

**Identifikation, Charakterisierung und
funktionale Untersuchung
von putativen Emodepsidrezeptoren bei Nematoden**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Nina Fischer

geboren am 23.10. 1975 in Hamburg

2008

Referent: Prof. Dr. med. vet. G. von Samson-Himmelstjerna

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. S. Steinlechner

Tag der Promotion: 23.07.2008

für Bobby

Zusammenfassung

Das Cyclooctadepsipeptid Emodepsid ist seit knapp dreißig Jahren das erste kommerzialisierte Anthelminthikum einer neuen Wirkstoffklasse. Für den freilebenden Nematoden *Caenorhabditis elegans* wurden zwei Proteine identifiziert, die an der Wirkkaskade des Emodepsids beteiligt sind. Dabei handelt es sich um den G-Protein-gekoppelten Rezeptor LAT-1 und den Calcium-gesteuerten Kaliumkanal SLO-1. In der vorliegenden Arbeit wurden die orthologen Gene für LAT-1 und SLO-1 in dem Hakenwurm des Hundes *Ancylostoma caninum* identifiziert. Der LAT-1 Orthologe wurde analog zu weiteren orthologen Sequenzen der Rindernematoden *Cooperia oncophora* und *Ostertagia ostertagi* als Depsiphilin benannt. Für das entsprechende Gen wurde für *A. caninum* die gesamte genomische Sequenz amplifiziert. Sie ist mit 24 kb mehr als doppelt so lang, wie die des *lat-1*-Gens und weist etwa dreimal so viele Introns auf. Die Untersuchung der Transkriptionsrate des Depsiphilins in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum* erbrachte Hinweise auf eine erhöhte Transkription in den Eiern.

Um die Lokalisation des Depsiphilins eines parasitischen Nematoden in *C. elegans* darstellen zu können, wurde eine *C. oncophora* Depsiphilin-Promotor-gesteuerte GFP-Expression in *C. elegans* durchgeführt. Diese führte zur Expression des GFP in Nerven- und Muskelzellen des Pharynx- sowie des Analbereichs. Es erfolgte weiterhin eine *A. caninum* und *C. oncophora slo-1*-Promotor-gesteuerte GFP-Expression in *C. elegans*, die in den gleichen Zellen bzw. Regionen des Pharynx- und Analbereiches zu einer Expression führte. Für SLO-1 wurde die funktionale Expression der kodierenden Sequenzen in emodepsidresistenten *slo-1* knockout-Mutanten (*js379*) von *C. elegans* durchgeführt. Es wurde nach 24 stündiger Emodepsidexposition die Bewegungsaktivität im Vergleich zu den nicht-transfizierten resistenten Würmern, dem Wildtyp Bristol N2 und jeweils unbehandelten Kontrollgruppen ermittelt. Im Gegensatz zu den knockout-Mutanten konnte ein dosisabhängiger Effekt auf die Bewegungsaktivität der transgenen Würmer, die *slo-1* von *A. caninum* und *C. oncophora* exprimierten, nachgewiesen werden. Die Anzahl der einzelnen Bewegungen der transgenen Würmer nahm im Vergleich zu der des resistenten Stammes *js379* signifikant ab. Die Effekte auf die Würmer mit *slo-1*-Expression unter dem *C. elegans slo-1*-Promotor waren sogar zu denen auf den Wildtyp nahezu identisch. Bei der höchsten Emodepsidkonzentration von 10 µM waren die meisten Würmer vollständig paralysiert, was dem Emodepsid-Dosis-Wirkungsbild des Wildtyps entsprach. Somit kann hier von einer kompletten Wiederherstellung des Wildtyps in Bezug auf den inhibitorischen Effekt von Emodepsid auf die Bewegungsaktivität ausgegangen werden. Diese Versuche beweisen die funktionale Expression von *slo-1* von *A. caninum* und *C. oncophora* in *C. elegans* und dessen Beteiligung am Wirkmechanismus des Emodepsids. Darüber hinaus zeigen sie in bisher einzigartiger Weise die Relevanz von *C. elegans* als authentisches funktionales Expressionsmodell für Gene parasitischer Nematoden auf.

Die in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methoden könnten in weiterführenden Experimenten verwendet werden, um weitere mögliche Interaktionspartner des Wirkmechanismus von Emodepsid zu erforschen, diesen detailliert aufzuklären und somit möglicherweise neue Wirkstoffe zu entwickeln.

Summary

Emodepside, a member of the class of cyclooctadepsipeptides, is the first commercialized anthelmintic with a new mode of action in the last thirty years. Two proteins of the free living nematode *Caenorhabditis elegans* were identified as possible targets of emodepside: the G-protein coupled receptor LAT-1 and the calcium-gated potassium channel SLO-1. In the present work orthologs of LAT-1 and SLO-1 were identified in the canine hookworm *Ancylostoma caninum*. The LAT-1 ortholog was named depsiphilin, like other LAT-1 orthologs of the cattle nematodes *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi*. For the depsiphilin the whole genomic sequence was amplified. The sequence has approximately 24 kb, is twice as long as the *lat-1*-gene of *C. elegans* and it contains three times more introns. Transcription studies using quantitative real-time PCR revealed a higher amount of transcripts of depsiphilin in *A. caninum* eggs compared to other developmental stages.

To study the localisation of depsiphilin of a parasitic nematode in *C. elegans*, a *C. oncophora* depsiphilin-promotor controlled GFP-expression experiment was performed. This experiment led to a GFP-expression in nerve and muscle cells in the pharynx and anal region. According to the latter experiment, an *A. caninum* and *C. oncophora slo-1*-promotor controlled GFP-expression was carried out which showed a similar GFP-expression pattern. Functional expression of *slo-1* of *A. caninum* and *C. oncophora* was performed in emodepside-resistant *slo-1*-mutants of *C. elegans*. After an exposition with emodepside for 24 hours, locomotion activity of the transgenic worms in comparison to the non-transfected mutants, the wildtype N2 and untreated control groups was measured. In contrast to the resistant strains, a dose dependent effect of emodepside on the *A. caninum* and *C. oncophora slo-1* expressing, transgenic worms was demonstrated. The frequency of locomotion activity of the transgenic worms was significantly lower than of the emodepside resistant *slo-1*-mutants. The emodepside effects on transgenic worms with *C. elegans slo-1*-promotor controlled *slo-1*-expression were similar to the effects on the wildtype worms, the difference was not significant. At the highest applied emodepside concentration of 10 μ M, most transgenic worms were completely paralysed. This observation was corresponding to the wildtype phenotype. Thus, a total rescue of the wildtype phenotype regarding the inhibitoric effect of emodepside on locomotion was obtained here. These results demonstrate the functional expression of *slo-1* of *A. caninum* and *C. oncophora* in *C. elegans* and its involvement in the mode of action of emodepside. Furthermore these experiments show in an unprecedented way the relevance of *C. elegans* as an authentic functional model for expression of genes of parasitic nematodes.

The results obtained in the present work can constitute the basis to investigate further putative targets for emodepside and to elucidate the mode of action in detail, to potentially allow the development of new anthelmintically active agents.

