen. Während des mehrmonatigen Auskreuzungsvorganges wurde sowohl das in Kapitel 5.4 diskutierte Teilprojekt zur Analyse der *cyp-14A5*-Expression als Antwort auf ML-Vorinkubation in *C. elegans* als auch das in Kapitel 5.5 diskutierte Teilprojekt zur Suche nach *cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden durchgeführt.

Mit diesem vierfach ausgekreuzten VC249-Stamm (VC249\_X4) wurden als Teil der genaueren Untersuchungen zur Rolle des CYP-14A5 weitere Entwicklungsversuche durchgeführt. In diesen wurde der VC249\_X4-Stamm mit dem ursprünglichen VC249-Stamm und dem N2-Wildtyp verglichen (4.2.4). In diesen Versuchen zeigte sich, dass der VC249\_X4-Stamm in seiner Empfindlichkeit vielmehr dem N2-Wildtyp als dem nicht-ausgekreuzten VC249-Stamm entsprach (Abbildung 15 und Abbildung 16). Es ist also davon auszugehen, dass im Genom des ursprünglichen VC249-Stammes weitere Mutationen bestehen, die für die ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber den ML verantwortlich waren. Allerdings muss beim Vergleich der Entwicklungsversuche vor Auskreuzung (Abbildung 13 und Abbildung 14) und nach der Auskreuzung (Abbildung 15 und Abbildung 16) beachtet werden, dass bei letzteren mit nicht - 80 °C behandelten Futterbakterien gearbeitet wurde und daher höhere ML-Konzentrationen verwendet werden mussten. Der Schritt zurück zur Nicht-Vorbehandlung der Futterbakterien musste zur Lösung des zwischenzeitlich aufgetretenen Problems der unzureichenden Entwicklung der Würmer im Assay gemacht werden. Für weitere Untersuchungen ist dringend angeraten die Behandlung der Futterbakterien für den Entwicklungsassay einheitlich zu gestalten, um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Trotzdem bleibt die Erkenntnis über die vom ursprünglichen VC249-Stamm abweichende und vielmehr dem Wildtyp entsprechende Empfindlichkeit des VC249\_X4-Stammes gegenüber IVM und MOX. Zur weiteren, generellen Charakterisierung der Fitness der drei Stämme könnten noch vergleichende Untersuchungen zum Ei-Legeverhalten der jeweiligen Hermaphroditen durchgeführt werden (Schafer 2005).

Über alle Teilversuche hinweg wies IVM stets im Vergleich zu MOX höhere  $EC_{50}$ -Werte auf, d.h. MOX erzielte bei gleicher Konzentration eine stärkere entwicklungshemmende Wirkung als IVM. Dies widerspricht den Daten von Ardelli et al., die für den N2-Wildtyp Entwicklungshemmung bei geringerer IVM- als MOX-Konzentration zeigen konnten (Ardelli, Stitt et al. 2009). Das gleiche Bild zeigte sich für die Pharynxpumprate (Ardelli, Stitt et al. 2009). Der Unterschied mag mit dem unterschiedlichen Aufbau der verwendeten Entwicklungsassays

zusammenhängen; während in der vorliegenden Arbeit mit Inkubation in Flüssigmedium gearbeitet wurde, führten Ardelli et al. ihre Versuche auf ML-behandelten Festagarplatten durch. Möglicherweise neigt MOX aufgrund seiner höheren Hydrophobizität zu einer den Versuchsausgang dementsprechend beeinflussenden Verteilung im Festagar, Angaben zum verwendeten ML-Lösungsmittel wurden nicht gemacht.

Abschließend muss gesagt werden, dass das eigentliche Ziel dieses Teilprojektes, ein Screening aller bekannten *C. elegans*-CYPs, aufgrund der Nicht-Verfügbarkeit weiterer zuverlässiger „loss-of-function“-Stämme und der die Etablierung eines auf RNAi-Technik basierenden Entwicklungsassays verhindernden Zeitknappheit leider nicht erreicht werden konnte. Für weiterführende Untersuchungen sei auf folgendes verwiesen: Im Rahmen des sog. „million mutation project“ wurden neue *C. elegans*-Stämme kreiert, jeweils sequenziert und der Öffentlichkeit verfügbar gemacht (Thompson, Edgley et al. 2013). Die verfügbaren Informationen lassen also zumindest auf genetischer Basis Abweichungen vom Wildtyp erkennen. Hierbei wurden auch weitere CYP-loss-of-function-Stämme kreiert, die für weiterführende Untersuchungen in Frage kämen. Eine weitere Möglichkeit hierfür liegt in der Verwendung von RNAi-Technik, die für *C. elegans* gut beschrieben sowie routinemäßig anwendbar ist (Zhuang and Hunter 2012): Sie funktioniert sogar im Weltall (Etheridge, Nemoto et al. 2011) und wurde bereits erfolgreich für verschiedene CYPs eingesetzt (Schafer, Muller et al. 2009). Die Verwendung der „RNAi by feeding“-Methode - bei der *C. elegans* mit *E. coli*-Bakterien, die die den erwünschten RNAi-Effekt erzielende dsRNA produzieren, gefüttert wird (Boutros and Ahringer 2008) – sollte nebenbei das Problem der einheitlich zu behandelnden Futterbakterien lösen.

Falls der Wunsch bestehen sollte den Entwicklungsassay in seiner jetzigen Form abzuändern, könnte die Verwendung von Gellan-Gel als Grundmedium in Betracht gezogen werden (Brinke, Heininger et al. 2011): Dieses ermöglicht den Würmern eine natürliche Bewegung im dreidimensionalen Raum, ist dabei einfach in eine flüssige Form zu bringen (etwa zur unkomplizierten Handhabung der Würmer) und wurde bereits in Kombination mit IVM in einem Testassay verwendet. Falls doch auf die Nutzung der „RNAi by feeding“-Technik und so auf die mit ihr einhergehende Wahl der Futterbakterien verzichtet werden soll, könnte überlegt werden anstelle des Standard-*E. coli*-Stammes OP50 den Stamm HB101 als Futterbakterien einzusetzen. Für diesen wurde ein im Vergleich zum OP50-Stamm besseres Wachstum der *C. elegans* Würmer beschrieben (So, Tokumaru et al. 2011).

### 5.3 Auskreuzung der *cyp-14A5*-Deletionsmutation in den Bristol-N2-Wildtyp

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben war das vierfache Auskreuzen der *cyp-14A5*-Deletionsmutation in den N2-Wildtyp ein wichtiger Schritt für die genauere Untersuchung des CYP-14A5. Die PCR-Ergebnisse der vier erfolgreichen Auskreuzungsrunden sind Abbildung 19 zu entnehmen. Etwas überraschend ist die scheinbar tiefe Lauffront der *cyp-14A5*-Wildtypallel-Bande: Theoretisch vorhergesagt war eine Fragmentgröße von 1462 bp, auf den Gelbildern selbst erstreckt sich die Bande sowohl in den Kontrollen als auch den PCR-Ansätzen der zu untersuchenden Teilpopulationen in einem Bereich von etwa 1000 bis 1500 bp. Dies lässt sich mit dem unverdünnten Auftragen der PCR-Reaktionsansätze auf das Gel erklären: Dieser maximale Einsatz sollte sicherstellen, dass im Falle von heterozygoten Teilpopulationen auch schwache Banden sichtbar gemacht wurden und somit die versehentliche Wahl einer heterozygoten Population für die weiteren Auskreuzungen ausgeschlossen wurde (die obere Bande der heterozygoten Teilpopulation fünf in der zweiten Auskreuzungsrunde ist ein Beispiel für eine solch schwache Bande).

Ein Problem, das aus Abbildung 19 nicht hervorgeht, ist der nicht zu unterschätzende Zeitaufwand des kompletten, vierfachen Auskreuzungsvorganges. Während eine Auskreuzungsrunde inklusive aller Wachstumszeiten und Laboruntersuchungen in ungefähr drei Wochen durchführbar ist, sagt dies noch nichts über den Ausgang der Auskreuzung aus. Bis zum Erreichen der vierfachen Auskreuzung wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt acht Kreuzungsrunden gestartet, von denen vier aus verschiedenen Gründen nicht erfolgreich waren: entweder kam es in den Elterngeneration zu keiner Verpaarung (was am Ausbleiben der männlichen Würmer (erwarteter Wert: ~50 % der Gesamtnachkommenschaft) in der F1-Generation auszumachen war oder die F2-Generation erbrachte keine für das *cyp-14A5*-Deletionsallel homozygote(n) Teilpopulation(en). Beschleunigen könnte man den Auskreuzungsvorgang durch die Verwendung von single-worm-PCR, die die PCR-Untersuchung eines einzelnen Wurmes erlaubt (Hess, Reinke et al. 2005) und so die zeitintensive Wachstumsphase der F2-Generation auf ein Mindestmaß reduzieren würde.

Als Alternative zum klassischen Auskreuzen von Mutationen bietet sich das „CRISPR-Cas9 Genome Editing“ an, das das zielgerichtete Einbringen von Deletionen in Wunschgene ermöglicht und auch für *C. elegans* etabliert ist (Xu 2015). Auf diesem Wege wäre das Erstellen von CYP-Deletions-Stämmen in Ergänzung oder auch als Alternative zur Verwendung von RNAi-Technik möglich.



#### 5.4 Die Untersuchung der Expression des *cyp-14A5*-Gens in Antwort auf ML-Vorinkubation mit Hilfe von quantitativer Real-Time-PCR

Da bekannt ist, dass Xenobiotika die Expression der sie verstoffwechselnden CYPs induzieren können (Walker 1998) und dies am Beispiel von CYP-14A3 und dem Xenobiotikum PCB52 auch für *C. elegans* gezeigt wurde (Menzel, Yeo et al. 2007, Schafer, Muller et al. 2009), sollte die Expression des *cyp-14A5*-Gens als Antwort auf eine Inkubation der *C. elegans*-Würmer mit sublethalen ML-Dosen untersucht werden. Diese Untersuchung wurde während des Auskreuzungsvorganges der *cyp-14A5*-Deletionsmutation (5.3) durchgeführt, die Ergebnisse der finalen Entwicklungsassays mit dem vierfach ausgekreuzten Stamm VC249\_X4 (5.2) waren also noch nicht bekannt.

Für die Expressionsuntersuchung wurde eine quantitative Real-Time-PCR mit vier Referenzgenen etabliert und mit dieser die Expression des Zielgens in den N2-Wildtyp-Würmern der verschiedenen Inkubationsansätze (Ctrl; 2 nM IVM; 1,5 nM MOX) ermittelt (3.2.1.4). Die Auswahl und Klonierung der Fragmente der für die Etablierung der quantitativen Real-Time-PCR erforderlichen Referenzgene und des Zielgens sind Abbildung 20 bis Abbildung 25 zu entnehmen. Die Überprüfung der Sequenz aller Fragmente verlief erfolgreich (Abbildung 26 und Abbildung 27) und auch die Ermittlung einer passenden Annealing-Temperatur für die Real-Time-PCR gestaltete sich problemlos (Abbildung 28). Die Kurvenverläufe der quantitativen Real-Time-PCR wiesen keine Unregelmäßigkeiten auf (Abbildung 29) und auch die Effizienzen der Plasmidgradienten (Tabelle 14) sowie die analysierten Schmelztemperaturen der einzelnen Fragmente (Tabelle 15) waren regelgerecht. In der finalen Auswertung der Expression des *cyp-14A5*-Gens zeigte sich in den drei Inkubationsansätzen ein fast einheitliches und nicht signifikant unterschiedliches Expressionslevel. Daraus ist zu folgern, dass das *cyp-14A5*-Gen nicht durch IVM oder MOX in seiner Expression beeinflusst wird.

Dies lässt allerdings keine finale Aussage über die Rolle des CYP-14A5 in *C. elegans* am ML-Metabolismus zu: Wie eingangs erwähnt konnte für das CYP-14A3 sowohl die Induktion der Genexpression durch das Xenobiotikum PCB52 als auch die Fähigkeit zur PCB52-Hydroxylierung gezeigt werden, doch wurde für insgesamt drei CYPs eine Beteiligung an der PCB52-Hydroxylierung festgestellt (CYP-14A3, CYP-14A5 und CYP-34A6) (Schafer, Muller et al. 2009). In der Untersuchung zur Genexpressionsinduktion durch PCB52 in *C. elegans* fanden sich *cyp-14A5* und *cyp-34A6* nicht unter den 34 intensiv untersuchten, potentiellen „PCB52-response-genes“, zu denen immerhin 13 CYPs gehörten (Menzel, Yeo et al. 2007). Dies erlaubt rückzuschließen, dass die Fähigkeit zum Xenobiotikumsmetabolismus eines CYPs nicht unbedingt mit dessen Genexpressionsinduktion durch das entsprechende Xenobiotikum einhergehen muss. In einer anderen Studie fand sich das *cyp-14A5* auch nicht

unter den zehn in Antwort auf IVM-Inkubation bei *C. elegans* am stärksten hochregulierten Genen (Laing, Ivens et al. 2012).

Das *C. elegans-cyp-14A5* ist abschließend gesagt in seiner Expression nicht durch sublethale ML-Dosen induzierbar. Was bleibt ist die erfolgreiche Etablierung einer quantitativen Real-Time-PCR mit vier Referenzgenen für *C. elegans*.

## **5.5 Die Suche nach *cyp-14A*-homologen Genen in parasitischen Nematoden**

Ausgehend von der Sequenz des Kandidatengens *cyp-14A5* aus *C. elegans* wurde in parasitischen Nematoden nach homologen CYP-Sequenzen gesucht. Diese Untersuchung wurde ebenfalls während des Auskreuzungsvorganges der *cyp14A5*-Deletionsmutation (5.3) durchgeführt, die Ergebnisse der finalen Entwicklungsassays mit dem vierfach ausgekreuzten Stamm VC249\_X4 (5.2) waren also ebenfalls noch nicht bekannt.

Um das Designverfahren der für die Suche benötigten degenerierten Primer zu bereichern, wurden zu Beginn umfangreiche BLAST-Analysen durchgeführt. Hierbei wurde die AA-Sequenz des CYP-14A5 in verschiedensten BLAST-Verfahren mit den bekannten Genom(fragmenten) parasitischer Nematoden verglichen (4.5.1) und die besten Treffer anschließend in phylogenetischen Bäumen mit dem *C. elegans*-CYPom abgeglichen. Dabei ergaben zwei BLAST-Analysen – der NemaBLAST (4.5.1.4) sowie das von wormbase.org verwendete BLAST-Verfahren (4.5.1.3) – je einen Treffer aus *A. suum*, der im phylogenetischen Baum im Schwesternverhältnis zur CYP-14A-Familie clusterte. Ein Alignment der beiden *A. suum*-Sequenzen ergab eine hochgradige Übereinstimmung (Abbildung 39). Für das Design der degenerierten Primer wurde die längere Sequenz ausgewählt – bei der es sich um das *A. suum*-CYP-2C39 (accession number: J1169326) handelte – und die zusammen mit den Sequenzen der CYP-14A-Familie als Grundlage für den Entwurf der fünf Primer diente.

Mit der PCR mit degenerierten Primern wurden zwei Teilversuche durchgeführt, bei jedem kamen sämtliche sinnvollen Primer-Kombinationen zum Einsatz: Teilversuch eins wurde mit cDNA-Templates durchgeführt, die aus der RNA nativer, adulter *H. contortus*, *C. oncophora* und *O. ostertagi* synthetisiert wurde. Für Teilversuch zwei wurden *C. oncophora* L3 mit der Absicht, die Expression der beteiligten Detoxifikationsgene hochzuregulieren, mit IVM vorinkubiert. Die cDNA der so behandelten Würmer wurde in der PCR als Template eingesetzt. Obwohl Teilversuch eins klonierbare Fragmente für *C. oncophora* und *O. ostertagi* und Teilversuch zwei ebenfalls ein klonierbares Fragment erbrachten, wies keines dieser Fragmente CYP-Charakter auf (Abbildung 42, Abbildung 44). Der Versuch zur *C. elegans-cyp-*

14A-Familie homologe Gene in parasitischen Nematoden aufzuspüren muss also als gescheitert bezeichnet werden.