Inhaltsverzeichnis

A. Abkürzungen	7
1 Einleitung	11
2 Literaturübersicht	13
2.1 Nematoda	13
2.1.1 Hakenwürmer	13
2.1.2 <i>Ancylostoma caninum</i>	14
2.1.3 Trichostrongylidae	16
2.1.3.1 <i>Cooperia oncophora</i>	16
2.2 Bekämpfung	16
2.3 Anthelminthika	17
2.3.1 Anthelminthikaresistenzen	18
2.3.2 Cyclooctadepsipeptide	20
2.3.2.1 PF1022 A	20
2.3.2.2 Emodepsid	21
2.3.2.3 Wirkmechanismus	22
2.4. Zielproteine für Emodepsid	23
2.4.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren	23
2.4.1.1 Hc110-R	24
2.4.1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> LAT-1	25
2.4.1.3 Depsiphiline	26
2.4.1.4 Latrophiline der Säuger	26
2.4.2 Kaliumkanäle	27
2.4.2.1 Ca ⁺ -abhängige K ⁺ -Kanäle vom BK-Typ	27
2.4.2.2 Der Calcium-gesteuerte Kaliumkanal SLO-1 von <i>C. elegans</i>	28
2.5 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus	30
2.5.1 Biologie von <i>C. elegans</i>	30
2.5.2 Das Modell <i>C. elegans</i>	31
2.5.3 RNA interference (RNAi)	32
2.5.4. <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modell für parasitische Nematoden	32
2.5.5 Verhaltensweisen von <i>C. elegans</i> als Untersuchungsparameter	34
2.5.6 Stämme und knockout-Mutanten	35
2.6 Quantitative real-time PCR	35
2.6.1 Absolute Quantifizierung	36
2.6.2 Relative Quantifizierung	36

2.6.3 Housekeeping Gene	37
2.7 Intron-/Exonorganisation bei Nematoden	37
3 Material und Methoden	39
3.1 Puffer und Lösungen	39
3.2 Medien und Nährböden	40
3.3 Reagentien	41
3.4 Enzyme	42
3.5 Reaktionskits	43
3.6 Geräte	43
3.7 Computerprogramme	45
3.8 Einwegartikel	46
3.9 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	47
3.10 Vektoren	48
3.11 <i>Caenorhabditis elegans</i> -Stämme	48
3.12 Haltung und Gewinnung der verwendeten Nematoden	49
3.12.1 <i>Ancylostoma caninum</i>	49
3.12.1.1 Gewinnung und Aufreinigung der Larven	49
3.12.1.2 Gewinnung und Aufreinigung der Eier	50
3.12.1.3 Gewinnung adulter <i>A. caninum</i>	50
3.12.2 Haltung von <i>C. elegans</i>	51
3.13 Nukleinsäureisolierung	51
3.13.1 DNA-Isolierung	51
3.13.2 RNA-Isolierung	52
3.13.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren	52
3.14 cDNA-Synthese	53
3.14.1 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	53
3.15 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)	53
3.15.1 Primer	54
3.15.2 Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	54
3.16 Quantitative real-time PCR	54
3.16.1 RNA-Isolierung für die real-time PCR	55
3.16.2 cDNA-Synthese für die real-time PCR	55
3.16.3 Durchführung der real-time PCR	56
3.17 Genome Walk	57
3.18 Analyse der PCR-Produkte	58
3.19 Isolierung von Banden aus Agarosegelen	58
3.20 Klonierung von PCR-Produkten	58

3.20.1	Ligation	58
3.20.2	Transformation in One Shot [®] TOP10 chemisch kompetente Zellen (Invitrogen)	58
3.20.3	Transformation in JM 109 kompetente Zellen (Stratagene)	59
3.20.4	Transformation in XL10-Gold kompetente Zellen (Stratagene)	59
3.20.5	Bakterienkulturen	59
3.20.6	Antibiotika	59
3.20.7	Glycerolstocks	59
3.21	Plasmidpräparation	60
3.21.1	Miniprep	60
3.21.2	Midiprep	60
3.21.3	Kontrolle und Darstellung des Inserts	60
3.21.4	Sequenzierung und Analyse der Sequenzen	60
3.22	Southern Blot	61
3.23	Heterologe Expression in <i>C. elegans</i>	63
3.23.1	Heterologe Expression von <i>A. caninum</i> und <i>C. oncophora</i> Depsiphilin in <i>C. elegans</i>	63
3.23.2	Heterologe Expression von <i>A. caninum</i> und <i>C. oncophora slo-1</i> in <i>C. elegans</i>	65
3.23.3	GFP-Reporterkonstrukte	71
3.23.4	Verwendete <i>C. elegans</i> Stämme	72
3.23.5	Verwendete Marker zur Selektion transfizierter <i>C. elegans</i>	73
3.23.6	Injektionsnadeln und Plasmide für die Mikroinjektion	74
3.23.7	Mikroinjektion von <i>C. elegans</i>	75
3.23.8	Selektion der transfizierten Nachkommenschaft	76
3.23.9	Kontrolle der funktionalen Expression von <i>slo-1</i>	76
3.23.10	Bestimmung der Bewegungsaktivität <i>slo-1</i> -transfizierter <i>C. elegans</i> nach Emodepsidexposition	77
3.23.11	Durchführung der dosisabhängigen Emodepsidexposition und Bestimmung der Bewegungsaktivität <i>slo-1</i> -transfizierter <i>C. elegans</i>	77
3.23.12	Dokumentation der <i>slo-1</i> - bzw. Depsiphilinpromotor-gesteuerten GFP-Expression	77

4 Ergebnisse	79
5.1 Identifizierung, Charakterisierung, Organisation und Untersuchung zur Transkription und Expression des Depsiphilins von <i>A. caninum</i> und <i>C. oncophora</i>	79
4.1.1 Southern Blot	79
4.1.2 Identifikation der kodierenden Sequenz des <i>A. caninum</i> Depsiphilins	81
4.1.3 Untersuchungen zu Transmembranregionen und Signalpeptiden	82
4.1.4 Phylogenetische Analyse	83
4.1.5 Genomische Organisation des <i>A. caninum</i> Depsiphilin	85
4.1.5.1 Mögliche Spleißingvarianten	88
4.1.6 Mögliche Promotorregion für das Depsiphilin von <i>A. caninum</i>	88
4.1.7 Quantitative Untersuchung zur Transkription von Depsiphilin mittels real-time PCR	89
4.1.7.1 Bestimmung der Amplifikationseffizienzen von Ziel- und Referenzgenen	89
4.1.7.2 Relative Transkriptmengen des Depsiphilins von <i>A. caninum</i> in verschiedenen Entwicklungsstadien	90
4.1.7.3 Analyse der relativen Kopienzahlen des Depsiphilins und der Referenzgene der verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>A. caninum</i>	92
4.1.8 Heterologe Expression von Depsiphilin in <i>C. elegans</i>	94
4.1.8.1 Untersuchungen zur Funktionalität des Depsiphilins von <i>A. caninum</i> und <i>C. oncophora</i> mittels heterologer Expression in <i>C. elegans</i>	94
4.1.8.2 <i>Cooperia oncophora</i> Depsiphilinpromotor-gesteuerte GFP-Expression in <i>C. elegans</i>	94
4.2 Der Calcium-gesteuerte Kaliumkanal SLO-1 (<i>slo-1</i>) von <i>A. caninum</i>	104
4.2.1 Konservierte Domänen	104
4.2.2 Untersuchungen zu Transmembranregionen und Signalpeptiden	105
4.2.3 Phylogenetische Analyse	105
4.2.4 Promotorregion von <i>slo-1</i> von <i>A. caninum</i>	107
4.3 Heterologe Expression von SLO-1 in <i>C. elegans</i>	108
4.3.1 <i>Caenorhabditis elegans slo-1</i> -Promotorregion	108
4.3.2 Expression von <i>slo-1</i> von <i>C. oncophora</i> in <i>C. elegans slo-1</i> -knockout-Mutanten unter dem <i>snb-1</i> -Promotor, Bewegungsassay nach Exposition mit 10 µM Emodepsid	108
4.3.3 Expression des <i>slo-1</i> von <i>A. caninum</i> und <i>C. oncophora</i> in <i>C. elegans slo-1</i> -knockout-Mutanten unter dem <i>snb-1</i> -Promotor, Bewegungsassay nach Exposition mit 1nM-10µM Emodepsid	109

4.3.4 Expression von <i>slo-1</i> von <i>A. caninum</i> und <i>C. oncophora</i> unter dem putativen 3 kb <i>C. elegans slo-1</i> -Promotor, dosisabhängiger Effekt	112
4.3.5 <i>slo-1</i> -Promotor gesteuerte GFP-Expression in <i>C. elegans</i>	115
4.3.5.1 <i>C. elegans slo-1</i> -Promotor gesteuerte GFP-Expression in <i>C. elegans</i>	115
4.3.5.2 <i>A. caninum slo-1</i> -Promotor gesteuerte GFP-Expression in <i>C. elegans</i>	120
4.3.5.3 <i>C. oncophora slo-1</i> -Promotor-gesteuerte GFP-Expression in <i>C. elegans</i>	124
5 Diskussion	131
5.1 Identifizierung, Charakterisierung, Organisation und Untersuchung zur Transkription und Expression des Depsiphilins von <i>A. caninum</i> und <i>C. oncophora</i>	132
5.1.1 Identifikation und Charakterisierung des Depsiphilins von <i>A. caninum</i>	132
5.1.1.1 Analyse der kodierenden Sequenz des Depsiphilins von <i>A. caninum</i>	132
5.1.1.2 Genomische Organisation des Depsiphilins von <i>A. caninum</i>	133
5.1.2 Quantitative Untersuchung der Transkription von Depsiphilin mittels real-time PCR	136
5.1.2.1 Analyse der relativen Kopienzahlen des Depsiphilins, 18S rRNA und 60S arp der verschiedenen Entwicklungsstadien	137
5.1.1.2 Quantifizierung über die Bestimmung der relativen Kopienzahlen	138
5.1.2.2 Quantifizierung mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode	139
5.1.3 Depsiphilinpromotor-gesteuerte GFP-Expression in <i>C. elegans</i>	140
5.1.4 Heterologe Expression des Depsiphilins von <i>A. caninum</i> und <i>C. oncophora</i> in <i>C. elegans lat-1lat-2</i> -knockout-Mutanten	142
5.2 Der Calcium-gesteuerte Kaliumkanal SLO-1	143
5.2.1 <i>slo-1</i> -Promotor-gesteuerte GFP-Expression in <i>C. elegans</i>	144
5.2.1.1 <i>Ancylsotoma caninum</i> und <i>C. oncophora slo-1</i> -Promotorgesteuerte GFP-Expression	145
5.2.2 Funktionale Expression von <i>slo-1</i> von <i>C. elegans</i> , <i>A. caninum</i> und <i>C. oncophora</i> in <i>C. elegans slo-1</i> -knockout-Mutanten (<i>js 379</i>)	148
5.3 Zusammenfassende Bewertung und Ausblick	153
6 Literaturverzeichnis	155
7 Anhang	173
8 Curriculum vitae	209
9 Publikationsliste	211
10 Erklärung	213
Danksagung	215

A. Abkürzungen

α -LTX	α -Latrotoxin
Abb.	Abbildung
Acc. no.	Zugangsnummer für eine Gen-/Proteinsequenz (engl.: Accession number) der NCBI Genbank
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: One way A nalysis o f V ariance)
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser (lat.: Aqua bidestillata)
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyolphosphat
BLAST	basic local alignment search tool
blastn	BLAST (Nukleotidsequenz gegen Nukleotiddatenbank)
blastx	BLAST übersetzte Nukleotidsequenz gegen Proteindatenbank)
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
<i>C. oncophora</i>	<i>Cooperia oncophora</i>
CDART	Conserved Domain Architecture Retrieval Tool
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complementary DNA)
C _T	threshold cycle, Schwellenwert
CV	Variationskoeffizient (engl.: coefficient of variation))
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed sequence tag
FAM	Carboxyfluoreszin
g	Gravitationskonstante
GFP	Aequorea victoria grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
Hc110-R	Latrophilin ähnlicher Rezeptor in <i>H. contortus</i>

Abkürzungen

HormR	Domäne in Hormonrezeptoren
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)
l	Liter
L1/L2	erste/ zweite Larven
L3	dritte Larven
L4	vierte Larven
<i>lat-1</i>	Bezeichnung des Gens für latrophilin-like protein 1
LAT-1	Bezeichnung des Proteins Latrophilin-like protein 1
<i>lat-2</i>	Bezeichnung des Gens für latrophilin-like protein 2
LAT-2	Bezeichnung des Proteins Latrophilin-like protein 2 (Protein)
LB	Luria Bertani
LPH	Latrophilin
M	Molar (Mol/Liter)
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger RNA)
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl.: open reading frame)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNAi	RNA Interferenz
rRNA	ribosomale RNA
18 S rRNA	18S ribosomale RNA

60 S arp	60 S acidic ribosomal protein
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
s	Sekunde
<i>slo-1</i>	Bezeichnung des Gens für den SLOWpoke calcium-gated potassium channel 1
SLO-1	Bezeichnung für das Protein SLOWpoke calcium gated potassium channel 1
SMART	switching mechanism at 5' end of RNA transcript
SMART	simple modular architecture research tool
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
U	Aktivitätseinheit (engl.: activity units, bei Enzymen)
UTR	nicht translatierter Bereich (engl.: untranslated region)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: weight per volume)

Die Schreibweise für Gene und Proteine von *C. elegans* folgt folgendem Schema:
Namen für Gene bestehen aus drei klein und kursiv geschriebenen Buchstaben und einer Zahl, z.B. *slo-1* für das Gen des SLOWpoke calcium-gated potassium channel 1
Namen für Proteine bestehen aus drei groß geschriebenen Buchstaben und einer Zahl, z.B. SLO-1.

1 Einleitung

Die Entwicklung geeigneter Bekämpfungsmaßnahmen von Infektionskrankheiten ist eines der größten Felder der medizinischen und naturwissenschaftlichen Forschung. In diesem Zusammenhang spielen neben Erkrankungen, die durch Bakterien und Viren ausgelöst werden, auch Infektionen mit Parasiten, wie z.B. parasitischen Fadenwürmern (Nematoda), eine große Rolle. Gastrointestinale Nematoden sind beim Menschen weltweit verbreitet. So sind z.B. etwa 1 Milliarde Menschen mit dem Spulwurm *Ascaris lumbricoides* infiziert, Infektionen mit Hakenwürmern betreffen ca. 650 Millionen Menschen (Hotez et al., 2006). Diese Infektionen können zu schwerwiegenden Krankheitsbildern führen. Auch in der Nutz- und Hobbytierhaltung treten Infektionen mit Fadenwürmern auf, die neben gesundheitlichen auch schwere wirtschaftliche Schäden verursachen können (Jasmer et al., 2003). Besonders in der massenhaften Haltung von Schafen und Rindern treten diese Probleme auf. Dort, wo Bekämpfung mit Anthelminthika flächendeckend stattfindet, haben sich gegen eine Reihe von Substanzen bereits Resistenzen gebildet, insbesondere durch die häufige Verwendung der immer gleichen Wirkstoffe und zum Teil nicht vorschriftsmäßige Anwendung (Kaplan, 2004). Auch in der Haltung von Hunden und Katzen ist eine regelmäßige Entwurmung zum Erhalt der Gesundheit der Tiere erforderlich. Einige Nematodenarten, wie z. B. Haken- und Spulwürmer, können auch den Menschen infizieren. Daher ist zur Vermeidung dieses Zoonose-Risikos ebenfalls der Einsatz von Anthelminthika wichtig (Prociv und Croese, 1996).