Der Ansatz CYPs mit Hilfe von degenerierten Primern aufzuspüren, konnte bereits in Bakterien (Roberts, Grogan et al. 2002), Invertebraten wie der Zecke *Boophilus microplus* (He, Chen et al. 2002) und Säugetieren (Alanazi, Saeed et al. 2014) erfolgreich durchgeführt werden. Auch sind PCR-Verfahren mit degenerierten Primern erfolgreich bei der Arbeit mit parasitischen Nematoden eingesetzt worden (Britton and Murray 2002, Miltsch, Krucken et al. 2012, Janssen, Krucken et al. 2013). Formal erfüllt der in der vorliegenden Arbeit gemachte experimentelle Ansatz also alle Kriterien erfolgreich sein zu können. Daher ist das Problem wohl in der Auswahl des für das Design der degenerierten Primer verwendeten Kandidatengens zu suchen. Sollte etwa ein weiterführendes *C. elegans*-Screeningverfahren weitere Kandidatengene aufzeigen oder in der Literatur ausreichend viele CYP-Gene mit ML-Stoffwechselfähigkeit beschrieben werden, könnte ein erneuter PCR-Ansatz mit degenerierten Primern zum Aufspüren von ML-verstoffwechselnden CYP-Kandidaten in parasitischen Nematoden erfolgversprechend sein.

## 5.6 Massenspektrometrische Detektion

Um sich der Frage nach der Fähigkeit von Nematoden zum ML-Stoffwechsel anzunähern, wurden massenspektrometrische Untersuchungen von Inkubationsansätzen mit IVM bzw. MOX und homogenisierten L3 von *C. oncophora* durchgeführt (3.2.2.3). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Inkubationsansätze aufgearbeitet, per LC/MS analysiert und die gewonnenen Daten in das Auswertprogramm XCMS\_online eingespeist. Da die Beschaffenheit der eventuell zu findenden ML-Metabolite nicht bekannt war (wie bereits erwähnt war der einzige beschriebene ML-Metabolit ein nicht weiter charakterisierter MOX-Metabolit aus *H. contortus*) musste im Rahmen dieses „Non-Targeted-Metabolomic“-Ansatzes erst eine Reihe von Metabolitkandidaten zusammengetragen werden. Dies geschah einerseits durch Literatursuche (4.6.1.2), durch vollständig softwaregestützte Berechnung (4.6.1.3.1) sowie für MOX durch eine Kombination von Software-Prognose und manueller Berechnung (4.6.1.3.2). Dies ergab für IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> insgesamt 24 Metabolit-Kandidaten, für IVM\_H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub> insgesamt 21 Metabolit-Kandidaten und für MOX 114 Metabolit-Kandidaten. Die Überprüfung der Messgenauigkeit ergaben eine Übereinstimmung zwischen den theoretisch berechneten Adduktmassen und den experimentell gefundenen m/z-Werten auf drei Nachkommastellen (4.6.2.1), mit dieser Information wurden darauf die massenspektrometrischen Daten der Inkubationsversuche, die sowohl das ML als auch das Wurmhomogenisat enthielten, auf die Adduktmassen der ermittelten Metabolit-Kandidaten untersucht (Tabelle 24). Die Adduktmassen, für die Übereinstimmungen gefunden wurden (vier für IVM, drei für MOX), wurden daraufhin vergleichend in dem „Nur-ML“- und dem „ML und Wurmhomogenisat“-

Ansatz betrachtet (Tabelle 25). Hier zeigte sich für keinen Kandidaten eine deutliche Zunahme im „ML und Wurmhomogenisat“-Ansatz und auch die Intensität der Ausgangs-ML blieb fast gleich. Da für ein vom Zielorganismus gebildetes Metabolit eine deutliche Mengenzunahmen und ein Nicht- bis Geringvorkommen im „Nur-ML“-Ansatz zu erwarten wäre, muss für die gefundenen Adduktmassen ein Metabolitcharakter unter den gegebenen Reaktionsbedingungen wohl ausgeschlossen werden. Da für die gefundenen m/z-Werte keine Fragmentinformationen zur Verfügung stehen (wie sie etwa mit einem Tandem-Massenspektrometer gewonnen werden könnten), kann zu den Strukturen der zu den m/z-Werten gehörigen Verbindungen keine Aussage getroffen werden. Da nur Informationen zu den Summenformeln vorliegen, könnte es sich um die vorhergesagten Metabolitkandidaten oder auch um Isomere handeln.

In einem weiteren Ansatz wurden die m/z-Werte ermittelt, die ausschließlich in den „ML und Wurmhomogenisat“-Ansätzen vorkamen (4.6.3). Dies ergab 126 m/z-Werte für IVM und 131 für MOX, von denen keiner der exakten Masse eines Metabolit-Kandidaten entsprach.

Für andere Wirkstoffgruppen konnte bereits Metabolitproduktion bei Nematoden nachgewiesen werden, so etwa für das Benzimidazol Albendazol bei *C. elegans* (Laing, Ivens et al. 2010). Hierbei konnten zwei Glucosidmetabolite ermittelt werden, bei denen es sich wahrscheinlich um Produkte der Biotransformationsphase II handelt. Allerdings wurden auch zwei Metabolitpeaks (für ABZ-SO und Amino-ABZ) identifiziert, die sich sowohl in den Kontroll- als auch *C. elegans*-Inkubationsansätzen finden ließen. Aufgrund dieser Beobachtung konnte die Bildung dieser Metabolite *C. elegans* nicht alleinig zugesprochen werden, seine Fähigkeit dazu bleibt offen. Aber selbst wenn man dies auf den Intensitätenvergleich der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Übereinstimmungen von ermittelten Metabolitkandidaten und gefundenen m/z-Werten in den „Nur-ML“- und „ML und Wurmhomogenisat“-Ansätzen (Tabelle 25) überträgt, kann den gefundenen m/z-Werten aufgrund der nicht vorhandenen Intensitätszunahme kein Metabolitcharakter zugesprochen werden. Eine weitere Studie hat den Metabolismus von Albendazol bei adulten *H. contortus* untersucht und ebenfalls Glukosid- und Sulfoxidmetabolite gefunden (Cvilink, Skalova et al. 2008). Glukosidierung als metabolische Reaktion ist in Säugetieren ungewöhnlich, doch könnte es sich dabei um einen für Nematoden spezifischen und typischen Vorgang handeln (Laing, Ivens et al. 2010). Diese Hypothese sollte für das Design weiterer Studien zum Wirkstoffmetabolismus bei Nematoden, speziell bei *C. elegans* und Trichostrongyloidea, bedacht werden.

In einer weiteren Studie untersuchten Cvilink et al. die Fähigkeit von *H. contortus* zum Metabolismus von Flubendazol, einem weiteren Wirkstoff aus der Gruppe der Benzimidazole (Cvilink, Kubicek et al. 2008). Der einzige hierbei gefundene Phase-I-Metabolit war ein an der Carbonylgruppe reduzierter Metabolit. Die Untersuchung dreier weiterer, ebenfalls

Carbonylgruppen aufweisender Xenobiotika ergab ein gleiches Bild: stets erfolgte Reduktion an der Carbonylgruppe. Die Strukturformel von IVM und MOX offenbart jeweils nur eine einzige Carbonylgruppe als Bestandteil des Makrolidringes (Abbildung 3). Da die Sammlung der Metabolitkandidaten in der vorliegenden Arbeit auch die m/z-Werte des reduzierten IVM (IVM-H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>: 875,515; IVM-H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub>: 861,500) und MOX (640,384) beinhaltete, diese jedoch im späteren Abgleich der berechneten Massen und experimentell gewonnenen Daten nicht gefunden wurden, ist von einer gleichartigen Reduktionsreaktion zumindest bei IVM und MOX nicht auszugehen. Möglicherweise ist die Carbonylgruppe beider Moleküle bedingt durch ihre Lage nur schwer angreifbar, daher könnte Eprinomectin mit seiner distal gelegenen zweiten Carbonylgruppe ein interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen zum ML-Metabolismus bei Nematoden sein.

Soll bei diesen weiteren Untersuchungen wieder mit dem Homogenisat von (parasitischen) Nematoden gearbeitet werden, sollte die Inkludierung eines NADPH-generierenden Systems (Alvinerie, Dupuy et al. 2001) in die Inkubationsansätze mit Wurmhomogenisat in Erwägung gezogen werden, um den Reaktionszyklus der CYPs inkl. der NADPH-abhängigen CYP-Reduktase zu unterstützen. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit die Homogenisierung der Würmer mit einem Handhomogenisator vorgenommen, was in einer überwiegend unvollkommenen Homogenisierung der Würmer und damit dem Weiterbestehen größerer Gewebeverbände resultierte: Dies sollte die Funktion der CYPs im Gewebe weitgehend erhalten und gleichzeitig einen besseren Kontakt von ML-haltigem Medium und dem CYP-beinhaltenen Gewebe ermöglichen. In der zitierten Arbeit von Alvinerie et al. wurden die Würmer mit einem elektrischen Hochgeschwindigkeits-homogenisator und anschließend mit Ultraschall behandelt, was eine bedeutend feinere Gewebeauflösung zur Folge gehabt haben sollte und damit die Bereitstellung von NADPH sinnvoll erscheinen lässt.

Für weitere Untersuchungen zum Metabolismus von IVM und MOX in Nematoden unter Verwendung von *C. elegans* sei auf den IVM-resistenten Stamm DA1316 verwiesen, der den Einsatz ähnlich höher ML-Konzentrationen wie bei den verwendeten *C. onchophora* L3 ermöglichen sollte. Sollte die Möglichkeit bestehen mit radioaktiv markierten ML arbeiten zu können oder Zugang zu einem HPLC-FLD-Setup bestehen, wäre die Nutzung dieser Optionen dringend angeraten. Darüber hinaus könnten Versuche mit dem allgemeinen CYP-Inhibitor PBO angedacht werden, um in Meta-Analysen den Einfluss der CYPs auf die Komposition der massenspektrometrisch erhobenen Daten zu untersuchen: Möglicherweise könnten m/z-Werte, die beim direkten Vergleich der Inkubationsansätze „ML, PBO und Wurm“ und „ML, kein PBO und Wurm“ zu Tage treten, Rückschlüsse auf von CYPs gebildete Metaboliten geben.

Abschließend soll gesagt werden, dass insgesamt kein vielversprechender ML-Metabolitkandidat für IVM und MOX bei *C. oncophora* ermittelt werden konnte. Weder ließ sich der von Alvinerie et al. beschriebene MOX-Metabolit nachweisen, noch konnte irgendein anderer MOX- oder IVM-Metabolit zweifelsfrei identifiziert werden. Wenn die Fähigkeit zum ML-Stoffwechsel auf Seiten der Nematoden existiert, konnte sie in diesem Teilprojekt nicht gezeigt werden. Was bleibt ist die Durchführung einer „Non-Targeted-Metabolomics“-Analyse, die bis auf die zur Benutzung der LC/MS-Bedienung nötigen Software ausschließlich mit frei oder im Rahmen einer akademischen Lizenz kostenlos nutzbaren Programmen durchgeführt wurde.

## 5.7 Fazit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung von Nematoden-CYPs auf ihre mögliche Beteiligung am ML-Metabolismus und daraus folgend an ML-Resistenz. Die hierzu durchgeführten Untersuchungen an *C. elegans* umfassten ein Screening von *C. elegans*-CYP-loss-of-function-Stämmen, mit denen 16 von 76 CYPs untersucht werden konnten und die das CYP-14A5 als Kandidat hervorbrachten. Weiterführende Untersuchungen dieses CYP-Kandidat ergaben allerdings ein den Erwartungen widersprechendes Bild: Eine als Antwort auf den Kontakt zu IVM und MOX erwartete Steigerung der Genexpression des *cyp-14A5* im *C. elegans*-N2-Wildtyp konnte nicht gezeigt werden. Die Wiederholung der Entwicklungsversuche mit dem vierfach ausgekreuzten Trägerstamm der *cyp-14A5*-Deletionsmutation (VC249\_X4) ergab keine gesteigerte Empfindlichkeit ebendieses Stammes gegen IVM und MOX, wie sie im Rahmen des initialen Screeningprozesses beim nicht-angekreuzten Stamm VC249\_X0 beobachtet wurde. Aus letzterer Beobachtung geht hervor, dass die gesteigerte Empfindlichkeit gegen ML hervorrufoende genetische Veränderung wohl unabhängig vom *cyp-14A5*-Gen im restlichen Genom des VC249\_X0 vorliegt und während des vierfachen Auskreuzungsvorganges durch das entsprechende genetische Material des N2-Wildtyps ersetzt worden sein muss. Der gescheiterte Versuch *cyp-14A*-homologe Gene in parasitischen Nematoden zu finden zeigt zuerst einmal nur, dass in den untersuchten Vertretern keine sequenzähnlichen CYPs aufzuspüren waren. Hätte die bei den *C. oncophora* L3 durchgeführte IVM-Inkubation das Auffinden von CYP-Fragmenten ergeben, stünde dies in einem interessanten Widerspruch zu der nicht eingetretenen Expressionserhöhung des *cyp-14A5* nach ML-Inkubation bei *C. elegans*.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Rolle des CYP-14A5 am ML-Metabolismus äußerst zweifelhaft ist und wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann. Generell konnte der von (AIGusbi, Krucken et al. 2014) an parasitischen Nematoden gezeigte deutliche Einfluss der CYP-Inhibition auf die ML-Empfindlichkeit nicht zweifelsfrei für *C. elegans* nachgewiesen werden. Das Erbringen dieses Nachweises sollte für weiterführende Untersuchungen von

höchster Bedeutung sein. Sollten dann im Rahmen eines weiterführenden Screenings neue CYP-Kandidaten ermittelt werden, könnten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten experimentellen Ansätze zusammen mit den in der Diskussion gegebenen Verbesserungs- und Erweiterungsvorschlägen als Leitfaden für die genauere Untersuchung der neuen Kandidaten dienen. Ergänzend sei noch erwähnt, dass erfolgreich evaluierte CYP-Kandidaten für weiterführende Untersuchungen auch rekombinant exprimiert werden könnten (Kosel, Wild et al. 2011, Zelasko, Palaria et al. 2013) und sich somit neue Untersuchungsmöglichkeiten ergäben.

Entsprechendes gilt für den Nachweis von ML-Metaboliten bei parasitischen Nematoden: Auch wenn die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Suche an sich erfolglos blieb, konnten doch Expertise und Ideen für weitere Untersuchungen gesammelt werden und könnten als Leitfaden für weitere Studien zur Klärung dieser wichtigen Frage dienen.

## 6 Zusammenfassung

Medikamente aus der Gruppe der makrozyklischen Laktone (ML) gehören zu den am häufigsten gegen Wiederkäuer-Nematoden eingesetzten Anthelminthika. Prominente Vertreter sind u.a. Ivermectin (IVM) und Moxidectin (MOX). Während der Wirkmechanismus der ML weitgehend aufgeklärt ist, bleibt der Resistenzmechanismus bislang noch unverstanden. Neben unspezifischen Mechanismen wie Efflux-Transportern werden Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYPs) als mögliche Resistenzursachen diskutiert. Für Nematoden ist die Nachweislage für die Beteiligung von CYPs am ML-Metabolismus noch spärlich. Allerdings konnte gezeigt werden, dass durch Verwendung des allgemeinen CYP-Inhibitors Piperonylbutoxid (PBO) parasitische Wiederkäuernematoden deutlich empfindlicher gegen ML wurden.