Es gibt derzeit sechs verschiedene Anthelminthika-Klassen, von denen vier Klassen mit entsprechenden Produkten auf dem Markt erhältlich sind. Eine dieser Klassen ist zur Zeit im Nutztierbereich noch nicht zugelassen, gegen die drei weiteren Klassen haben sich bei verschiedenen Parasitenarten in einigen Regionen der Erde bereits Resistenzen gebildet (Kaplan, 2004). Dies und die Erforderlichkeit neuer, immer besser verträglicher und breit wirksamer Wirkstoffe, verlangt die Erforschung neuer anthelminthischer Substanzen. Nachdem fast dreißig Jahre lang keine neuen Wirkstoffklassen den Markt erreicht haben, wurde 2005 das Spot-on Kombinationspräparat Profender® für Katzen zugelassen. Es beinhaltet das Bandwurmpräparat Praziquantel, sowie die neue nematozide Substanz Emodepsid. Bei Emodepsid handelt es sich um einen Vertreter der Cyclooctadepsipeptide. Es ist ein halb-synthetisches Derivat der Substanz PF1022A, welches in den 1990er

Jahren in Japan als Fermentationsprodukt eines sterilen Pilzgeflechtes entdeckt wurde (Harder und Samson-Himmelstjerna, 2002). Emodepsid besitzt ein breites Wirkspektrum, welches zahlreiche Nematoden verschiedenster Wirtsspezies beinhaltet (Samson-Himmelstjerna et al., 2000). Der Wirkmechanismus ist bisher noch nicht genau bekannt. Es wurde bisher für einige Nematodenarten nachgewiesen, dass die Exposition mit Emodepsid zu einer schlaffen Paralyse der Muskeln in Körperwand und Pharynx führt (Willson et al., 2004; Willson et al., 2003a). Aufgrund der Ergebnisse mehrerer Studien wird vermutet, dass Emodepsid im Bereich der neuromuskulären Synapse die Freisetzung inhibitorischer Neurotransmitter oder -modulatoren bewirkt. Hier ist bei dem freilebenden Nematoden *Caenorhabditis elegans* kürzlich die Beteiligung des Calcium-gesteuerten Kaliumkanals SLO-1 (Ac. No.: NM_001029089) nachgewiesen worden (Guest et al., 2007). Bereits 2001 wurde in dem Schafnematoden *Haemonchus contortus* der G-Protein-gekoppelte Rezeptor HC110-R als Bindungspartner des Emodepsids identifiziert (Saeger et al., 2001; Saeger, 2000). Für den entsprechenden orthologen Rezeptor bei *C. elegans*, den Latrophilin-ähnlichen Rezeptor LAT-1 (Ac. No.: AAQ84877), wurde ebenfalls eine Beteiligung an der Emodepsid-Wirkkaskade nachgewiesen (Willson et al., 2004). In zwei Nematodenarten des Rindes, *Cooperia oncophora* und *Ostertagia ostertagi* wurden bereits die zu LAT-1 orthologen Gene identifiziert und als Depsiphilin (Ac. No.: DQ356247 bzw. DQ356249) benannt (Welz et al., 2005). Die detaillierte Aufklärung des spezifischen Wirkmechanismus bietet die Möglichkeit, die Wirksamkeit neuer Substanzen besser prüfen und dadurch zur Entwicklung verbesserter Bekämpfungsoptionen beitragen zu können. Zudem ermöglicht die Identifizierung weiterer Interaktionspartner gegebenenfalls die Entwicklung neuer Wirkstoffe.

Ziel dieser Arbeit war es, die orthologen Gene zu den Emodepsid -Zielproteinen LAT-1 und SLO-1 in dem Hakenwurm des Hundes *Ancylostoma caninum* zu identifizieren. Außerdem sollte ihre Funktionalität in Bezug auf die Wirkung von Emodepsid überprüft werden und die Lokalisation im Wurm analysiert werden. Diese Versuche sollten analog auch für Depsiphilin und SLO-1 von *C. oncophora* (Ac. No.: AJ272270) durchgeführt werden. Diese beiden Nematodenarten wurden ausgewählt, da somit sowohl Erreger von Nutz- als auch Hobbytieren berücksichtigt werden konnten. Für den Nachweis der Funktionalität sowie die Lokalisierung sollte *C. elegans* als Modellorganismus verwendet werden.

2 Literaturübersicht

2.1. Nematoda

Fadenwürmer (Nematoda) bilden einen der artenreichsten Stämme des Tierreichs. Bisher wurden etwa 20.000 Arten beschrieben. Nematoden sind drehrund und langgestreckt, ihre Körperhöhle ist pseudocoelomatisch. Die Stabilität des Körpers wird durch das Hydroskelett und den Hautmuskelschlauch erreicht. Ihre Fortbewegung ist schlängelnd, wobei der Körper nach dorsal und ventral gebogen wird, wobei die ventrale Seite durch die Lage der Analöffnung charakterisiert ist. Auf einer Unterlage bewegen sich Fadenwürmer auf der Seite liegend fort, was den Eindruck eines Schlängelns nach rechts und links vermittelt. In mehreren Klassen und Ordnungen haben sich konvergent zoo- und phytoparasitische Lebensweisen entwickelt. Nematoden sind meist in feuchten Lebensräumen zu finden, wie z.B. im Boden, in Pflanzengeweben und Geweben von Tieren. Viele frei lebende Arten spielen als Verwerter organischen Materials eine wichtige Rolle im Stoffkreislauf der Natur. Unter den parasitischen Arten befinden sich unter anderem viele Agrarschädlinge, die z.B. Wurzeln von Pflanzen befallen. Zahlreiche parasitische Arten infizieren Tiere und auch den Menschen, was weltweit nicht nur große gesundheitliche, sondern auch wirtschaftliche Schäden hervorruft (Westheide, 1996).

2.1.1 Hakenwürmer

Hakenwürmer gehören zur Klasse der Chromadorea, Unterklasse Rhabditia, Ordnung Rhabditida und hier in die Familie der Ancylostomatidae. Es gibt zwei Unterfamilien mit insgesamt elf Gattungen, die alle parasitisch leben. Ihre Verbreitung ist stark klimaabhängig. Zwei Arten befallen den Menschen, *Ancylostoma duodenale* und *Necator americanus*, sie sind in subtropischen bzw. tropischen Regionen zu finden. Eine weitere humanpathogene Hakenwurmart ist *A. caninum*, der Erreger der Ancylostomatidose beim Hund, der als Zoonoseerreger beim Menschen verschiedene Symptome verursacht (s. 2.1.2). Weltweit sind etwa 650 Millionen Menschen mit Hakenwürmern infiziert (Hotez et al., 2006). In Deutschland sind Menschen wegen ihrer Reisetätigkeit und dem engen Kontakt zu Haustieren durch Nematodeninfektionen gefährdet.

2.1.2 *Ancylostoma caninum*

Ancylostoma caninum, der Hakenwurm des Hundes, gehört in die Unterfamilie der Ancylostomatinae. Die Männchen werden 5-14 mm lang, weibliche Würmer 15-21 mm. Sie besitzen ein dorsal gebogenes Vorderende mit einer großen Mundkapsel in der ebenfalls nach dorsal gerichteten Mundöffnung. Am ventralen Rand der Mundkapsel befinden sich ein Paar Schneidplatten mit jeweils drei zahnartigen Vorsprüngen. Die Männchen besitzen eine gut ausgeprägt Bursa copulatrix. *A. caninum* ist hauptsächlich in den Tropen und Subtropen verbreitet, ist aber auch in gemäßigteren Zonen zu finden. Die Entwicklung ist monoxen und beginnt mit der Ausscheidung von Eiern mit dem Kot. Bei 15-37°C (Optimum 25-30°C) entwickelt sich die Larve I, die aus dem Ei schlüpft und sich zur zweiten Larve weiterentwickelt. Während der Entwicklung zur infektiösen dritten Larve, wird die Kutikula der Larve II nicht abgestreift, sondern bleibt als Scheide erhalten. Die L3 Larve kann auf unterschiedliche Weise in den Wirt gelangen, streift dort ihre Scheide ab und durchläuft verschiedene Wanderwege. In Tabelle 1 sind die Hauptinfektionswege aufgeführt. Mit der Ansiedlung präadulter und adulter Stadien im Dünndarm ist die Entwicklung abgeschlossen. Die Art ist zweigeschlechtlich und es erfolgt eine innere Befruchtung, die Eier werden mit dem Kot ausgeschieden. Die Präpatenz beträgt bei Welpen 14-17 Tage, bei älteren Hunden bis 26 Tage, sie ist aber auch abhängig vom Infektionsweg. Die adulten Würmer parasitieren im Dünndarm von Hund, Fuchs, Wolf, Kojote und anderen Kaniden. Sie saugen sich an der Darmschleimhaut des Wirtes fest und ernähren sich von Schleimhaut und Blut. Der Blutverlust, der durch einen einzelnen adulten *A. caninum* und dessen Wechsel der Anheftungsstelle hervorgerufen wird, wird auf 80-200 µl pro Tag geschätzt. Das Krankheitsbild äußert sich je nach Befallsstärke und Alter des Hundes durch Durchfall, Abmagerung, rasche Ermüdbarkeit, Exsikkose und Anämie. Durch die Wanderung der Larven treten Schädigungen der Haut, Lunge und des Darmes auf. In wärmeren Regionen tritt außerdem das feuchte Sommerexzema auf, das durch die in die Haut eindringenden Larven verursacht wird. Immunkompetente Hunde können nach mehrmaliger Infektion eine Immunität ausbilden, die den Befall reduziert und vor den Symptomen schützt.