Die Identifikation von CYP-Kandidaten von Nematoden, die an der ML-Biotransformation beteiligt sind und somit Basis von Resistenz sein könnten, war Ziel des durchgeführten Projektes. Hierzu wurde primär mit dem Modellnematoden *Caenorhabditis elegans* gearbeitet, für den aktuell 76 CYPs beschrieben sind.

In Entwicklungsassays wurde die Auswirkung von Co-Inkubationen mit ML und PBO auf den *C. elegans*-N2-Bristol-Wildtyp untersucht, die Ergebnislage erwies sich als widersprüchlich und ließ keine eindeutige Schlussfolgerung zu. In weiteren Entwicklungsassays mit *C. elegans*-CYP-„loss-of-function“-Stämmen wurden insgesamt 16 Stämme in ihrer Empfindlichkeit gegen definierte Konzentrationen von IVM und MOX mit dem Bristol-N2-Wildtyp verglichen. Der für das *cyp-14A5* teildeletierte Stamm VC249 zeigte die am stärksten ausgeprägte Empfindlichkeit, daher wurde das CYP-14A5 als Kandidat für weitere Untersuchungen ausgewählt. Mit auf Grundlage der *cyp-14A*-Familie erstellten degenerierten Primern sollten homologe Gene in parasitischen Nematoden PCR-detektiert werden: Dabei wurde sowohl mit cDNA aus nativen *Haemonchus contortus*, *Cooperia oncophora* und *Ostertagia ostertagi* als auch mit cDNA aus mit IVM vorbehandelten *C. oncophora* Drittlarven gearbeitet; in beiden Ansätzen konnte keine CYP-Sequenz detektiert werden. Ein weiteres Teilprojekt untersuchte den Einfluss der beiden verwendeten ML auf die Expression des *cyp-14A5* per quantitativer Real-Time-PCR im *C. elegans*-Wildtyp. Weder die Vorinkubation mit IVM noch MOX bewirkte eine signifikante Steigerung der *cyp-14A5*-Expression im Vergleich zum Kontrollansatz. Zur finalen Evaluierung der Auswirkung der *cyp-14A5*-Deletionsmutation auf die ML-Empfindlichkeit wurde diese vierfach in den *C. elegans*-Bristol-N2-Wildtyp ausgekreuzt und der so erhaltene Stamm VC249\_X4 erneut im Entwicklungsassay untersucht; die in den initialen Versuchen nachgewiesene deutliche Zunahme der Empfindlichkeit konnte nicht reproduziert werden. In einer abschließenden Untersuchung sollte die Fähigkeit zum ML-Stoffwechsel von parasitischen Nematoden mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen



untersucht werden. In *C. oncophora* Drittlarven konnten keine IVM- oder MOX-Metabolite gefunden werden.

## 7 Summary

Macrocyclic lactones (ML) are widely used anthelmintics for the treatment of nematode infections in ruminants. While the mode of action is well known, the mechanism of resistance still remains unclear. Beside unspecific mechanisms such as drug efflux pumps (e.g. P-glycoproteins), cytochrome P450 monooxygenases (CYPs) have been discussed to cause ML-resistance. In previous *in vitro* experiments it was shown that inhibition of CYPs using piperonyl butoxide (PBO) in the parasitic nematodes *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi* results in increased susceptibility of the parasites against ML.

The current doctoral thesis has aimed to identify CYP-candidates in nematodes which are involved in biotransformation of ML and could therefore potentially confer resistance. *Caenorhabditis elegans* was used as a model for parasitic nematodes due to its easy maintenance in the lab, the availability of a broad methodical spectrum and the wide knowledge about its biology. Its genome encodes 76 CYPs and for several CYP-genes mutated loss-of-function-strains are available. As ML of choice Ivermectin (IVM) and Moxidectin (MOX) were used for the studies.

Development assays were performed to examine the influence of PBO on the susceptibility of the *C. elegans*-Bristol-N2-wildtype against IVM and MOX. The results were inconsistent; no clear conclusion could be achieved. Further development assays were performed to compare the susceptibility of 16 *C. elegans*-CYP-loss-of-function-strains against IVM and MOX with the susceptibility of the wildtype. The screening revealed the VC249-strain (deficient for CYP-14A5) as an interesting candidate due to its highly increased susceptibility against both ML.

Based on the *cyp-14A*-family of *C. elegans* degenerated primers were designed for the detection of *cyp-14A*-homologous genes in parasitic nematodes. cDNAs from naïve *Haemonchus contortus*, *Cooperia oncophora* und *Ostertagia ostertagi* as well as cDNA from IVM-induced *C. oncophora* third larval stages (L3) were used, but no *cyp*-sequences were amplified in any of the trials. In another sub-project, the influence of IVM and MOX on the expression of the *cyp-14A5*-gene in the *C. elegans*-wildtype was evaluated via quantitative real-time-PCR. Neither the incubation with non-lethal concentrations of IVM nor MOX resulted in a significantly changed expression of the *cyp-14A5*-gene. For a final evaluation of the influence of the *cyp-14A5*-gen-deletion on the susceptibility of *C. elegans* against ML, the mutation was fourfold outcrossed into the wildtype. The resulting strain VC249\_X4 underwent further analysis in development assays, but the initially observed increased susceptibility against ML was not reproducible. In a final trial, the ability of *C. oncophora* L3 to metabolize IVM and MOX was examined via mass spectrometry in a “non-targeted metabolomics”-

approach. A range of metabolite candidates were designed, but none of them was found in the nematodes.

## 8 Literaturverzeichnis

- (1998). "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology." Science **282**(5396): 2012-2018.
- Aarnio, V., M. Lehtonen, M. Storvik, J. C. Callaway, M. Lakso and G. Wong (2011). "Caenorhabditis Elegans Mutants Predict Regulation of Fatty Acids and Endocannabinoids by the CYP-35A Gene Family." Front Pharmacol **2**: 12.
- Abass, K., M. Turpeinen and O. Pelkonen (2009). "An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes." Journal of Environmental Science and Health, Part B **44**(6): 553-563.
- Afzal, J., A. B. Burke, P. L. Batten, R. L. DeLay and P. Miller (1997). "Moxidectin: Metabolic fate and blood pharmacokinetics of <sup>14</sup>C-labeled moxidectin in horses." Journal of agricultural and food chemistry **45**(9): 3627-3633.
- Afzal, J., S. J. Stout, A. R. Dacunha and P. Miller (1994). "Moxidectin: Absorption, Tissue Distribution, Excretion, and Biotransformation of <sup>14</sup>C-Labeled Moxidectin in Sheep." Journal of Agricultural and Food Chemistry **42**(8): 1767-1773.
- Afzelius, L., C. H. Arnby, A. Broo, L. Carlsson, C. Isaksson, U. Jurva, B. Kjellander, K. Kolmodin, K. Nilsson, F. Raubacher and L. Weidolf (2007). "State-of-the-art tools for computational site of metabolism predictions: comparative analysis, mechanistical insights, and future applications." Drug Metab Rev **39**(1): 61-86.
- Ahmed, Z. H., R. R. Fiala and M. W. Bullock (1993). "Incorporation of carbon-14 in the biosynthesis of the macrolide antibiotic, LL-F28249- $\alpha$ ." J Antibiot (Tokyo) **46**(4): 614-622.
- Aitlhadj, L. and S. R. Sturzenbaum (2014). "Caenorhabditis elegans in regenerative medicine: a simple model for a complex discipline." Drug Discov Today **19**(6): 730-734.
- Alanazi, M., H. Saeed and M. Shalaby (2014). "The use of degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction (DOP-PCR) technique to detect and isolate cytochrome P450 2E1 and 2A genes." African Journal of Biotechnology **11**(11): 2677-2684.
- Alberich, M., C. Menez, J. F. Sutra and A. Lespine (2014). "Ivermectin exposure leads to up-regulation of detoxification genes in vitro and in vivo in mice." Eur J Pharmacol **740**: 428-435.
- AlGusbi, S., J. Krucken, S. Ramunke, G. von Samson-Himmelstjerna and J. Demeler (2014). "Analysis of putative inhibitors of anthelmintic resistance mechanisms in gastrointestinal nematodes of cattle." Int J Parasitol **44**(9): 647-658.

- Altun, Z. F. a. H., D.H. (2016). "Handbook of *C. elegans* Anatomy." In WormAtlas.  
<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>.
- Alvinerie, M., J. Dupuy, C. Eeckhoutte, J. F. Sutra and D. Kerboeuf (2001). "In vitro metabolism of moxidectin in *Haemonchus contortus* adult stages." Parasitol Res **87**(9): 702-704.
- Andrade, C. H., D. C. Silva and R. C. Braga (2014). "In silico prediction of drug metabolism by P450." Curr Drug Metab **15**(5): 514-525.
- Ardelli, B. F. and R. K. Prichard (2013). "Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin." Vet Parasitol **191**(3-4): 264-275.
- Ardelli, B. F., L. E. Stitt, J. B. Tompkins and R. K. Prichard (2009). "A comparison of the effects of ivermectin and moxidectin on the nematode *Caenorhabditis elegans*." Vet Parasitol **165**(1-2): 96-108.
- Awadzi, K., N. O. Opoku, S. K. Attah, J. Lazdins-Helds and A. C. Kuesel (2014). "A randomized, single-ascending-dose, ivermectin-controlled, double-blind study of moxidectin in *Onchocerca volvulus* infection." PLoS Negl Trop Dis **8**(6): e2953.
- Awasthi, A., M. Razzak, R. Al-Kassas, J. Harvey and S. Garg (2012). "An overview on chemical derivatization and stability aspects of selected avermectin derivatives." Chem Pharm Bull (Tokyo) **60**(8): 931-944.
- Awasthi, A., M. Razzak, R. Al-Kassas, J. Harvey and S. Garg (2013). "Analytical profile of moxidectin." Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol **38**: 315-366.
- Awasthi, Y. C., S. Awasthi and P. Zimniak (1997). "Multiple transport proteins involved in the detoxification of endo-and xenobiotics." Frontiers Biosci **2**: d427-d437.
- Bai, X., P. Mamidala, S. P. Rajarapu, S. C. Jones and O. Mittapalli (2011). "Transcriptomics of the bed bug (*Cimex lectularius*)." PLoS One **6**(1): e16336.
- Bariami, V., C. M. Jones, R. Poupardin, J. Vontas and H. Ranson (2012). "Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*." PLoS Negl Trop Dis **6**(6): e1692.
- Barrett, J. (1998). "Cytochrome P450 in parasitic protozoa and helminths." Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol **121**(1-3): 181-183.
- Barstead, R. J. and D. G. Moerman (2006). "*C. elegans* deletion mutant screening." Methods Mol Biol **351**: 51-58.
- Bartley, D. J., H. McAllister, Y. Bartley, J. Dupuy, C. Menez, M. Alvinerie, F. Jackson and A. Lespine (2009). "P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*." Parasitology **136**(9): 1081-1088.

- Baugh, L. R. (2013). "To grow or not to grow: nutritional control of development during *Caenorhabditis elegans* L1 arrest." Genetics **194**(3): 539-555.
- Benenati, G., S. Penkov, T. Muller-Reichert, E. V. Entchev and T. V. Kurzchalia (2009). "Two cytochrome P450s in *Caenorhabditis elegans* are essential for the organization of eggshell, correct execution of meiosis and the polarization of embryo." Mech Dev **126**(5-6): 382-393.
- Benton, H. P., J. Ivanisevic, N. G. Mahieu, M. E. Kurczyk, C. H. Johnson, L. Franco, D. Rinehart, E. Valentine, H. Gowda, B. K. Ubhi, R. Tautenhahn, A. Gieschen, M. W. Fields, G. J. Patti and G. Siuzdak (2015). "Autonomous metabolomics for rapid metabolite identification in global profiling." Anal Chem **87**(2): 884-891.
- Berger, B. J. and A. H. Fairlamb (1993). "Cytochrome P450 in trypanosomatids." Biochem Pharmacol **46**(1): 149-157.
- Blaxter, M. (2011). "Nematodes: The Worm and Its Relatives." PLOS Biology.
- Blaxter, M. and G. Koutsovoulos (2015). "The evolution of parasitism in Nematoda." Parasitology **142 Suppl 1**: S26-39.
- Blaxter, M. L., P. De Ley, J. R. Garey, L. X. Liu, P. Scheldeman, A. Vierstraete, J. R. Vanfleteren, L. Y. Mackey, M. Dorris, L. M. Frisse, J. T. Vida and W. K. Thomas (1998). "A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda." Nature **392**(6671): 71-75.
- Blumenthal, T. (2005). "Trans-splicing and operons." WormBook: 1-9.
- Boutros, M. and J. Ahringer (2008). "The art and design of genetic screens: RNA interference." Nat Rev Genet **9**(7): 554-566.
- Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **77**(1): 71-94.
- Brenton, A. G. and A. R. Godfrey (2010). "Accurate Mass Measurement: Terminology and Treatment of Data." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **21**(11): 1821-1835.
- Brinke, M., P. Heining and W. Traunspurger (2011). "A semi-fluid gellan gum medium improves nematode toxicity testing." Ecotoxicol Environ Saf **74**(7): 1824-1831.
- Britton, C. and L. Murray (2002). "A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes." Molecular and Biochemical Parasitology **122**(1): 21-33.
- Britton, C. and L. Murray (2006). "Using *Caenorhabditis elegans* for functional analysis of genes of parasitic nematodes." International Journal for Parasitology **36**(6): 651-659.
- Burns, A. R., G. M. Luciani, G. Musso, R. Bagg, M. Yeo, Y. Zhang, L. Rajendran, J. Glavin, R. Hunter, E. Redman, S. Stasiuk, M. Schertzberg, G. Angus McQuibban, C. R. Caffrey, S. R. Cutler, M. Tyers, G. Giaever, C. Nislow, A. G. Fraser, C. A. MacRae, J. Gilleard and P. J. Roy (2015).

- "Caenorhabditis elegans is a useful model for anthelmintic discovery." Nat Commun **6**: 7485.
- Butters, M. P., K. C. Kobylinski, K. M. Deus, I. M. da Silva, M. Gray, M. Sylla and B. D. Foy (2012). "Comparative evaluation of systemic drugs for their effects against *Anopheles gambiae*." Acta Trop **121**(1): 34-43.
- Bygarski, E. E., R. K. Prichard and B. F. Ardelli (2014). "Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **4**(3): 143-151.
- Callaway, E. and D. Cyranoski (2015). "Anti-parasite drugs sweep Nobel prize in medicine 2015." Nature **526**(7572): 174-175.
- Campbell, W. C. (1993). "Ivermectin, an antiparasitic agent." Med Res Rev **13**(1): 61-79.
- Campbell, W. C. (2015). "Lessons from the History of Ivermectin and Other Antiparasitic Agents." Annu Rev Anim Biosci.
- Campbell, W. C., R. W. Burg, M. H. Fisher and R. A. Dybas (1984). The Discovery of Ivermectin and Other Avermectins. Pesticide Synthesis Through Rational Approaches, American Chemical Society. **255**: 5-20.
- Campbell, W. C., M. H. Fisher, E. O. Stapley, S. Albers, G. nberg and T. A. Jacob (1983). "Ivermectin: A Potent New Antiparasitic Agent." Science **221**(4613): 823-828.
- Carlsson, L., O. Spjuth, S. Adams, R. C. Glen and S. Boyer (2010). "Use of historic metabolic biotransformation data as a means of anticipating metabolic sites using MetaPrint2D and Bioclipse." BMC Bioinformatics **11**: 362.
- Carter, G. T., J. A. Nietzsche, M. R. Hertz, D. R. Williams, M. M. Siegel, G. O. Morton, J. C. James and D. B. Borders (1988). "LL-F28249 antibiotic complex: a new family of antiparasitic macrocyclic lactones. Isolation, characterization and structures of LL-F28249 alpha, beta, gamma, lambda." J Antibiot (Tokyo) **41**(4): 519-529.
- Chiu, S. H. L., M. L. Green, F. P. Baylis, D. Eline, A. Rosegay, H. Meriwether and T. A. Jacob (1990). "Absorption, tissue distribution, and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep, and rat." Journal of Agricultural and Food Chemistry **38**(11): 2072-2078.
- Chiu, T. L., Z. Wen, S. G. Rupasinghe and M. A. Schuler (2008). "Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(26): 8855-8860.
- Christen, P. and R. Jaussi (2004). Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten, Springer.
- Cihan, E. (2014). *C. elegans* life cycle and developmental stages. 2014-07-08 10:43:45. <https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1096220>.
- Cobb, R. and A. Boeckh (2009). "Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses." Parasit Vectors **2 Suppl 2**: S5.

- Coles, G. C., F. Jackson, W. E. Pomroy, R. K. Prichard, G. von Samson-Himmelstjerna, A. Silvestre, M. A. Taylor and J. Vercruysse (2006). "The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance." Vet Parasitol **136**(3-4): 167-185.
- Corsi, A. K. (2006). "A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*." Analytical Biochemistry **359**(1): 1-17.
- Corsi, A. K., B. Wightman and M. Chalfie (2015). "A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*." **200**(2): 387-407.
- Couthier, A., J. Smith, P. McGarr, B. Craig and J. S. Gilleard (2004). "Ectopic expression of a *Haemonchus contortus* GATA transcription factor in *Caenorhabditis elegans* reveals conserved function in spite of extensive sequence divergence." Molecular and Biochemical Parasitology **133**(2): 241-253.
- Craig, T. M., T. A. Hatfield, J. A. Pankavich and G. T. Wang (1992). "Efficacy of moxidectin against an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep." Vet Parasitol **41**(3-4): 329-333.
- Creek, D. J. and M. P. Barrett (2014). "Determination of antiprotozoal drug mechanisms by metabolomics approaches." Parasitology **141**(1): 83-92.
- Crump, A. and S. Omura (2011). "Ivermectin, 'Wonder drug' from Japan: the human use perspective." Proceedings of the Japan Academy, Series B **87**(2): 13-28.
- Cryle, M. J., J. E. Stok and J. J. De Voss (2003). "Reactions Catalyzed by Bacterial Cytochromes P450." Australian Journal of Chemistry **56**(8): 749-762.
- Currie, B. J., P. Harumal, M. McKinnon and S. F. Walton (2004). "First Documentation of In Vivo and In Vitro Ivermectin Resistance in *Sarcoptes scabiei*." Clinical Infectious Diseases **39**(1): e8-e12.
- Custodia, N., S. Won, A. Novillo, M. Wieland, C. Li and I. Callard (2001). "*Caenorhabditis elegans* as an environmental monitor using DNA microarray analysis." Annals of the New York Academy of Sciences **948**(1): 32-42.
- Cvilink, V., V. Kubicek, M. Nobilis, V. Krizova, B. Szotakova, J. Lamka, M. Varady, M. Kubenova, R. Novotna, M. Gavelova and L. Skalova (2008). "Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*." Vet Parasitol **151**(2-4): 242-248.
- Cvilink, V., J. Lamka and L. Skalova (2009). "Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths." Drug Metab Rev **41**(1): 8-26.
- Cvilink, V., L. Skalova, B. Szotakova, J. Lamka, R. Kostianen and R. A. Ketola (2008). "LC-MS-MS identification of albendazole and flubendazole metabolites formed ex vivo by *Haemonchus contortus*." Anal Bioanal Chem **391**(1): 337-343.
- Danaher, M., L. C. Howells, S. R. Crooks, V. Cerkvenik-Flajs and M. O'Keeffe (2006). "Review of methodology for the determination of



- macrocyclic lactone residues in biological matrices." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **844**(2): 175-203.
- Danaher, M., W. Radeck, L. Kolar, J. Keegan and V. Cerkvnik-Flajs (2012). "Recent developments in the analysis of avermectin and milbemycin residues in food safety and the environment." Curr Pharm Biotechnol **13**(6): 936-951.
- De Vas, M. G., P. Portal, G. D. Alonso, M. Schlesinger, M. M. Flawia, H. N. Torres, S. Fernandez Villamil and C. Paveto (2011). "The NADPH-cytochrome P450 reductase family in *Trypanosoma cruzi* is involved in the sterol biosynthesis pathway." Int J Parasitol **41**(1): 99-108.
- Denisov, I. G., A. Y. Shih and S. G. Sligar (2012). "Structural differences between soluble and membrane bound cytochrome P450s." J Inorg Biochem **108**: 150-158.
- Dent, J. A., M. M. Smith, D. K. Vassilatis and L. Avery (2000). "The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(6): 2674-2679.
- Denver, D. R., P. C. Dolan, L. J. Wilhelm, W. Sung, J. I. Lucas-Lledó, D. K. Howe, S. C. Lewis, K. Okamoto, W. K. Thomas, M. Lynch and C. F. Baer (2009). "A genome-wide view of *Caenorhabditis elegans* base-substitution mutation processes." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(38): 16310-16314.
- Dermauw, W., N. Wybouw, S. Rombauts, B. Menten, J. Vontas, M. Grbic, R. M. Clark, R. Feyereisen and T. Van Leeuwen (2013). "A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(2): E113-122.
- Desjardins, C. A., G. C. Cerqueira, J. M. Goldberg, J. C. Dunning Hotopp, B. J. Haas, J. Zucker, J. M. Ribeiro, S. Saif, J. Z. Levin, L. Fan, Q. Zeng, C. Russ, J. R. Wortman, D. L. Fink, B. W. Birren and T. B. Nutman (2013). "Genomics of *Loa loa*, a *Wolbachia*-free filarial parasite of humans." Nat Genet **45**(5): 495-500.
- Djouaka, R. F., A. A. Bakare, O. N. Coulibaly, M. C. Akogbeto, H. Ranson, J. Hemingway and C. Strode (2008). "Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria." BMC Genomics **9**: 538.
- Douch, P. G. (1976). "Azo- and nitro-reductase activities and cytochromes of *Axcaris lumbricoides* var *suum* and *Moniezia expansa*." Xenobiotica **6**(9): 531-536.
- Dufour, V., R. N. Beech, C. Wever, J. A. Dent and T. G. Geary (2013). "Molecular cloning and characterization of novel glutamate-gated chloride channel subunits from *Schistosoma mansoni*." PLoS Pathog **9**(8): e1003586.

- Dupuy, J., E. Escudero, C. Eeckhoutte, J. F. Sutra, P. Galtier and M. Alvinerie (2001). "In vitro metabolism of <sup>14</sup>C-moxidectin by hepatic microsomes from various species." Vet Res Commun **25**(5): 345-354.
- Eckert, J., K. T. Friedhoff, H. Zahner and P. Deplazes (2005). Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, Enke Stuttgart.
- Estabrook, R. W. (2003). "A passion for P450s (rememberances of the early history of research on cytochrome P450)." Drug Metab Dispos **31**(12): 1461-1473.
- Etheridge, T., K. Nemoto, T. Hashizume, C. Mori, T. Sugimoto, H. Suzuki, K. Fukui, T. Yamazaki, A. Higashibata, N. J. Szewczyk and A. Higashitani (2011). "The effectiveness of RNAi in *Caenorhabditis elegans* is maintained during spaceflight." PLoS One **6**(6): e20459.
- F. Peter Guengerich, E. M. I. (2008,). "Mechanisms of Cytochrome P450 Reactions." Acta Chim. Slov.
- Fay, D. S. (2013). "Classical genetic methods." WormBook: the online review of C. elegans biology: 1.
- Félix, M.-A. and C. Braendle (2010). "The natural history of *Caenorhabditis elegans*." Current Biology **20**(22): R965-R969.
- Felix, M. A., C. Braendle and A. D. Cutter (2014). "A streamlined system for species diagnosis in *Caenorhabditis* (Nematoda: Rhabditidae) with name designations for 15 distinct biological species." PLoS One **9**(4): e94723.
- Feyereisen, R. (2011). "Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics **1814**(1): 19-28.
- Feyereisen, R. (2015). "Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities." Pest Manag Sci **71**(6): 793-800.
- Ffrench-Constant, R. H., P. J. Daborn and G. Le Goff (2004). "The genetics and genomics of insecticide resistance." Trends Genet **20**(3): 163-170.
- Galarini, R., G. Saluti, S. Moretti, D. Giusepponi and G. Dusi (2013). "Determination of macrocyclic lactones in food and feed." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess **30**(6): 1068-1079.
- Geary, T. G. and Y. Moreno (2012). "Macrocyclic lactone anthelmintics: spectrum of activity and mechanism of action." Curr Pharm Biotechnol **13**(6): 866-872.
- Geary, T. G. and D. P. Thompson (2001). "*Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites?" Vet Parasitol **101**(3-4): 371-386.
- Gerisch, B. (2008). "C. elegans-Steroide: Steroidhormone steuern Entwicklung und Alterung." Biospektrum **01.08.**: 25-27.
- Gerisch, B. and A. Antebi (2004). "Hormonal signals produced by DAF-9/cytochrome P450 regulate C. elegans dauer diapause in response to environmental cues." Development **131**(8): 1765-1776.

- Ghosh, R., E. C. Andersen, J. A. Shapiro, J. P. Gerke and L. Kruglyak (2012). "Natural variation in a chloride channel subunit confers avermectin resistance in *C. elegans*." Science (New York, N.y.) **335**(6068): 574-578.
- Godoy, P., H. Che, R. N. Beech and R. K. Prichard (2015). "Characterization of *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-16 and its interaction with the macrocyclic lactone anthelmintics." Mol Biochem Parasitol **204**(1): 11-15.
- Godoy, P., J. Lian, R. N. Beech and R. K. Prichard (2015). "*Haemonchus contortus* P-glycoprotein-2: in situ localisation and characterisation of macrocyclic lactone transport." Int J Parasitol **45**(1): 85-93.
- Gonzalez Canga, A., A. M. Sahagun Prieto, M. Jose Diez Liebana, N. F. Martinez, M. S. Vega and J. J. Vieitez (2009). "The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species." Vet J **179**(1): 25-37.
- Graham, S. E. and J. A. Peterson (1999). "How similar are P450s and what can their differences teach us?" Arch Biochem Biophys **369**(1): 24-29.
- Gray, J. C. and A. D. Cutter (2014). "Mainstreaming *Caenorhabditis elegans* in experimental evolution." Proc Biol Sci **281**(1778): 20133055.
- Gregory, W. F. and J. Parkinson (2003). "*Caenorhabditis elegans*-applications to nematode genomics." Comp Funct Genomics **4**(2): 194-202.
- Griffiths, W. J., T. Koal, Y. Wang, M. Kohl, D. P. Enot and H. P. Deigner (2010). "'Targeted Metabolomics" in der Biomarkerforschung." Angewandte Chemie **122**(32): 5554-5575.
- Groves, J. (2005). Models and Mechanisms of Cytochrome P450 Action. Cytochrome P450. P. Ortiz de Montellano, Springer US: 1-43.
- Guengerich, F. P. (2001). "Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity." Chem Res Toxicol **14**(6): 611-650.
- Guengerich, F. P. (2003). "Cytochromes P450, drugs, and diseases." Mol Interv **3**(4): 194-204.
- Guengerich, F. P. (2006). "Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity." AAPS J **8**(1): E101-111.
- Guengerich, F. P. (2008). "Cytochrome p450 and chemical toxicology." Chem Res Toxicol **21**(1): 70-83.
- Guengerich, F. P. and A. W. Munro (2013). "Unusual cytochrome p450 enzymes and reactions." J Biol Chem **288**(24): 17065-17073.
- Guiliano, D. B. and M. L. Blaxter (2006). "Operon conservation and the evolution of trans-splicing in the phylum Nematoda." PLoS Genet **2**(11): e198.
- Guindon, S., J. F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk and O. Gascuel (2010). "New algorithms and methods to estimate maximum-

- likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0." Syst Biol **59**(3): 307-321.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series.
- Hamberger, B. and S. Bak (2013). "Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **368**(1612): 20120426.
- Hannemann, F., A. Bichet, K. M. Ewen and R. Bernhardt (2007). "Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains." Biochim Biophys Acta **1770**(3): 330-344.
- Hasegawa, K., S. Miwa, K. Isomura, K. Tsutsumiuchi, H. Taniguchi and J. Miwa (2008). "Acrylamide-responsive genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Toxicol Sci **101**(2): 215-225.
- Hasemann, C. A., R. G. Kurumbail, S. S. Boddupalli, J. A. Peterson and J. Deisenhofer (1995). "Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures." Structure **3**(1): 41-62.
- He, H., A. C. Chen, R. B. Davey and G. W. Ivie (2002). "Molecular cloning and nucleotide sequence of a new P450 gene, CYP319A1, from the cattle tick, *Boophilus microplus*." Insect Biochem Mol Biol **32**(3): 303-309.
- He, L., D. Zhao, Y. Su, Y. Liu, J. Nie and J. Lian (2008). "Determination of macrocyclic lactone drug residues in animal muscle by liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Journal of AOAC International **92**(1): 348-358.
- Hennessy, D. and M. Alvinerie (2002). "Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms." Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy: 97-124.
- Hess, H., V. Reinke and M. Koelle (2005). "Construction and screening of deletion mutant libraries to generate *C. elegans* gene knockouts." Community TCEr, editor. Wormbook.
- Hibbs, R. E. and E. Gouaux (2011). "Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor." Nature **474**(7349): 54-60.
- Hodgkin, J., H. R. Horvitz and S. Brenner (1979). "Nondisjunction Mutants of the Nematode *CAENORHABDITIS ELEGANS*." Genetics **91**(1): 67-94.
- Holden-Dye, L. and R. J. Walker (2014). "Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*." WormBook: the online review of *C. elegans* biology: 1.
- Hoogewijs, D., K. Houthoofd, F. Matthijssens, J. Vandesompele and J. R. Vanfleteren (2008). "Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*." BMC Mol Biol **9**: 9.
- Howe, K. L., B. J. Bolt, S. Cain, J. Chan, W. J. Chen, P. Davis, J. Done, T. Down, S. Gao, C. Grove, T. W. Harris, R. Kishore, R. Lee, J. Lomax, Y. Li,