Die Kälteresistenz der Larven ist gering, also ist ihre Verbreitung stark von den klimatischen Gegebenheiten abhängig. Die Larven müssen in der Außenwelt ständig von einem Flüssigkeitsfilm umgeben sein. In Deutschland wurde in Studien eine

Prävalenz bzw. eine Befallsrate von Hunden mit Hakenwurmeiern von 2,8 % ermittelt, in Füchsen betrug diese in Deutschland und der Schweiz bis zu 10 % (Deplazes, 2006).

Ancylostoma caninum ist ein Zoonoseerreger. Er kann den Menschen als Fehlwirt infizieren, seine Entwicklung dann aber nicht abschließen. Die wandernde Larve kann eine Hauterkrankung hervorrufen, die sich durch Juckreiz und entzündlich veränderte Hautregionen bemerkbar macht (Deplazes, 2006). Ebenfalls wurde eine eosinophile Enteritis beschrieben, die durch im Dünndarm angesiedelten Adulten hervorgerufen wird (Prociv und Croese, 1996).

Infektionsweg und infektiöses Stadium	Interne Wanderung	
perkutan Larve III (frei lebend)	→ trachealer Weg: Blut→Lunge→Trachea→Magen	→ Ansiedlung im Dünndarm
	→ somatischer Weg (mit oder ohne Hypobiose)	→ transmammäre Infektion der Welpen
	→ Drüsenlumina und Krypten im Magen und Dünndarm	→ Ansiedlung im Dünndarm
per os Larve III (frei lebend)	→ Eindringen in Mukosa des oberen Verdauungstraktes, dann trachealer Wanderweg	→ Ansiedlung im Dünndarm
	→ somatischer Weg (mit oder ohne Hypobiose)	→ transmammäre Infektion der Welpen
per os Larve III (mit Muttermilch oder paratenischem Wirt)	→ wahrscheinlich Entwicklung in Drüsen/Krypten im Magen/Dünndarm, wenige evtl. auch tracheale Wanderung	→ Ansiedlung im Dünndarm

Tab. 1: Hauptwege der Infektionen und der internen Wanderung von *A. caninum*, nach Deplazes, 2006.

2.1.3 Trichostrongylidae

Die Familie der Trichostrongylidae wird der Klasse der Chromadorea und der Ordnung Rhabditida zugeordnet. Sie sind Parasiten des Magen-Darmtraktes und können in der Nutztierhaltung erhebliche wirtschaftliche Schäden verursachen.

2.1.3.1 Cooperia oncophora

Cooperia oncophora gehört zur Unterfamilie der Trichostrongylinae und parasitiert hauptsächlich im Dünndarm des Rindes, kann aber auch andere Wiederkäuer befallen, wie z.B. Schaf und Ziege. Die adulten Würmer sind rötlich und oft eingerollt, sie besitzen ein kugelförmig verdicktes Vorderende. Die Männchen sind 5-8 mm, die Weibchen 6-11 mm lang. Die Männchen besitzen eine Bursa mit einer großen, kranial gebogenen posteroventralen Rippe und leicht geschwungenen Spikula. Der Lebenszyklus von *C. oncophora* ist monoxen. Die mit dem Kot ausgeschiedenen Eier entwickeln sich im Freien innerhalb 7-21 Tagen zur infektiösen Larve III, die bescheidet ist. Die dritten Larven können mehrere Wochen bis Monate bis zur nächsten Infektion überdauern. Wenn sie vom Wirt aufgenommen werden, werfen sie ihre Scheide ab und schließen im Dünndarm die Entwicklung zum adulten Wurm ab. Die Präpatenz beträgt 17–22 Tage. Infektionen mit *C. oncophora* treten meist als Mischinfektion mit anderen Trichostrongylidenarten auf, z.B. aus der Gattung *Ostertagia*. Dies hat zur Folge, dass sich die Infektionen wechselseitig verstärken. Die Cooperiose äußert sich in geringerer Gewichtszunahme des befallenen Tieres, vermindertem Appetit und Durchfall. Die Ostertagiose zeigt ein ähnliches klinisches Bild, das durch eine Begleitinfektion mit *C. oncophora* entsprechend verstärkt werden kann (Schnieder, 2006).

2.2 Bekämpfung

Zur Bekämpfung von Nematodenbefall stehen zahlreiche Anthelminthika aus verschiedenen Wirkstoffklassen zur Verfügung. Neben diesen helfen aber auch Präventivmaßnahmen, eine Infektion zu verhindern. So lässt sich z.B. in der Nutztierhaltung durch ein sorgfältiges Weidemanagement der Infektionsdruck eingrenzen. Des Weiteren sind umfangreiche Hygienemaßnahmen notwendig, um Reinfektionen zu verhindern (Ungemach, 1999). Es wurden einige Versuche unternommen, Vakzinen gegen Nematoden zu entwickeln. Derzeit kommt lediglich

eine Vakzine gegen den Rinderlungenwurm *Dictyocaulus viviparus* zum Einsatz, die aus attenuierten dritten Larven besteht (Stear et al., 2007).

2.3 Anthelminthika

Erst seit den sechziger Jahren gibt es anthelminthisch wirksame Substanzen, die eine gute Wirksamkeit und ein breites Wirkspektrum aufweisen. Derzeit können sechs große Klassen von Anthelminthika unterschieden werden. Ein Vertreter der Benzimidazole, das Thiabendazol, wurde 1963 auf dem Markt eingeführt. Die Klasse beinhaltet mittlerweile zahlreiche weitere Produkte, ihnen allen liegt aber der gleiche Wirkmechanismus zu Grunde. Sie hemmen die Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli und greifen somit in die Ausbildung des Zytoskeletts, die Spindelbildung bei der Mitose und den intrazellulären Stofftransport des Wurms ein. Benzimidazole wirken gegen eine große Anzahl von Nematodenarten, einige Vertreter auch gegen Trematoden und Cestoden.

Die Agonisten des nikotinergeren Acetylcholinrezeptors bilden eine weitere Gruppe. Sie binden an Acetylcholinrezeptoren, was zu einer Depolarisation der Zellmembran und zur spastischen Paralyse des Wurms führt. Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind das Imidazothiazol Levamisol und die Tetrahydropyrimidine Pyrantel und Morantel. Das Wirkspektrum umfasst zahlreiche Nematodenarten, nicht aber die Cestoden und Trematoden.