- H.-M. Muller, C. Nakamura, P. Nuin, M. Paulini, D. Raciti, G. Schindelman, E. Stanley, M. A. Tuli, K. Van Auken, D. Wang, X. Wang, G. Williams, A. Wright, K. Yook, M. Berriman, P. Kersey, T. Schedl, L. Stein and P. W. Sternberg (2016). "WormBase 2016: expanding to enable helminth genomic research." Nucleic Acids Research **44**(D1): D774-D780.
- Ikeda, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori and S. Omura (2003). "Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*." Nat Biotechnol **21**(5): 526-531.
- Inokuchi, A., R. Yamamoto, F. Morita, S. Takumi, H. Matsusaki, H. Ishibashi, N. Tominaga and K. Arizono (2015). "Effects of lithium on growth, maturation, reproduction and gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*." J Appl Toxicol.
- Jabbar, A., Z. Iqbal, D. Kerboeuf, G. Muhammad, M. N. Khan and M. Afaq (2006). "Anthelmintic resistance: The state of play revisited." Life Sciences **79**(26): 2413-2431.
- Janssen, I. J., J. Krucken, J. Demeler, M. Basiaga, S. Kornas and G. von Samson-Himmelstjerna (2013). "Genetic variants and increased expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in populations with decreased ivermectin susceptibility." PLoS One **8**(4): e61635.
- Janssen, I. J., J. Krucken, J. Demeler and G. von Samson-Himmelstjerna (2015). "Transgenically expressed *Parascaris* P-glycoprotein-11 can modulate ivermectin susceptibility in *Caenorhabditis elegans*." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **5**(2): 44-47.
- Johnson, T. E. and G. A. Nelson (1991). "*Caenorhabditis elegans*: a model system for space biology studies." Experimental gerontology **26**(2): 299-309.
- Jones, A. K. and D. B. Sattelle (2008). "The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the nematode, *Caenorhabditis elegans*." Invert Neurosci **8**(1): 41-47.
- Jones, L., C. Giorgi and P. Urwin (2011). *C. elegans* as a Resource for Studies on Plant Parasitic Nematodes. Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. J. Jones, G. Gheysen and C. Fenoll, Springer Netherlands: 175-220.
- Jones, L. M., A. J. Flemming and P. E. Urwin (2015). "NHR-176 regulates *cyp-35d1* to control hydroxylation-dependent metabolism of thiabendazole in *Caenorhabditis elegans*." Biochem J **466**(1): 37-44.
- Jones, L. M., S. J. Rayson, A. J. Flemming and P. E. Urwin (2013). "Adaptive and specialised transcriptional responses to xenobiotic stress in *Caenorhabditis elegans* are regulated by nuclear hormone receptors." PLoS One **8**(7): e69956.
- Jones, P., D. Binns, H. Y. Chang, M. Fraser, W. Li, C. McAnulla, H. McWilliam, J. Maslen, A. Mitchell, G. Nuka, S. Pesseat, A. F. Quinn, A. Sangrador-Vegas, M. Scheremetjew, S. Y. Yong, R. Lopez and S. Hunter

- (2014). "InterProScan 5: genome-scale protein function classification." Bioinformatics **30**(9): 1236-1240.
- Kaletta, T. and M. O. Hengartner (2006). "Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism." Nat Rev Drug Discov **5**(5): 387-399.
- Kaplan, R. M. (2004). "Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report." Trends Parasitol **20**(10): 477-481.
- Kaplan, R. M., A. N. Vidyashankar, S. B. Howell, J. M. Neiss, L. H. Williamson and T. H. Terrill (2007). "A novel approach for combining the use of in vitro and in vivo data to measure and detect emerging moxidectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats." Int J Parasitol **37**(7): 795-804.
- Kaschny, M., J. Demeler, I. J. Janssen, T. A. Kuzmina, B. Besognet, T. Kanellos, D. Kerboeuf, G. von Samson-Himmelstjerna and J. Krucken (2015). "Macrocyclic Lactones Differ in Interaction with Recombinant P-Glycoprotein 9 of the Parasitic Nematode *Cylicocylus elongatus* and Ketoconazole in a Yeast Growth Assay." PLoS Pathog **11**(4): e1004781.
- Keller, J., A. Ellieva, D. K. Ma, J. Ju, E. Nehk, A. Konkel, J. R. Falck, W. H. Schunck and R. Menzel (2014). "CYP-13A12 of the nematode *Caenorhabditis elegans* is a PUFA-epoxygenase involved in behavioural response to reoxygenation." Biochem J **464**(1): 61-71.
- Kerboeuf, D., D. Soubieux, R. Guilluy, J. L. Brazier and J. L. Riviere (1995). "In vivo metabolism of aminopyrine by the larvae of the helminth *Heligmosomoides polygyrus*." Parasitol Res **81**(4): 302-304.
- Khajehali, J., P. Van Nieuwenhuysse, P. Demaeght, L. Tirry and T. Van Leeuwen (2011). "Acaricide resistance and resistance mechanisms in *Tetranychus urticae* populations from rose greenhouses in the Netherlands." Pest Manag Sci **67**(11): 1424-1433.
- Kikuchi, T., J. A. Cotton, J. J. Dalzell, K. Hasegawa, N. Kanzaki, P. McVeigh, T. Takanashi, I. J. Tsai, S. A. Assefa, P. J. A. Cock, T. D. Otto, M. Hunt, A. J. Reid, A. Sanchez-Flores, K. Tsuchihara, T. Yokoi, M. C. Larsson, J. Miwa, A. G. Maule, N. Sahashi, J. T. Jones and M. Berriman (2011). "Genomic Insights into the Origin of Parasitism in the Emerging Plant Pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*." PLoS Pathog **7**(9): e1002219.
- Kim, Y. J., H. M. Park, J. R. Cho and Y. J. Ahn (2006). "Multiple resistance and biochemical mechanisms of pyridaben resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)." J Econ Entomol **99**(3): 954-958.
- Kiontke, K. and W. Sudhaus (2006). "Ecology of *Caenorhabditis* species." WormBook: 1-14.
- Kiontke, K. C., M.-A. Félix, M. Ailion, M. V. Rockman, C. Braendle, J.-B. Pénigault and D. H. Fitch (2011). "A phylogeny and molecular barcodes for *Caenorhabditis*, with numerous new species from rotting fruits." BMC Evolutionary Biology **11**(1): 339.

- Kirchmair, J., M. J. Williamson, J. D. Tyzack, L. Tan, P. J. Bond, A. Bender and R. C. Glen (2012). "Computational prediction of metabolism: sites, products, SAR, P450 enzyme dynamics, and mechanisms." J Chem Inf Model **52**(3): 617-648.
- Kosel, M., W. Wild, A. Bell, M. Rothe, C. Lindschau, C. E. Steinberg, W. H. Schunck and R. Menzel (2011). "Eicosanoid formation by a cytochrome P450 isoform expressed in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*." Biochem J **435**(3): 689-700.
- Kotze, A. C. (1997). "Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda)." Int J Parasitol **27**(1): 33-40.
- Kotze, A. C. (2000). "Oxidase activities in macrocyclic-resistant and -susceptible *Haemonchus contortus*." J Parasitol **86**(4): 873-876.
- Kotze, A. C., R. J. Dobson and D. Chandler (2006). "Synergism of rotenone by piperonyl butoxide in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in vitro: potential for drug-synergism through inhibition of nematode oxidative detoxification pathways." Vet Parasitol **136**(3-4): 275-282.
- Kubagawa, H. M., J. L. Watts, C. Corrigan, J. W. Edmonds, E. Sztul, J. Browse and M. A. Miller (2006). "Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment in vivo." Nat Cell Biol **8**(10): 1143-1148.
- Kulas, J., C. Schmidt, M. Rothe, W. H. Schunck and R. Menzel (2008). "Cytochrome P450-dependent metabolism of eicosapentaenoic acid in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Arch Biochem Biophys **472**(1): 65-75.
- Laing, R., D. J. Bartley, A. A. Morrison, A. Rezansoff, A. Martinelli, S. T. Laing and J. S. Gilleard (2015). "The cytochrome P450 family in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*." Int J Parasitol.
- Laing, R., T. Kikuchi, A. Martinelli, I. J. Tsai, R. N. Beech, E. Redman, N. Holroyd, D. J. Bartley, H. Beasley, C. Britton, D. Curran, E. Devaney, A. Gilabert, M. Hunt, F. Jackson, S. L. Johnston, I. Kryukov, K. Li, A. A. Morrison, A. J. Reid, N. Sargison, G. I. Saunders, J. D. Wasmuth, A. Wolstenholme, M. Berriman, J. S. Gilleard and J. A. Cotton (2013). "The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery." Genome Biol **14**(8): R88.
- Laing, S. (2010). Caenorhabditis elegans as a model for nematode metabolism of the anthelmintic drugs ivermectin and albendazole, University of Glasgow.
- Laing, S. T., A. Ivens, V. Butler, S. P. Ravikumar, R. Laing, D. J. Woods and J. S. Gilleard (2012). "The transcriptional response of *Caenorhabditis elegans* to Ivermectin exposure identifies novel genes involved in the response to reduced food intake." PLoS One **7**(2): e31367.
- Laing, S. T., A. Ivens, R. Laing, S. Ravikumar, V. Butler, D. J. Woods and J. S. Gilleard (2010). "Characterization of the xenobiotic response of *Caenorhabditis elegans* to the anthelmintic drug albendazole and the

- identification of novel drug glucoside metabolites." Biochem J **432**(3): 505-514.
- Lamb, D. C., L. Lei, A. G. Warrilow, G. I. Lepesheva, J. G. Mullins, M. R. Waterman and S. L. Kelly (2009). "The first virally encoded cytochrome p450." J Virol **83**(16): 8266-8269.
- Lamb, D. C. and M. R. Waterman (2013). "Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **368**(1612): 20120434.
- Lan, J., X. Zhang and D. Chen (2015). "Molecular mechanisms of dietary restriction in aging-insights from *Caenorhabditis elegans* research." Sci China Life Sci **58**(4): 352-358.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson and D. G. Higgins (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics **23**(21): 2947-2948.
- Leathwick, D., I. Moen, C. a. Miller and I. Sutherland (2000). "Ivermectin-resistant *Ostertagia circumcincta* from sheep in the lower North Island and their susceptibility to other macrocyclic lactone anthelmintics." New Zealand Veterinary Journal **48**(5): 151-154.
- Lee Chiu, S.-H., R. Taub, E. Sestokas, A. Y. H. Lu and T. A. Jacob (1987). "Comparative in Vivo and in Vitro Metabolism of Ivermectin in Steers, Sheep, Swine, and Rat." Drug Metabolism Reviews **18**(2-3): 289-302.
- Lee, H., M.-k. Choi, D. Lee, H.-s. Kim, H. Hwang, H. Kim, S. Park, Y.-k. Paik and J. Lee (2012). "Nictation, a dispersal behavior of the nematode *Caenorhabditis elegans*, is regulated by IL2 neurons." Nature neuroscience **15**(1): 107-112.
- Lespine, A. (2013). "Lipid-like properties and pharmacology of the anthelmintic macrocyclic lactones." Expert Opin Drug Metab Toxicol **9**(12): 1581-1595.
- Lespine, A., J. Dupuy, M. Alvinerie, C. Comera, T. Nagy, P. Krajcsi and S. Orłowski (2009). "Interaction of macrocyclic lactones with the multidrug transporters: the bases of the pharmacokinetics of lipid-like drugs." Curr Drug Metab **10**(3): 272-288.
- Lespine, A., C. Menez, C. Bourguinat and R. K. Prichard (2012). "P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **2**: 58-75.
- Leung, M. C., J. V. Goldstone, W. A. Boyd, J. H. Freedman and J. N. Meyer (2010). "*Caenorhabditis elegans* generates biologically relevant levels of genotoxic metabolites from aflatoxin B1 but not benzo[a]pyrene in vivo." Toxicol Sci **118**(2): 444-453.
- Lim, L. E., C. Vilcheze, C. Ng, W. R. Jacobs, Jr., S. Ramon-Garcia and C. J. Thompson (2013). "Anthelmintic avermectins kill *Mycobacterium*



- tuberculosis, including multidrug-resistant clinical strains." Antimicrob Agents Chemother **57**(2): 1040-1046.
- Lindberg, R. L. and M. Negishi (1989). "Alteration of mouse cytochrome P450 substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue." Nature **339**(6226): 632-634.
- Lindblom, T. H. and A. K. Dodd (2006). "Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*." J Exp Zool A Comp Exp Biol **305**(9): 720-730.
- Lipinski, K. J., J. C. Farslow, K. A. Fitzpatrick, M. Lynch, V. Katju and U. Bergthorsson (2011). "High spontaneous rate of gene duplication in *Caenorhabditis elegans*." Current Biology **21**(4): 306-310.
- Lucius, R. and B. Loos-Frank (1997). Parasitologie.
- Ma, D. K., M. Rothe, S. Zheng, N. Bhatla, C. L. Pender, R. Menzel and H. R. Horvitz (2013). "Cytochrome P450 drives a HIF-regulated behavioral response to reoxygenation by *C. elegans*." Science **341**(6145): 554-558.
- Maibeche-Coisne, M., C. Merlin, M. C. Francois, P. Porcheron and E. Jacquin-Joly (2005). "P450 and P450 reductase cDNAs from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male antennae." Gene **346**: 195-203.
- Marsh, E. K. and R. C. May (2012). "*Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity." Appl Environ Microbiol **78**(7): 2075-2081.
- Martin, J., B. A. Rosa, P. Ozersky, K. Hallsworth-Pepin, X. Zhang, V. Bhonagiri-Palsikar, R. Tyagi, Q. Wang, Y.-J. Choi, X. Gao, S. N. McNulty, P. J. Brindley and M. Mitreva (2015). "Helminth.net: expansions to Nematode.net and an introduction to Trematode.net." Nucleic Acids Research **43**(D1): D698-D706.
- Martin, R., A. Robertson and A. Wolstenholme (2002). "Mode of action of the macrocyclic lactones." Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy: 125-140.
- Martinez-Valladares, M., P. Geldhof, N. Jonsson, F. A. Rojo-Vazquez and P. Skuce (2012). "*Teladorsagia circumcincta*: Molecular characterisation of the *avr-14B* subunit and its relatively minor role in ivermectin resistance." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **2**: 154-161.
- Massey, H. C., M. L. Castelletto, V. M. Bhopale, G. A. Schad and J. B. Lok (2005). "*Sst-tgh-1* from *Strongyloides stercoralis* encodes a proposed ortholog of *daf-7* in *Caenorhabditis elegans*." Molecular and Biochemical Parasitology **142**(1): 116-120.
- Maupas, E. (1900). Modes et formes de reproduction des nématodes.
- Maynard, M. S., P. G. Wislocki and C. C. Ku (1989). "Fate of avermectin B1a in lactating goats." Journal of Agricultural and Food Chemistry **37**(6): 1491-1497.
- McCavera, S., A. T. Rogers, D. M. Yates, D. J. Woods and A. J. Wolstenholme (2009). "An ivermectin-sensitive glutamate-gated chloride

- channel from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*." Mol Pharmacol **75**(6): 1347-1355.
- McCavera, S., T. K. Walsh and A. J. Wolstenholme (2007). "Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers." Parasitology **134**(Pt 8): 1111-1121.
- McKellar, Q. A. and C. Gokbulut (2012). "Pharmacokinetic features of the antiparasitic macrocyclic lactones." Curr Pharm Biotechnol **13**(6): 888-911.
- McLaughlin, L. A., U. Niazi, J. Bibby, J. P. David, J. Vontas, J. Hemingway, H. Ranson, M. J. Sutcliffe and M. J. Paine (2008). "Characterization of inhibitors and substrates of *Anopheles gambiae* CYP6Z2." Insect Mol Biol **17**(2): 125-135.
- Mehlhorn, H. and G. Piekarski (2002). „Grundriss der Parasitenkunde“ Heidelberg, 6, Aufl.
- Menzel, R., T. Bogaert and R. Achazi (2001). "A systematic gene expression screen of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes reveals CYP35 as strongly xenobiotic inducible." Arch Biochem Biophys **395**(2): 158-168.
- Menzel, R., H. L. Yeo, S. Rienau, S. Li, C. E. Steinberg and S. R. Sturzenbaum (2007). "Cytochrome P450s and short-chain dehydrogenases mediate the toxicogenomic response of PCB52 in the nematode *Caenorhabditis elegans*." J Mol Biol **370**(1): 1-13.
- Miller, C., T. Waghorn, D. Leathwick, P. Candy, A. B. Oliver and T. Watson (2012). "The production cost of anthelmintic resistance in lambs." Veterinary parasitology **186**(3): 376-381.
- Miltsch, S. M., J. Krucken, J. Demeler, I. J. Janssen, N. Kruger, A. Harder and G. von Samson-Himmelstjerna (2012). "Decreased emodepside sensitivity in *unc-49* gamma-aminobutyric acid (GABA)-receptor-deficient *Caenorhabditis elegans*." Int J Parasitol **42**(8): 761-770.
- Mounsey, K. E. and J. S. McCarthy (2013). "Treatment and control of scabies." Curr Opin Infect Dis **26**(2): 133-139.
- Murakami, S. (2007). "*Caenorhabditis elegans* as a model system to study aging of learning and memory." Mol Neurobiol **35**(1): 85-94.
- Ndifor, A. M., S. A. Ward and R. E. Howells (1990). "Cytochrome P-450 activity in malarial parasites and its possible relationship to chloroquine resistance." Mol Biochem Parasitol **41**(2): 251-257.
- Nelson, D. R. (1998). Cytochrome P450 nomenclature. Methods Mol Biol. **107**: 15-24.
- Nelson, D. R. (2006). "Cytochrome P450 nomenclature, 2004." Methods Mol Biol **320**: 1-10.
- Nelson, D. R. (2009). "The cytochrome p450 homepage." Hum Genomics **4**(1): 59-65.