Makrozyklische Laktone werden in die Untergruppen Milbemycine und Avermectine unterteilt. Sie sind Fermentationsprodukte des Pilzes *Streptomyces avermitilis*. Die herausragende Eigenschaft dieser Klasse ist, dass sie sowohl eine Wirkung gegen Nematoden als auch gegen Arthropoden aufweist. Die Wirkung beruht auf einer Erhöhung des Ioneneinstroms über Glutamat- und GABA—gesteuerte Chloridkanäle an inhibitorischen Neuronen, was eine paralyisierende Wirkung auf die Bewegungsfähigkeit und Pharynxaktivität hat (Ungemach, 1999).

Eine weitere Gruppe ist die Paraherquamid/Marcfortin-Familie. Deren Grundsubstanz wurde ursprünglich aus dem Pilz *Penicillium paraherquii* isoliert und hat seitdem einige Derivate hervorgebracht. Bislang ist noch kein Produkt aus dieser Klasse auf dem Markt. Erste Studien haben eine gute Wirksamkeit gegen einige gastrointestinale Nematoden des Schafes und des Rindes gezeigt, aber das Spektrum umfasst bisher noch nicht alle wichtigen Arten. Gegen Nematoden des Hundes war die Effizienz bislang nicht zufrieden stellend, außerdem verursachten die

Substanzen deutliche Nebenwirkungen. Paraherquamide sind nicotinerge cholinerge Antagonisten und führen zu einer schlaffen Paralyse des Wurms (Shoop et al., 1990; Shoop et al., 1991; Shoop et al., 1992; Zinser et al., 2002).

Die fünfte, ganz neue Klasse von Anthelminthika sind die Cyclooctadepsipeptide, die ebenfalls aus dem Fermentationsprodukt eines Pilzes gewonnen werden. Diese Klasse wird in Abschnitt 2.3.2 eingehend beschrieben.

Erst kürzlich wurde eine neue Substanz vorgestellt, die keiner der bisher bekannten Klassen zuzuordnen ist. Sie wird als Klasse der Amino-Acetonitril Derivate (AAD) bezeichnet und ein Derivat, das AAD 1470, zeigt in ersten Versuchen gute Wirksamkeit gegen gastrointestinale Nematoden (Kaminsky, 2007; Kaminsky et al., 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass AAD1470 gegen Würmer, die gegen Levamisol, Benzimidazol und Makrozyklische Laktone resistent sind, wirksam ist. Außerdem wurde auch ein multiresistenter Stamm des Schafnematoden *Haemonchus contortus* erfolgreich mit AAD 1470 bekämpft. Der Wirkmechanismus führt, laut Untersuchungen an AAD-resistenten *Caenorhabditis elegans*-Mutanten, über einen nematodenspezifischen nikotinergen Acetylcholinrezeptor der Unterfamilie DEG-3 (Kaminsky et al., 2008).

2.3.1 Anthelminthikaresistenzen

Resistenzen gegen Anthelminthika wurden bereits kurz nach Einführung von Thiabendazol verzeichnet (Conway , 1964). Eine Population wird als resistent bezeichnet, wenn nach der Behandlung mit Anthelminthika die Frequenz der Individuen, die überleben, größer ist als in einer normalen Population und diese Überlebensfähigkeit erblich ist (Prichard et al., 1980). Die **World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP)** hat Richtlinien festgelegt, nach denen Resistenzen untersucht und bewertet werden können. Liegt zum Beispiel im Eizahlreduktionstest die Reduktion der Eier unter 95 % und ist gleichzeitig der untere Wert des Konfidenzintervalls geringer als 90 % so spricht man von einer resistenten Population (Coles et al., 1992). Die Mechanismen der Resistenzentwicklung sind nur zum Teil bekannt. Resistenzen gegen Benzimidazole werden u.a. durch eine genetische Veränderung des β -Tubulins hervorgerufen, die einen Aminosäureaustausch zur Folge hat (Kwa, 1994; Elard und Humbert, 1999). Genetische und damit auch strukturelle Veränderungen im Glutamatkanal von *C. oncophora* gehen mit einer verminderten Wirkung von makrozyklischen Laktonen

einher (Njue et al., 2004). Zahlreiche Studien belegen, dass die Gruppe der P-Glycoproteine (Pgp) bei der Entwicklung unspezifischer Resistenzen eine bedeutende Rolle spielen (Kerboeuf et al., 2002; Kerboeuf et al., 2003; Xu et al., 1998; Ardelli und Prichard, 2004; Blackhall et al., 1998). Bei einer hochregulierten Expression von Pgp werden chemische Substanzen vermehrt aus der Zelle gepumpt.

Mittlerweile sind Resistenzen gegen alle der drei älteren Anthelminthika-Klassen bekannt. Diese betreffen hauptsächlich gastrointestinale Nematoden von Wiederkäuern, hier in der Regel Schafe, und Pferden (Kaplan, 2004). Es werden auch multiple Resistenzen einer Art gegen mehrere Anthelminthikaklassen verzeichnet. Diese Stämme werden dann als multiple drug resistant (MDR) bezeichnet. Die Verbreitung von Anthelminthikaresistenzen stellt besonders in der Schafhaltung ein großes Problem dar. In verschiedenen Ländern Süd-Afrikas und Süd-Amerikas, sowie im Südosten der Vereinigten Staaten führt dies zu großen wirtschaftlichen Schäden und die Schafzucht kommt zum Teil zum Erliegen (Kaplan, 2004; van Wyk und Malan, 1988). Dabei ist der Hauptverursacher der Verluste häufig der Rote Magenwurm, *Haemonchus contortus*, der besonders oft Resistenzen gegen mehrere Anthelminthikaklassen aufweist (Nari et al., 1996; Echevarria et al., 1996; Eddi et al., 1996; 1999; van Wyk und Malan, 1988). In Süd-Afrika wurden in mehreren Studien auf allen untersuchten Schaffarmen Resistenzen von *H. contortus* gegen makrozyklische Laktone und Benzimidazole festgestellt (Vattaa und Lindberg, 2006). Auch bei Schaffarmen in Großbritannien wurden Nematoden mit MDR nachgewiesen (Cheng et al., 2003; 2007; 2005; Sargison et al., 2001; Bartley et al., 2004).

Die Resistenzproblematik ist bei den gastrointestinalen Nematoden des Rindes bisher noch nicht so ausgeprägt. Aber auch hier wurden für *C. oncophora* in Brasilien (Soutello et al., 2007) und Argentinien (Anziani et al., 2004; Suarez und Cristel, 2007; Mejia et al., 2003). Resistenzen gegen makrozyklische Laktone nachgewiesen und es wird befürchtet, dass diese sich ausweiten werden. Auch für Neuseeland gibt es zahlreiche Berichte über Resistenzen (Loveridge et al., 2003; Mason und McKay, 2006; Jackson et al., 2006). In einer Studie waren auf 92 % von 62 untersuchten Farmen Nematoden zu finden, die Resistenzen gegen Ivermectin, Levamisol oder Albendazol aufwiesen (Waghorn et al., 2006). Für Europa sind die Resistenzprobleme weitaus geringer bzw. es sind bisher wenige Berichte dazu

vorhanden. Trotzdem gibt der Fund eines ivermectinresistenten *C. oncophora* Stammes in Großbritannien Anlass zur Sorge. Dieser Stamm weist ein höheres pathogenes Potential auf als Ivermectin empfindliche Stämme (Njue et al., 2004; Coles et al., 2001). Auch wurden bereits in Italien Hinweise auf Resistenzbildung bei gastrointestinalen Nematoden von Schafen verzeichnet (Traversa et al., 2007). Zudem gibt es einige Berichte über verminderte Wirksamkeit von makrozyklischen Laktonen gegen den Pferdespulwurm *Parascaris equorum* (Stoneham und Coles, 2006; Lindgren et al., 2008; Schougaard und Nielsen, 2007; Samson-Himmelstjerna et al., 2007; Boersema et al., 2002). In Europa wird derzeit ein Projekt durchgeführt, das dazu dient, neue Erkenntnisse und Lösungen zur Nematodenbekämpfung in Wiederkäuern zu erarbeiten. Am PARASOL (**Parasitic Solutions**)-Projekt nehmen 10 Länder teil, die in verschiedenen Arbeitspaketen unter anderem auch Entwicklung und Mechanismen von Resistenzen untersuchen. Das Projekt wird von Februar 2006 bis Januar 2009 durchgeführt (<http://www.parasol-project.org>).

2.3.2 Cyclooctadepsipeptide

Auf die Anthelminthikaklasse der Cyclooctadepsipeptide soll hier genauer eingegangen werden, da sich die Arbeit mit möglichen Rezeptoren für einen Vertreter dieser Gruppe beschäftigt.

2.3.2.1 PF1022 A

Im Jahre 1990 wurde in Japan von der Firma Meiji Seika Kaisha, Ltd. ein Patent auf eine neue anthelminthisch wirksame Substanz angemeldet, die der Klasse der Cyclooctadepsipeptide zugeordnet wurde (EP 0 382 173 A2). Das PF1022A ist ein Fermentationsprodukt des Pilzes *Mycelia sterilia* PF1022, aus der Klasse der Agonomycetales, der Teil der Mikroflora der Japanischen Kamelie (*Camellia japonica*) ist. Es weist Ähnlichkeiten zu anderen biologisch wirksamen Verbindungen auf, wie zum Beispiel dem Cyclohexadepsipeptid Enniatin, welches eine antibiotische, insektizide und nematozide Wirkung hat und dem Bassianolid, das eine insektizide Wirkung hat. Diese Verbindungen werden ebenfalls aus Pilzen gewonnen. PF1022A ist symmetrisch und besteht aus zwei Monomeren, die wiederum aus je zwei Molekülen N-Methyl-L-Leucin, einem Molekül B-Phenyl-D-Milchsäure und einem Molekül D-Milchsäure gebildet werden und alternierend angeordnet sind (Kobayashi, 1994)(vgl. auch Abbildung 1). Die anthelminthische

Aktivität von PF1022A wurde zuerst für *Ascaridia galli* in Hühnern nachgewiesen (Tagaki et al., 1991). Es folgten Studien, die auch die Wirksamkeit gegen andere gastrointestinalen Nematoden zeigten, wie z.B. *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *H. contortus*, *Trichstrongylus colubriformis* and *Ostertagia ostertagi* (Samson-Himmelstjerna et al., 2000; Conder et al., 1995). Mittlerweile wurden zahlreiche weitere Arten auf ihre Empfindlichkeit gegenüber PF1022A untersucht und diese bestätigt (Samson-Himmelstjerna et al., 2005). Außerdem zeigt PF1022A eine volle Wirksamkeit gegen Febantel- und ivermectinresistente *H. contortus*-Stämme des Schafes (Samson-Himmelstjerna et al., 2005).

2.3.2.2 Emodepsid

Emodepsid ist ein Bis-Para-Morphonyl-Derivat von PF1022A, dessen Löslichkeit gegenüber dem PF1022A verbessert ist (Sasaki et al., 1992). Seine Synthese wurde 1997 von der Firma Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd. patentiert (WO 97/02256). Die chemische Struktur ist in Abbildung 1 im Vergleich zu PF1022A dargestellt.

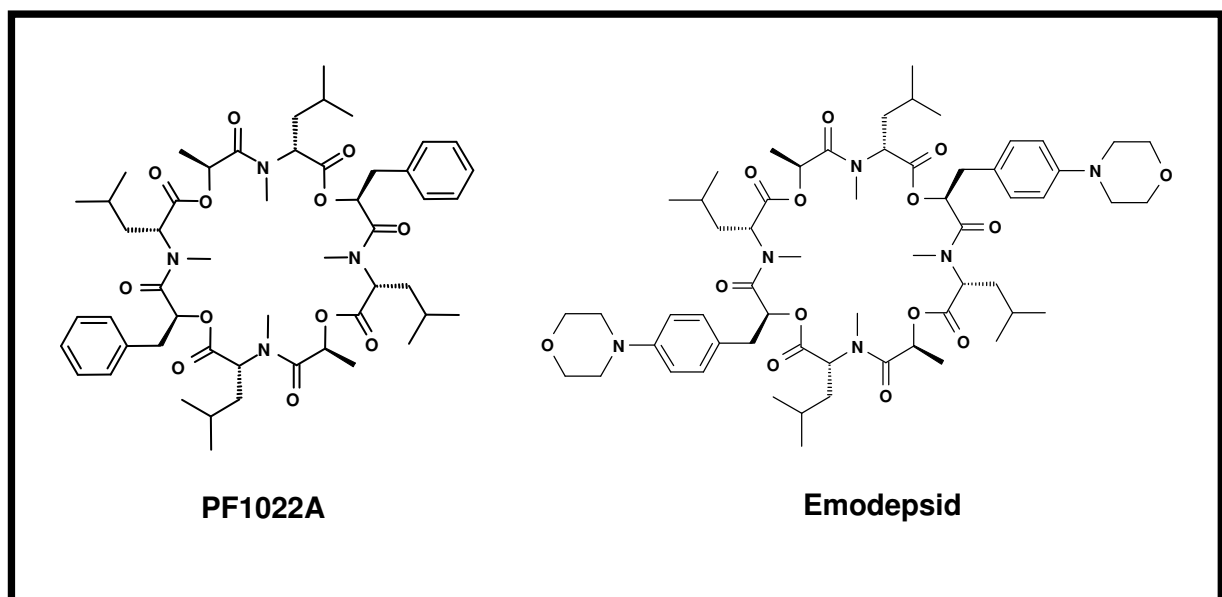


Abb. 1: Schematische Darstellung der chemischen Struktur von PF1022A und Emodepsid (nach Harder et al. 2005)

Die Bayer AG führte Emodepsid im Oktober 2005 als Spot-on Präparat für Katzen unter dem Namen Profender® auf dem Markt ein. Profender ist ein Kombinationspräparat aus Emodepsid und dem Zestodizid Praziquantel und gewährleistet eine Wirksamkeit gegen die gastrointestinalen Nematoden der Katze (*Toxocara cati*, *Toxascaris leonina*, *Ancylostoma tubaeforme*) sowie gegen ihre

Bandwürmer (*Dipylidium caninum*, *Taenia taeniaeformis*, *Echinococcus multilocularis*) (Altreuther et al., 2005b).

Emodepsid zeigt eine gute Wirksamkeit gegen eine große Anzahl von Nematoden verschiedener Tierarten (Altreuther et al., 2005b; Altreuther et al., 2005a; Mehlhorn et al., 2005; Reinemeyer et al., 2005; Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2001). Unter anderem wurde die anthelminthische Wirkung für die veterinärmedizinisch relevanten Hakenwürmer *A. caninum*, *A. tubaeformae* und *U. stenocephala* nachgewiesen (Harder und Samson-Himmelstjerna, 2002; Altreuther et al., 2005a). Des Weiteren wirkt es filarizid gegen die Filarienarten *Litomosoides sigmodontis*, *Acanthocheilonema viteae* und *Brugia malayi* (Zahner et al., 2001) und wirkt, anders als PF1022A, auch gegen die im Muskel befindlichen Larven von *Trichinella spiralis* (Harder und Samson-Himmelstjerna, 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass Emodepsid wirksam gegen levamisol-, ivermectin- und febantelresistente *H. contortus*-Stämme ist (Samson-Himmelstjerna et al., 2005).