- Nelson, D. R., L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, R. W. Estabrook, I. C. Gunsalus and D. W. Nebert (1996). "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." Pharmacogenetics **6**(1): 1-42.
- Nielsen, K. and B. Møller (2005). Cytochrome P450s in Plants. Cytochrome P450. P. Ortiz de Montellano, Springer US: 553-583.
- Njue, A. I. and R. K. Prichard (2004). "Genetic variability of glutamate-gated chloride channel genes in ivermectin-susceptible and -resistant strains of *Cooperia oncophora*." Parasitology **129**(Pt 6): 741-751.
- Omicinski, C. J., J. P. Vanden Heuvel, G. H. Perdew and J. M. Peters (2011). "Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities." Toxicol Sci **120 Suppl 1**: S49-75.
- Omura, S. and A. Crump (2004). "The life and times of ivermectin - a success story." Nat Rev Microbiol **2**(12): 984-989.
- Omura, T. (1999). "Forty Years of Cytochrome P450." Biochemical and Biophysical Research Communications **266**(3): 690-698.
- Omura, T. and R. Sato (1962). "A new cytochrome in liver microsomes." J Biol Chem **237**: 1375-1376.
- Ortiz de Montellano, P. R. and M. A. Correia (1983). "Suicidal destruction of cytochrome P-450 during oxidative drug metabolism." Annu Rev Pharmacol Toxicol **23**: 481-503.
- Ortiz de Montellano, P. R. (2013). "Cytochrome P450-activated prodrugs." Future medicinal chemistry **5**(2): 213-228.
- Osei-Atweneboana, M. Y., K. Awadzi, S. K. Attah, D. A. Boakye, J. O. Gyapong and R. K. Prichard (2011). "Phenotypic evidence of emerging ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*." PLoS Negl Trop Dis **5**(3): e998.
- Padilla, P. A., A. M. Garcia, M. L. Ladage and L. S. Toni (2014). "Caenorhabditis elegans: an old genetic model can learn new epigenetic tricks." Integr Comp Biol **54**(1): 52-60.
- Paiement, J. P., C. Leger, P. Ribeiro and R. K. Prichard (1999). "Haemonchus contortus: effects of glutamate, ivermectin, and moxidectin on inulin uptake activity in unselected and ivermectin-selected adults." Exp Parasitol **92**(3): 193-198.
- Pakharukova, M. Y., N. I. Ershov, E. V. Vorontsova, A. V. Katokhin, T. I. Merkulova and V. A. Mordvinov (2012). "Cytochrome P450 in fluke *Opisthorchis felinus*: identification and characterization." Mol Biochem Parasitol **181**(2): 190-194.
- Patel, D. (2011). "Matrix effect in a view of LC-MS/MS: an overview." Int J Pharm Bio Sci **2**: 559-564.

- Patti, G. J., R. Tautenhahn and G. Siuzdak (2012). "Meta-analysis of untargeted metabolomic data from multiple profiling experiments." Nat Protoc **7**(3): 508-516.
- Peach, M. L., A. V. Zakharov, R. Liu, A. Pugliese, G. Tawa, A. Wallqvist and M. C. Nicklaus (2012). "Computational tools and resources for metabolism-related property predictions. 1. Overview of publicly available (free and commercial) databases and software." Future Med Chem **4**(15): 1907-1932.
- Peltonen, J., V. Aarnio, L. Heikkinen, M. Lakso and G. Wong (2013). "Chronic ethanol exposure increases cytochrome P-450 and decreases activated in blocked unfolded protein response gene family transcripts in caenorhabditis elegans." J Biochem Mol Toxicol **27**(3): 219-228.
- Penn, C. and K. Crossgrove (2010). Genetic Analysis of a Nuclear Receptor Gene and a Cytochrome P450 Gene in Caenorhabditis Elegans and Their Effect on Dauer Recovery, University of Wisconsin--Whitewater.
- Perez, R., I. Cabezas, J. F. Sutra, P. Galtier and M. Alvinerie (2001). "Faecal excretion profile of moxidectin and ivermectin after oral administration in horses." Vet J **161**(1): 85-92.
- Peterson, J. A. and S. E. Graham (1998). "A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450." Structure **6**(9): 1079-1085.
- Phipps, A. N., M. R. Martin-Short, L. Littlewood, S. E. Blanchflower and K. A. F. Gration (2005). "Disposition of 3H-selamectin and 3H-ivermectin in the brain of the cat flea Ctenocephalides felis felis using micro-image analysis." Veterinary Parasitology **131**(1-2): 89-94.
- Pitterna, T. (2008). Nervous System. Modern Crop Protection Compounds, Wiley-VCH Verlag GmbH: 927-1088.
- Portal, P., S. Fernandez Villamil, G. D. Alonso, M. G. De Vas, M. M. Flawia, H. N. Torres and C. Paveto (2008). "Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from Trypanosoma cruzi suggested role on drug resistance." Mol Biochem Parasitol **160**(1): 42-51.
- Poulos, T. and E. Johnson (2005). Structures of Cytochrome P450 Enzymes. Cytochrome P450. P. Ortiz de Montellano, Springer US: 87-114.
- Poupardin, R., M. A. Riaz, J. Vontas, J. P. David and S. Reynaud (2010). "Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito Aedes aegypti." Insect Mol Biol **19**(2): 185-193.
- Precious, W. Y. and J. Barrett (1989). "The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths." Biochim Biophys Acta **992**(2): 215-222.
- Prichard, R., C. Ménez and A. Lespine (2012). "Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity." International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance **2**(0): 134-153.

- Pu, X., Y. Yang, S. Wu and Y. Wu (2010). "Characterisation of abamectin resistance in a field-evolved multiresistant population of *Plutella xylostella*." *Pest Manag Sci* **66**(4): 371-378.
- Ranjan, S., G. Wang, C. Hirschlein and K. Simkins (2002). "Selection for resistance to macrocyclic lactones by *Haemonchus contortus* in sheep." *Veterinary parasitology* **103**(1): 109-117.
- Raunio, H., M. Kuusisto, R. O. Juvonen and O. T. Pentikäinen (2015). "Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes." *Frontiers in Pharmacology* **6**: 123.
- Reichert, K. and R. Menzel (2005). "Expression profiling of five different xenobiotics using a *Caenorhabditis elegans* whole genome microarray." *Chemosphere* **61**(2): 229-237.
- Rendic, S. and F. J. Di Carlo (1997). "Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors." *Drug Metab Rev* **29**(1-2): 413-580.
- Riddle, D. L. (1988). "12 The Dauer Larva." *Cold Spring Harbor Monograph Archive* **17**: 393-412.
- Riga, M., D. Tsakireli, A. Ilias, E. Morou, A. Myridakis, E. G. Stephanou, R. Nauen, W. Dermauw, T. Van Leeuwen, M. Paine and J. Vontas (2014). "Abamectin is metabolized by CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in *Tetranychus urticae*." *Insect Biochem Mol Biol*.
- Roberts, G. A., G. Grogan, A. Greter, S. L. Flitsch and N. J. Turner (2002). "Identification of a New Class of Cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp." *Journal of Bacteriology* **184**(14): 3898-3908.
- Rodríguez-Vivas, R. I., L. C. Pérez-Cogollo, J. A. Rosado-Aguilar, M. M. Ojeda-Chi, I. Trinidad-Martinez, R. J. Miller, A. Y. Li, A. P. de León, F. Guerrero and G. Klafke (2014). "Rhipicephalus(Boophilus) microplus resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico." *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **23**: 113-122.
- Rydberg, P., D. E. Gloriam, J. Zaretski, C. Breneman and L. Olsen (2010). "SMARTCyp: A 2D Method for Prediction of Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism." *ACS Med Chem Lett* **1**(3): 96-100.
- Rydberg, P., M. Rostkowski, D. E. Gloriam and L. Olsen (2013). "The contribution of atom accessibility to site of metabolism models for cytochromes P450." *Mol Pharm* **10**(4): 1216-1223.
- Saeed, H. M., M. H. Mostafa, P. J. O'Connor, J. A. Rafferty and M. J. Doenhoff (2002). "Evidence for the presence of active cytochrome P450 systems in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* adult worms." *FEBS Lett* **519**(1-3): 205-209.
- Sakashita, T., T. Takanami, S. Yanase, N. Hamada, M. Suzuki, T. Kimura, Y. Kobayashi, N. Ishii and A. Higashitani (2010). "Radiation biology of *Caenorhabditis elegans*: germ cell response, aging and behavior." *J Radiat Res* **51**(2): 107-121.

- Sargison, N. D., F. Jackson, D. J. Bartley and A. C. Moir (2005). "Failure of moxidectin to control benzimidazole-, levamisole- and ivermectin-resistant *Teladorsagia circumcincta* in a sheep flock." Vet Rec **156**(4): 105-109.
- Sargison, N. D., F. Jackson, D. J. Wilson, D. J. Bartley, C. D. Penny and J. S. Gilleard (2010). "Characterisation of milbemycin-, avermectin-, imidazothiazole- and benzimidazole-resistant *Teladorsagia circumcincta* from a sheep flock." Vet Rec **166**(22): 681-686.
- Schafer, P., M. Muller, A. Kruger, C. E. Steinberg and R. Menzel (2009). "Cytochrome P450-dependent metabolism of PCB52 in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Arch Biochem Biophys **488**(1): 60-68.
- Schafer, W. R. (2005). "Egg-laying." WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet]. Pasadena (CA): WormBook; 2005-. .
- Schuler, M. A. and S. G. Sligar (2007). Diversities and Similarities in P450 Systems: An Introduction. The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins, John Wiley & Sons, Ltd: 1-26.
- Schwarz, E. M., P. K. Korhonen, B. E. Campbell, N. D. Young, A. R. Jex, A. Jabbar, R. S. Hall, A. Mondal, A. C. Howe, J. Pell, A. Hofmann, P. R. Boag, X. Q. Zhu, T. R. Gregory, A. Loukas, B. A. Williams, I. Antoshechkin, C. T. Brown, P. W. Sternberg and R. B. Gasser (2013). "The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*." Genome Biol **14**(8): R89.
- Scott, J. G. (1999). "Cytochromes P450 and insecticide resistance." Insect Biochem Mol Biol **29**(9): 757-777.
- Sezutsu, H., G. Le Goff and R. Feyereisen (2013). "Origins of P450 diversity." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **368**(1612): 20120428.
- Shoop, W. and M. Soll (2002). Ivermectin, abamectin and eprinomectin. Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy, CABI Publishing Oxon, UK: 1-29.
- Shoop, W. L., H. Mrozik and M. H. Fisher (1995). "Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health." Vet Parasitol **59**(2): 139-156.
- Silverman, G. A., C. J. Luke, S. R. Bhatia, O. S. Long, A. C. Vetica, D. H. Perlmutter and S. C. Pak (2009). "Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode *Caenorhabditis elegans*." Pediatr Res **65**(1): 10-18.
- Sine, S. M. and A. G. Engel (2006). "Recent advances in Cys-loop receptor structure and function." Nature **440**(7083): 448-455.
- Sirim, D., M. Widmann, F. Wagner and J. Pleiss (2010). "Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases." BMC Struct Biol **10**: 34.
- Skalova, L., B. Szotakova, M. Machala, J. Neca, P. Soucek, J. Havlasova, V. Wsol, L. Kridova, E. Kvasnickova and J. Lamka (2001). "Effect of ivermectin on activities of cytochrome P450 isoenzymes in mouflon (*Ovis*

- musimon) and fallow deer (*Dama dama*).  
Chem Biol Interact **137**(2): 155-167.
- Sloan, M. A., B. J. Reaves, M. J. Maclean, B. E. Storey and A. J. Wolstenholme (2015). "Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits from parasitic nematodes in *Caenorhabditis elegans*." Mol Biochem Parasitol.
- So, S., T. Tokumaru, K. Miyahara and Y. Ohshima (2011). "Control of lifespan by food bacteria, nutrient limitation and pathogenicity of food in *C. elegans*." Mech Ageing Dev **132**(4): 210-212.
- Sommer, R. J. and D. J. Bumbarger (2012). "Nematode model systems in evolution and development." Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology **1**(3): 389-400.
- Steel, J. W. (1993). "Pharmacokinetics and metabolism of avermectins in livestock." Vet Parasitol **48**(1-4): 45-57.
- Stout, S. J., A. R. Dacunha, S. S. Wu, J. Zulalian and J. Afzal (1994). "Moxidectin: Characterization of Cattle, Sheep, and Rat in vitro and in vivo Metabolites by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **42**(2): 388-392.
- Strode, C., C. S. Wondji, J. P. David, N. J. Hawkes, N. Lumjuan, D. R. Nelson, D. R. Drane, S. H. Karunaratne, J. Hemingway, W. C. t. Black and H. Ranson (2008). "Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*." Insect Biochem Mol Biol **38**(1): 113-123.
- Stuchlíková, L., R. Jirásko, I. Vokřál, M. Valát, J. Lamka, B. Szotáková, M. Holčápek and L. Skálová (2014). "Metabolic pathways of anthelmintic drug monepantel in sheep and in its parasite (*Haemonchus contortus*)." Drug testing and analysis **6**(10): 1055-1062.
- Sugimoto, M., M. Kawakami, M. Robert, T. Soga and M. Tomita (2012). "Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis." Curr Bioinform **7**(1): 96-108.
- Sun, P., Q. Zhao, F. Yu, H. Zhang, Z. Wu, Y. Wang, Y. Wang, Q. Zhang and W. Liu (2013). "Spiroketal Formation and Modification in Avermectin Biosynthesis Involves a Dual Activity of AveC." Journal of the American Chemical Society **135**(4): 1540-1548.
- Sutherland, I. A. and D. M. Leathwick (2011). "Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue?" Trends Parasitol **27**(4): 176-181.
- Syed, K. and S. S. Mashele (2014). "Comparative Analysis of P450 Signature Motifs EXXR and CXG in the Large and Diverse Kingdom of Fungi: Identification of Evolutionarily Conserved Amino Acid Patterns Characteristic of P450 Family." PLoS ONE **9**(4): e95616.
- Takiguchi, Y., M. Ono, S. Muramatsu, J. Ide, H. Mishima and M. Terao (1983). "Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics. Fermentation, isolation and physico-chemical properties of milbemycins D, E, F, G, and H." J Antibiot (Tokyo) **36**(5): 502-508.

- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2011). "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." Mol Biol Evol **28**(10): 2731-2739.
- Tautenhahn, R., G. J. Patti, D. Rinehart and G. Siuzdak (2012). "XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data." Anal Chem **84**(11): 5035-5039.
- Taylor, P. J. (2005). "Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry." Clinical biochemistry **38**(4): 328-334.
- Thompson, O., M. Edgley, P. Strasbourger, S. Flibotte, B. Ewing, R. Adair, V. Au, I. Chaudhry, L. Fernando, H. Hutter, A. Kieffer, J. Lau, N. Lee, A. Miller, G. Raymant, B. Shen, J. Shendure, J. Taylor, E. H. Turner, L. W. Hillier, D. G. Moerman and R. H. Waterston (2013). "The million mutation project: a new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*." Genome Res **23**(10): 1749-1762.
- Tsai, I. J., M. Zarowiecki, N. Holroyd, A. Garciarrubio, A. Sanchez-Flores, K. L. Brooks, A. Tracey, R. J. Bobes, G. Fragoso, E. Sciutto, M. Aslett, H. Beasley, H. M. Bennett, J. Cai, F. Camicia, R. Clark, M. Cucher, N. De Silva, T. A. Day, P. Deplazes, K. Estrada, C. Fernandez, P. W. Holland, J. Hou, S. Hu, T. Huckvale, S. S. Hung, L. Kamenetzky, J. A. Keane, F. Kiss, U. Koziol, O. Lambert, K. Liu, X. Luo, Y. Luo, N. Macchiaroli, S. Nichol, J. Paps, J. Parkinson, N. Pouchkina-Stantcheva, N. Riddiford, M. Rosenzvit, G. Salinas, J. D. Wasmuth, M. Zamanian, Y. Zheng, X. Cai, X. Soberon, P. D. Olson, J. P. Lacleite, K. Brehm and M. Berriman (2013). "The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism." Nature **496**(7443): 57-63.
- Ura K., K. T., Sakata S., Iguchi T., Arizono K. (2002). "Aquatic Acute Toxicity Testing Using the Nematode *Caenorhabditis elegans*." Journal of Health Science **48**(6): 583-586.
- van Megen, H., S. van den Elsen, M. Holterman, G. Karszen, P. Mooyman, T. Bongers, O. Holovachov, J. Bakker and J. Helder (2009). "A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences." Nematology **11**(6): 927-950.
- van Wyk, J. A. and F. S. Malan (1988). "Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa." Vet Rec **123**(9): 226-228.
- Vokřál, I., V. Jedličková, R. Jirasko, L. Stuchlikova, H. Bartikova, L. Skalova, J. Lamka, M. Holčapek and B. Szotakova (2013). "The metabolic fate of ivermectin in host (*Ovis aries*) and parasite (*Haemonchus contortus*)." Parasitology **140**(03): 361-367.
- Vokřál, I., R. Jirásko, L. Stuchlíková, H. Bártíková, B. Szotáková, J. Lamka, M. Várady and L. Skálová (2013). "Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in



- Haemonchus contortus strains susceptible and resistant to anthelmintics." Veterinary Parasitology **196**(3–4): 373-381.
- Wagstaff, K. M., H. Sivakumaran, S. M. Heaton, D. Harrich and D. A. Jans (2012). "Ivermectin is a specific inhibitor of importin alpha/beta-mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus." Biochem J **443**(3): 851-856.
- Walker, C. H. (1998). "The use of biomarkers to measure the interactive effects of chemicals." Ecotoxicol Environ Saf **40**(1-2): 65-70.
- Ward, J. D. (2015). "Rendering the Intractable More Tractable: Tools from *Caenorhabditis elegans* Ripe for Import into Parasitic Nematodes." Genetics **201**(4): 1279-1294.
- Watson, T. G., B. C. Hosking, D. M. Leathwick and P. F. McKee (1996). "Ivermectin-moxidectin side resistance by *Ostertagia* species isolated from goats and passaged to sheep." Vet Rec **138**(19): 472-473.
- Welz, C., N. Kruger, M. Schniederjans, S. M. Miltsch, J. Krucken, M. Guest, L. Holden-Dye, A. Harder and G. 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): e1001330.
- Werck-Reichhart, D. and R. Feyereisen (2000). "Cytochromes P450: a success story." Genome Biol **1**(6): REVIEWS3003.
- Westheide, W., R. Rieger, W. Dohle, P. Emschermann, K. Goetting, A. Goldschmid, H. Greven, G. Haszprunar, K. Hausmann and K. Herrmann (2004). [Special Zoology. Pt. 1: Protozoa and Invertebrate Animals], Gustav Fischer.
- White, C., S. N. Gagnon, J. F. St-Laurent, C. Gravel, L. I. Proulx and S. Desnoyers (2009). "The DNA damage-inducible *C. elegans* tankyrase is a nuclear protein closely linked to chromosomes." Mol Cell Biochem **324**(1-2): 73-83.
- Williamson, S. M., T. K. Walsh and A. J. Wolstenholme (2007). "The cyst-loop ligand-gated ion channel gene family of *Brugia malayi* and *Trichinella spiralis*: a comparison with *Caenorhabditis elegans*." Invert Neurosci **7**(4): 219-226.
- Wolstenholme, A. J. (2011). "Ion channels and receptor as targets for the control of parasitic nematodes." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **1**(1): 2-13.
- Wolstenholme, A. J., I. Fairweather, R. Prichard, G. von Samson-Himmelstjerna and N. C. Sangster (2004). "Drug resistance in veterinary helminths." Trends Parasitol **20**(10): 469-476.
- Wolstenholme, A. J. and R. M. Kaplan (2012). "Resistance to macrocyclic lactones." Curr Pharm Biotechnol **13**(6): 873-887.
- Wolstenholme, A. J. and A. T. Rogers (2005). "Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics." Parasitology **131** **Suppl**: S85-95.

- Wood, W. B. (1987). The nematode *Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbour Laboratory.
- Wren, J. F., P. Kille, D. J. Spurgeon, S. Swain, S. R. Sturzenbaum and T. Jager (2011). "Application of physiologically based modelling and transcriptomics to probe the systems toxicology of aldicarb for *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1900)." Ecotoxicology **20**(2): 397-408. [www.biosicherheit.de](http://www.biosicherheit.de). "Auskreuzung." from <http://www.biosicherheit.de/lexikon/731.auskreuzung.html>.
- Xu, S. (2015). "The application of CRISPR-Cas9 genome editing in *Caenorhabditis elegans*." J Genet Genomics **42**(8): 413-421.
- Xu, X. L., X. Q. Wu, J. R. Ye and L. Huang (2015). "Molecular characterization and functional analysis of three pathogenesis-related cytochrome P450 genes from *Bursaphelenchus xylophilus* (Tylenchida: Aphelenchoidoidea)." Int J Mol Sci **16**(3): 5216-5234.
- Yoon, K. S., J. P. Strycharz, J. H. Baek, W. Sun, J. H. Kim, J. S. Kang, B. R. Pittendrigh, S. H. Lee and J. M. Clark (2011). "Brief exposures of human body lice to sublethal amounts of ivermectin over-transcribes detoxification genes involved in tolerance." Insect Mol Biol **20**(6): 687-699.
- Yoon, Y. J., E. S. Kim, Y. S. Hwang and C. Y. Choi (2004). "Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation." Appl Microbiol Biotechnol **63**(6): 626-634.
- Zelasko, S., A. Palaria and A. Das (2013). "Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using *Escherichia coli* expression systems." Protein Expr Purif **92**(1): 77-87.
- Zeng, Z., N. Andrew, B. Arison, D. Luffer-Atlas and R. Wang (1998). "Identification of cytochrome P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes." Xenobiotica **28**(3): 313-321.
- Zeng, Z., N. W. Andrew, J. M. Woda, B. A. Halley, L. S. Crouch and R. W. Wang (1996). "Role of Cytochrome P450 Isoforms in the Metabolism of Abamectin and Ivermectin in Rats." Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**(10): 3374-3378.
- Zeng\*, Z., N. Andrew and B. Halley (1997). "Identification of cytochrome P4503A as the major enzyme sub-family responsible for the metabolism of 22, 23-dihydro-13-O-[(2-methoxyethoxy) methyl] avermectin B1 aglycone by rat liver microsomes." Xenobiotica **27**(10): 985-994.
- Zhang, Y., D. Chen, M. A. Smith, B. Zhang and X. Pan (2012). "Selection of reliable reference genes in *Caenorhabditis elegans* for analysis of nanotoxicity." PLoS One **7**(3): e31849.
- Zhuang, J. J. and C. P. Hunter (2012). "RNA interference in *Caenorhabditis elegans*: uptake, mechanism, and regulation." Parasitology **139**(5): 560-573.

Zulalian, J., S. J. Stout, A. R. Dacunha, T. Garces and P. Miller (1994). "Absorption, Tissue Distribution, Metabolism, and Excretion of Moxidectin in Cattle." Journal of Agricultural and Food Chemistry **42**(2): 381-387.

## 9 Anhang

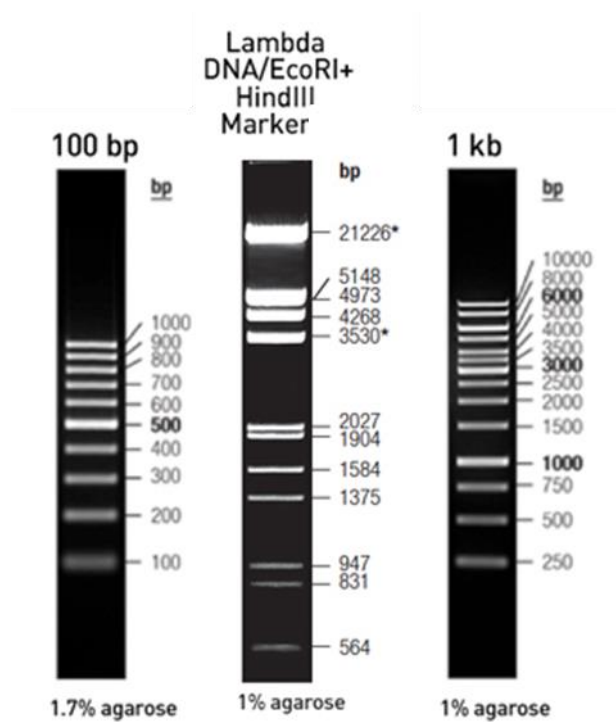


Abbildung 49: Detailangaben zu den Fragmentgrößen der verwendeten Größenstandards für die Gelelektrophorese (Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder, Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker; Quelle: <https://www.thermofisher.com>)

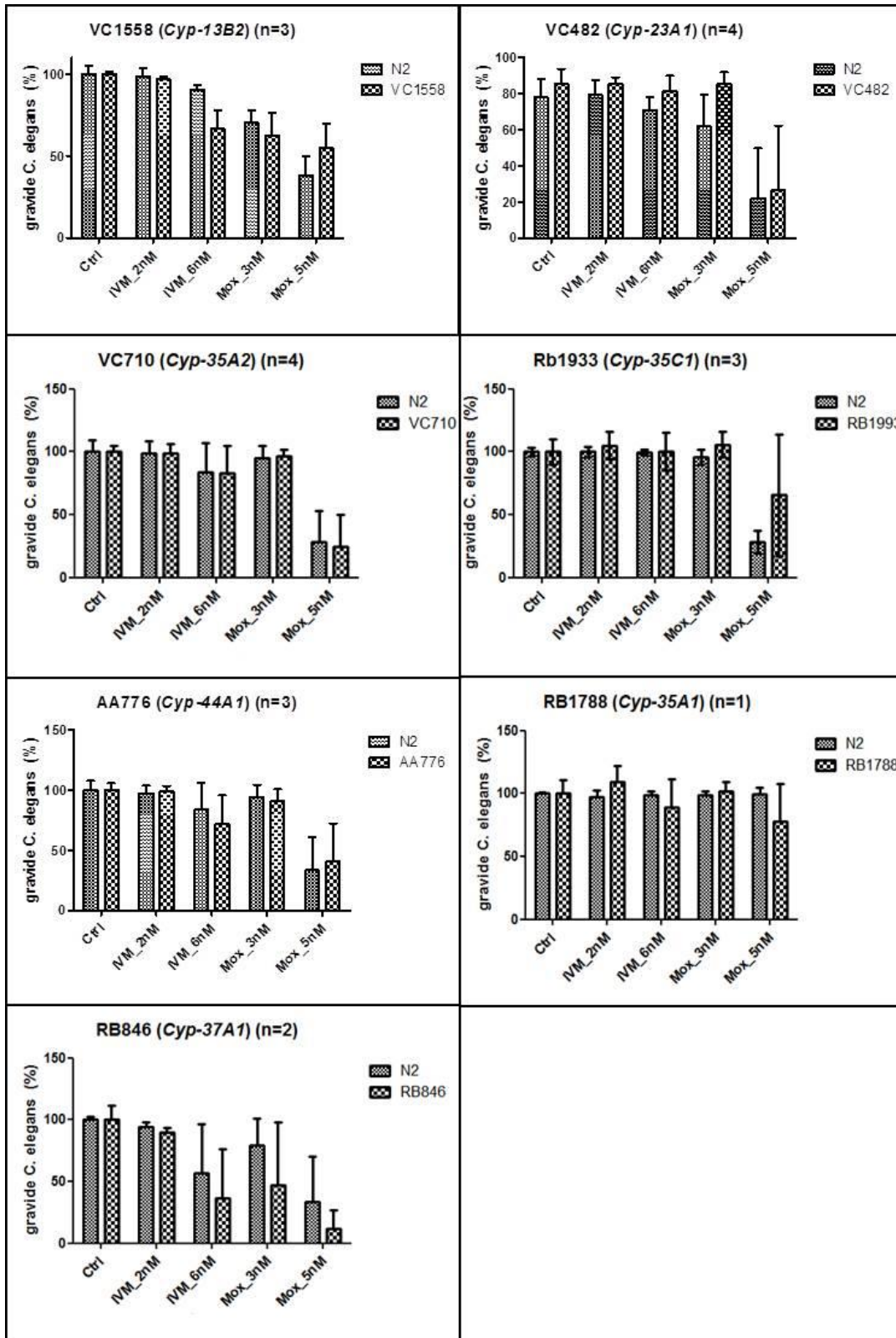


Abbildung 50: Übersicht über die *C. elegans*-CYP-loss-of-function-Mutanten, die im Entwicklungsassay keinen signifikanten Unterschied zum N2 Wildtyp aufwiesen, *E. coli* OP50- Futterbakterien bei -80 °C vorbehandelt (Werte normalisiert; Säulen zeigen Mittelwerte, Fehlerbalken Standardabweichungen; Statistik: Oneway ANOVA, p

Tabelle 26: Liste der rein rechnerisch möglichen MOX-Metabolite auf Grundlage von MetaPrint2D-React

C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>8</sub> - C <sub>36</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>16</sub>				C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>8</sub> - C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>16</sub>			
	exakte Masse	Addukte			exakte Masse	Addukte	
		[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>			[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>8</sub>	625,361468	626,368744	648,350686	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>8</sub>	637,361468	638,368744	660,350686
C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>9</sub>	641,356383	642,363659	664,345601	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>9</sub>	653,356383	654,363659	676,345601
C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>10</sub>	657,351298	658,358574	680,340516	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>10</sub>	669,351298	670,358574	692,340516
C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>11</sub>	673,346213	674,353489	696,335431	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>11</sub>	685,346213	686,353489	708,335431
C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>12</sub>	689,341129	690,348405	712,330347	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>12</sub>	701,341129	702,348405	724,330347
C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>13</sub>	705,336044	706,343320	728,325262	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>13</sub>	717,336044	718,343320	740,325262
C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>14</sub>	721,330959	722,338235	744,320177	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>14</sub>	733,330959	734,338235	756,320177
C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>15</sub>	737,325874	738,333150	760,315092	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>15</sub>	749,325874	750,333150	772,315092
C <sub>36</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>16</sub>	753,320789	754,328065	776,310007	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>16</sub>	765,320789	766,328065	788,310007
C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>8</sub>	626,369294	627,376570	649,358512	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>8</sub>	638,369294	639,376570	661,358512
C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>9</sub>	642,364209	643,371485	665,353427	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>9</sub>	654,364209	655,371485	677,353427
C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>10</sub>	658,359124	659,366400	681,348342	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>10</sub>	670,359124	671,366400	693,348342
C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>11</sub>	674,354039	675,361315	697,343257	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>11</sub>	686,354039	687,361315	709,343257
C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>12</sub>	690,348954	691,356230	713,338172	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>12</sub>	702,348954	703,356230	725,338172
C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>13</sub>	706,343869	707,351145	729,333087	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>13</sub>	718,343869	719,351145	741,333087
C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>14</sub>	722,338784	723,346060	745,328002	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>14</sub>	734,338784	735,346060	757,328002
C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>15</sub>	738,333699	739,340975	761,322917	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>15</sub>	750,333699	751,340975	773,322917
C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>16</sub>	754,328614	755,335890	777,317832	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>16</sub>	766,328614	767,335890	789,317832
C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>8</sub>	627,377119	628,384395	650,366337	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>8</sub>	639,377119	640,384395	662,366337
C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>9</sub>	643,372034	644,379310	666,361252	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>9</sub>	655,372034	656,379310	678,361252
C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>10</sub>	659,366949	660,374225	682,356167	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>10</sub>	671,366949	672,374225	694,356167
C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>11</sub>	675,361864	676,369140	698,351082	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>11</sub>	687,361864	688,369140	710,351082
C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>12</sub>	691,356779	692,364055	714,345997	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>12</sub>	703,356779	704,364055	726,345997
C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>13</sub>	707,351694	708,358970	730,340912	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>13</sub>	719,351694	720,358970	742,340912
C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>14</sub>	723,346609	724,353885	746,335827	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>14</sub>	735,346609	736,353885	758,335827
C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>15</sub>	739,341523	740,348799	762,330741	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>15</sub>	751,341523	752,348799	774,330741
C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>16</sub>	755,336438	756,343714	778,325656	C <sub>37</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>16</sub>	767,336438	768,343714	790,325656
C <sub>36</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>8</sub>	628,384944	629,392220	651,374162	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>8</sub>	640,384944	641,392220	663,374162
C <sub>36</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>9</sub>	644,379859	645,387135	667,369077	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>9</sub>	656,379859	657,387135	679,369077
C <sub>36</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>10</sub>	660,374774	661,382050	683,363992	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>10</sub>	672,374774	673,382050	695,363992
C <sub>36</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>11</sub>	676,369689	677,376965	699,358907	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>11</sub>	688,369689	689,376965	711,358907
C <sub>36</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>12</sub>	692,364604	693,371880	715,353822	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>12</sub>	704,364604	705,371880	727,353822
C <sub>36</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>13</sub>	708,359519	709,366795	731,348737	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>13</sub>	720,359519	721,366795	743,348737
C <sub>36</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>14</sub>	724,354434	725,361710	747,343652	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>14</sub>	736,354434	737,361710	759,343652
C <sub>36</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>15</sub>	740,349349	741,356625	763,338567	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>15</sub>	752,349349	753,356625	775,338567
C <sub>36</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>16</sub>	756,344264	757,351540	779,333482	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>16</sub>	768,344264	769,351540	791,333482
C <sub>36</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>8</sub>	629,392769	630,400045	652,381987	C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>8</sub>	641,392769	642,400045	664,381987
C <sub>36</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>9</sub>	645,387684	646,394960	668,376902	C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>9</sub>	657,387684	658,394960	680,376902
C <sub>36</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>10</sub>	661,382599	662,389875	684,371817	C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>10</sub>	673,382599	674,389875	696,371817
C <sub>36</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>11</sub>	677,377514	678,384790	700,366732	C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>11</sub>	689,377514	690,384790	712,366732
C <sub>36</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>12</sub>	693,372429	694,379705	716,361647	C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>12</sub>	705,372429	706,379705	728,361647

Anhang

$C_{36}H_{55}NO_{13}$	709,367344	710,374620	732,356562	$C_{37}H_{55}NO_{13}$	721,367344	722,374620	744,356562
$C_{36}H_{55}NO_{14}$	725,362259	726,369535	748,351477	$C_{37}H_{55}NO_{14}$	737,362259	738,369535	760,351477
$C_{36}H_{55}NO_{15}$	741,357174	742,364450	764,346392	$C_{37}H_{55}NO_{15}$	753,357174	754,364450	776,346392
$C_{36}H_{55}NO_{16}$	757,352089	758,359365	780,341307	$C_{37}H_{55}NO_{16}$	769,352089	770,359365	792,341307

**Tabelle 27: Liste der einzig im Inkubationsansatz „IVM und *C. oncophora*“ vorhandenen Massen (m/z-Werte und Retentionszeiten sind Medianwerte)**

m/z-Wert	Retentionszeit (min)	m/z-Wert	Retentionszeit (min)	m/z-Wert	Retentionszeit (min)
161,8798756	1,64	503,8662469	5,63	689,4878160	2,57
162,9172239	2,02	527,2915753	8,09	692,4696693	3,31
168,7644864	6,03	531,1929647	7,35	695,0359880	8,40
216,8679872	2,02	532,1747006	1,61	696,2573257	8,43
235,6505136	4,46	540,9160705	7,64	718,4161192	5,07
300,8293664	2,01	542,2346267	6,29	729,4771082	6,64
348,0912747	4,96	546,9297310	8,26	737,4986275	3,33
350,8252620	2,04	548,9276202	7,62	738,5057256	4,51
352,7710446	4,90	553,3746703	2,24	739,4450461	3,33
359,7693248	5,15	559,4509495	5,31	740,3187296	0,92
368,7845493	5,15	565,0446359	5,78	744,4062346	4,54
375,3668098	7,23	568,3092691	4,45	747,4364886	5,44
379,7848491	5,97	573,1158522	1,74	754,5013370	5,52
381,7824105	5,18	575,2038773	6,29	757,4351550	2,13
390,7755177	5,95	578,9513344	7,78	769,5110998	4,19
394,8080497	6,61	581,2168444	6,28	783,4504790	4,81
395,7982501	4,94	582,1452636	1,46	783,5212698	8,94
397,1053629	1,77	584,3047390	1,47	786,5278794	9,88
401,1364508	2,53	588,1667365	6,28	786,5355439	8,15
407,1658653	9,85	596,4488260	9,05	787,5417260	9,14
411,7745318	3,37	597,9545944	7,94	797,5224984	5,53
412,8105049	5,20	598,9572079	7,94	801,4620978	2,13
413,8129802	5,21	599,4561976	4,80	809,5921750	6,07
416,8079913	5,31	599,9160588	5,64	812,4845836	5,94
431,0989743	4,45	607,9133516	4,60	812,5127441	4,88
439,7738563	4,15	607,9727689	7,94	827,4976645	3,36
443,9487853	1,27	610,1368630	1,39	827,5125311	6,08
446,8272282	5,93	617,1805315	5,27	832,4703799	5,43
450,7864141	4,88	619,1613496	5,40	839,1343531	9,16
455,8419704	5,93	621,9293333	5,64	845,6028048	6,63
456,8368287	5,25	626,9762482	8,09	855,5076829	5,94
458,8127610	5,24	632,9415505	6,06	892,4886839	1,39
462,8547190	5,65	637,3924528	3,62	896,5803318	1,53
466,2750626	8,11	641,7651352	7,30	913,5496009	6,21
468,8274701	6,20	642,0998484	7,30	919,5105618	5,51
471,8421010	5,54	651,3927694	3,29	922,6103762	10,34
476,8378311	4,90	652,4558510	5,64	927,5864143	5,94
478,8500727	5,26	666,0140042	8,25	984,2418736	10,06
487,1229594	9,85	671,3652755	5,07	986,6323075	6,19
487,9720299	4,48	672,2713768	1,40	1013,2639182	10,22
493,8555456	5,53	676,0716153	1,27	1018,7609209	7,39
497,8477923	4,91	682,4217426	5,52	1046,5915114	6,24



**Tabelle 28: Liste der einzig im Inkubationsansatz „MOX und *C. oncophora*“ vorhandenen Massen (m/z-Werte und Retentionszeiten sind Medianwerte)**

m/z-Wert	Retentionszeit (min)	m/z-Wert	Retentionszeit (min)	m/z-Wert	Retentionszeit (min)
174,8866794	1,98	544,0943074	1,50	685,4729157	5,93
201,0733866	0,37	544,3360756	7,73	694,7687496	1,54
202,9097940	1,94	545,3394375	7,76	703,2450703	1,97
268,7112900	4,88	547,0078986	4,41	704,9680482	7,53
300,8294736	2,03	552,8649592	4,62	712,3966224	3,32
312,7374727	4,87	559,8902342	7,64	719,4476365	1,49
318,6976512	5,16	561,6834438	4,44	724,7857792	0,92
334,7505924	4,86	566,1371074	1,29	726,9782871	7,52
352,7710497	4,88	568,9323990	7,75	729,5336575	8,54
356,7638744	4,86	571,6900351	1,51	731,4982246	6,08
368,7626072	5,52	574,8781072	4,62	733,7888552	1,50
371,7389687	1,35	575,2019876	6,26	735,5554529	4,52
402,7314676	1,58	582,1447559	1,46	737,4984220	3,33
418,8102582	4,86	582,2955189	6,94	755,4188351	3,33
423,8109523	5,58	582,9051513	7,63	779,5183831	7,51
423,8110060	5,92	585,9001862	4,61	783,4500536	4,79
424,7343362	1,35	588,1664311	6,26	786,5356546	8,09
424,8141677	5,92	591,8656905	4,32	787,5407561	9,09
446,7580423	1,40	592,7097147	1,51	806,5168510	9,07
446,8272807	5,91	594,0618467	5,76	812,4851172	5,93
446,8296040	5,64	596,7100061	4,63	815,5146800	5,12
454,7407511	4,13	597,7390965	7,30	816,0361136	5,74
462,9518620	1,48	599,1151903	1,35	818,5473892	6,07
467,7989274	4,44	610,1391311	1,41	820,5323051	9,42
468,8276406	6,16	613,4258642	7,95	821,5230298	1,75
471,9999044	1,41	618,9044694	4,62	827,5130297	6,05
476,8379497	4,88	624,3437999	3,27	839,5123884	6,85
480,3472420	8,64	626,9311433	7,59	855,5078065	5,93
497,8478370	4,90	627,2650040	0,92	864,0402581	1,66
498,8366670	7,66	629,7262347	1,44	882,5769216	5,73
499,3675067	2,53	634,0638766	1,48	883,5601117	5,93
500,0680992	1,42	635,1685469	1,65	914,6201000	8,67
514,3071216	6,27	645,7362159	1,49	941,4952649	6,25
517,6575147	4,36	648,9458657	7,58	946,5370418	6,02
520,8785124	5,91	652,4563269	5,62	955,2217608	9,81
522,9983704	4,55	652,7624093	5,76	974,5692230	6,47
526,6638726	1,38	655,9964232	8,21	974,6120040	1,54
529,8653878	7,62	663,0803466	1,47	985,6277480	6,16
531,8551257	4,61	666,1334259	1,29	1012,7630416	10,16
536,6793327	1,74	667,3667276	3,30	1013,2635444	10,15
539,3191937	6,59	668,9522900	5,92	1018,5603270	5,75
541,1594921	9,45	669,3832893	2,11	1018,7609446	7,37
542,2345300	6,26	676,0716742	1,28	1026,7368538	7,41
543,3937916	3,37	680,0931771	1,54		

## 10 Publikationen

Bastian Gerst, Jürgen Krücken, Georg von Samson-Himmelstjerna, Janina Demeler; „Die Rolle des Cytochrom P450 Systems bei der Resistenz von Wiederkäuernematoden gegen makrozyklische Laktone“ (Posterpräsentation), DVG-Parasitologie-Tagung 2013, Gießen, Deutschland

Bastian Gerst, Jürgen Krücken, Georg von Samson-Himmelstjerna, Janina Demeler; „The role of the cytochrome P450 system in resistance to macrocyclic lactones in parasitic nematodes of ruminants“ (Posterpräsentation), Paratrop 2014, Zürich, Schweiz

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich die vorliegende Arbeit selbstständig, nach bestem Gewissen und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine anderen Quellen und Hilfsmittel als angegeben verwendet zu haben.

Berlin, den 29.02.2016

---

(Bastian Gerst)

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Janina Demeler, Ph.D für ihre engagierte Betreuung meines Projektes und ihre stets für meine Fragen und Anliegen offene Tür danken. Daneben gebührt mein Dank meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel, der sich fortwährend viel Zeit für meine Belange nahm. Meinem Mentor Herrn PD Dr. Ralph Menzel möchte ich für sein stets offenes Ohr für meine Anliegen rund um CYPs und *C. elegans* sowie all die praktischen Ratschläge zum Umgang mit letzterem danken.

Herrn PD Dr. Jürgen Krücken danke ich für seine nie endende Geduld und Betreuung in allen Fragen rund um Labor und Wissenschaft an sich. Herrn Prof. Georg von Samson-Himmelstjerna danke ich für all die mir entgegengebrachte Unterstützung.

Paradocs. Wir waren Könige. Einer wie die andere. Danke.

Allen Mitarbeitern der Tropenveterinärmedizin danke ich dafür die großartigste Schwesterarbeitsgruppe der Welt zu sein. Und natürlich für all den Kaffee.

An alle Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie ein großes Dankeschön für die Unterstützung und die vergnüglichen Zeiten.

Nach Kanada geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. John Gilleard, Frau Susan Stasiuk, Ph.D und Ingrid, die durch Ihre Unterstützung meinen Aufenthalt in Calgary zu einem bereichernden und denkwürdigen Kapitel meiner Doktorarbeit werden ließen.

Meinen Kooperationspartnern am Bundesinstitut für Risikobewertung, Herrn Dr. Matthias Gehling, Frau Dr. Daniela Wendt und Herrn Volker Happel, möchte ich für all die Unterstützung rund um die Massenspektrometrie, ihre Zeit und ihr Interesse an meinem Projekt danken.

Der Ernst-Reuter-Gesellschaft danke ich für die Überlassung des Forschungsstipendiums, das mich in den Anfangsjahren mein Projekt unterstützte. Der H. Wilhelm Schaumann Stiftung danke ich für das Reisestipendium, das meinen Aufenthalt in Calgary/Kanada möglich machte. Der Karl-Enigk-Stiftung gebührt mein Dank für die Bereitstellung und Verlängerung des Doktorandenstipendiums, das es mir ermöglichte mein Projekt zum Abschluss zu bringen. Der Dahlem Research School danke ich für die mir entgegengebrachte Unterstützung. ChemAxon danke ich für die Überlassung der Academic License für ihr Softwarepaket.

Meinen Eltern, meiner Schwester, meiner Familie, meinen Freunden, danke für Beistand & Unterstützung in den dunklen und etwas weniger dunklen Momenten sowie all den Spaß den wir trotzdem hatten.