2.3.2.3 Wirkmechanismus

Der Wirkmechanismus von PF1022A bzw. Emodepsid ist bisher nur in Ansätzen aufgeklärt. In *C. elegans* bewirkt Emodepsid eine schlaffe Paralyse der Muskeln der Körperwand und des Pharynx. Bereits 2003 konnten Thompson et al. an präparierten Muskelstreifen von *Ascaris suum* zeigen, dass PF1022A eine Neurotransmitter (AF2, KHEYLRFamid) induzierte Muskelspannung blockiert bzw. umkehrt. In einer Arbeit von Willson et al. (2003b) wurde ebenfalls die Wirkung von Emodepsid auf die Muskelspannung von *A. suum* untersucht. Es wurde sowohl eine Muskelentspannung als auch eine Inhibition der Acetylcholin- oder Neuropeptid AF2-vermittelten Muskelkontraktion dokumentiert. Es wurde weiterhin festgestellt, dass Emodepsid eine Calcium-abhängige Hyperpolarisation der Muskelzellen auslöst. Da der inhibitorische Effekt von Emodepsid auf die Acetylcholinantwort nicht in Muskelstreifen ohne Nervenzuleitung auftrat, wird vermutet, dass der Effekt neuronal gesteuert wird und nicht direkt über den Muskel. Außerdem ist die Reaktion auf Emodepsid Kalium-abhängig und zeigt Ähnlichkeit zu den inhibitorischen Effekten der Neurotransmitter PF1 (SDPNFLRFamide) und PF2 (SADPNFLRFamide). Es wird demnach vermutet, dass Emodepsid im Bereich der neuromuskulären Synapse die Freisetzung inhibitorischer Neurotransmitter oder -modulatoren bewirkt. Dies wird gestützt durch Untersuchungen am Calcium-gesteuerten Kaliumkanal SLO-1, der

eine Schlüsselrolle bei der Wirkung von Emodepsid einnimmt. Nach diesen Untersuchungen wird vermutet, dass SLO-1 als Rezeptor den Effekt von Emodepsid vermittelt und die Wirksamkeit über Neurotransmitter beeinflusst wird (Willson et al., 2004; Bull et al., 2007; Guest et al., 2007; Holden-Dye et al., 2007). Auf SLO-1 und weitere, mögliche Rezeptoren für Emodepsid soll in Abschnitt 2.4 und folgenden eingegangen werden.

In Studien mit *C. elegans* konnte beobachtet werden, dass Emodepsid vielfältige Auswirkungen auf den Wurm hat. So erfolgte eine Inhibition der Beweglichkeit, der Nahrungsaufnahme und des Eiablageverhaltens. Außerdem wurde die Entwicklung der Würmer nach dem Schlupf aus dem Ei verlangsamt, wobei das Schlüpfen selbst nicht beeinflusst wurde. Weiterhin wurde gezeigt, dass L4 weniger sensibel auf Emodepsid reagieren als adulte Würmer. Dies wurde anhand der Bewegungsmuster und -häufigkeit bestimmt. Ob der Grund hierfür in einer unterschiedlichen Durchlässigkeit der Kutikula liegt oder die Expression relevanter Rezeptoren und Mediatoren bei den Stadien verschieden ist, bleibt zu untersuchen (Bull et al., 2007). Des Weiteren wurde ein Latrophilin-ähnlicher Rezeptor identifiziert, der PF1022A bindet (Saeger et al., 2001). In Versuchen mit *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass Nullmutanten des Rezeptors eine geringere Sensitivität gegenüber Emodepsid aufwiesen als der Wildtyp (Willson et al., 2004). Auf den Latrophilin-ähnlichen Rezeptor wird in Abschnitt 2.4.1.2 genauer eingegangen.

2.4 Zielproteine für Emodepsid

Unter Abschnitt 2.3.2.3 wurden bereits zwei mögliche Rezeptoren für PF1022A bzw. Emodepsid aufgeführt, die im Folgenden genauer besprochen werden sollen.

2.4.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind Liganden-gesteuerte Membranrezeptoren, die Signale über heterotrimere Guanylnucleotid-bindende Proteine (G-Proteine) ins Zellinnere weiterleiten. Sie haben vielfältige Strukturen und Funktionen und sind eine der größten Proteinfamilien. Unter ihnen befinden sich unter anderem Licht-, Geruchs-, Geschmacks- und Pheromonrezeptoren, und sie sind Zielproteine für Hormone und Neurotransmitter. Außerdem stellen sie Zielproteine für Medikamente dar: etwa 40 % aller verschreibungspflichtigen Pharmazeutika zielen auf GPCRs (Filmore, 2004). Charakteristisch für die Gruppe

sind die sieben Transmembrandomänen, das sind hydrophobe α -Helices, die die Zellmembran durchspannen und die durch drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Über die Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins werden z.B. die Aktivität von Enzymen, Ionenkanälen oder der Stofftransport reguliert. Dabei führt diese Aktivierung über drei Schritte. Zunächst bindet ein Ligand an eine meist extrazelluläre oder auch membranständige Region des Rezeptors. Die folgende Konformationsänderung führt dazu, dass der Rezeptor als GTP-Austauschfaktor für das G-Protein fungieren kann. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (α , β und γ). Nach einer Aktivierung des Rezeptors erfolgt ein Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins. Dieses kann dadurch in eine α und eine β/γ -Untereinheiten dissoziieren, welche dann wiederum weitere Proteine aktivieren oder deaktivieren (Stryer, 1995).

Die Klassifizierung der GPCRs erfolgte ja nach Forschungsstand immer wieder neu. Die erste Einteilung erfolgte in fünf Gruppen A-E (Attwood und Findlay, 1994). Eine aktuelle Klassifizierung basiert auf der Identifikation und Analyse von rund 800 GPCRs des Menschen. Die Gruppen werden als **G**lutamat, **R**hodopsin, **A**dhäsion, **f**izzled/taste2 und **S**ekretin bezeichnet, das System wurde GRAFS genannt (Fredriksson und Schioth, 2005).

2.4.1.1 Hc110-R

Für den Schafnematoden *H. contortus* wurde 2000 über ein Ligandenimmunoscreening einer cDNA-Bank ein möglicher Rezeptor für PF1022A identifiziert. Die vollständige cDNA-Sequenz ist 3539 bp lang und kodiert für einen 110 kD großen Transmembranrezeptor (986 AS), der als Hc110-R bezeichnet wurde. Er gehört in die Sekretin-Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und ist homolog zu dem heptahelikalen Transmembranrezeptor Latrophilin-like protein 1 (LAT-1) von *C. elegans*. Beide weisen Ähnlichkeiten zu der Gruppe der Latrophiline der Säuger auf. Hc110-R zeigt zu den Latrophilinen der Ratte, des Rindes und des Menschen eine Identität von rund 31 %. Hc110-R, LAT-1 und die Säugerlatrophiline bilden eine monophyletische Gruppe innerhalb der Sekretin-Familie (Saeger, 2000; Saeger et al., 2001; Harder und Samson-Himmelstjerna, 2002). Die Bindung des PF1022A erfolgt am extrazellulären NH_2 -Terminus. Wie auch bei den Latrophilinen der Säuger erfolgt eine Bindung des α -Latrotoxins (LTX) (Saeger et al., 2001). Dabei handelt es sich um einen Bestandteil des Giftes der Schwarzen Witwe (*Latrodectus*

spec.), der zu massiven Neurotransmitterausschüttungen führt. Weitere Bestandteile des Giftes sind fünf Latroinsektotoxine, insektizide Bestandteile mit den Bezeichnungen LIT α , β , γ , δ und ϵ und das α -LCT, das toxisch gegen Crustacea wirkt (Krasnoperov et al., 1990a; Krasnoperov et al., 1990b). Es wurde gezeigt, dass α -LTX in β -Zellen durch Inhibition von spannungsabhängigen Kaliumkanälen und durch Stimulation von Calciumkanälen über Latrophilin eine massive Exozytose induziert (Lajus et al., 2006). In Hc110-R-exprimierenden HEK-Zellen führt eine Stimulation mit 75 nm α -LTX über Cd^{2+} - und Nifedipin-blockierbare Ca^{2+} Kanäle zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Eine schematische Ansicht von Hc110-R ist in Abbildung 2 dargestellt.

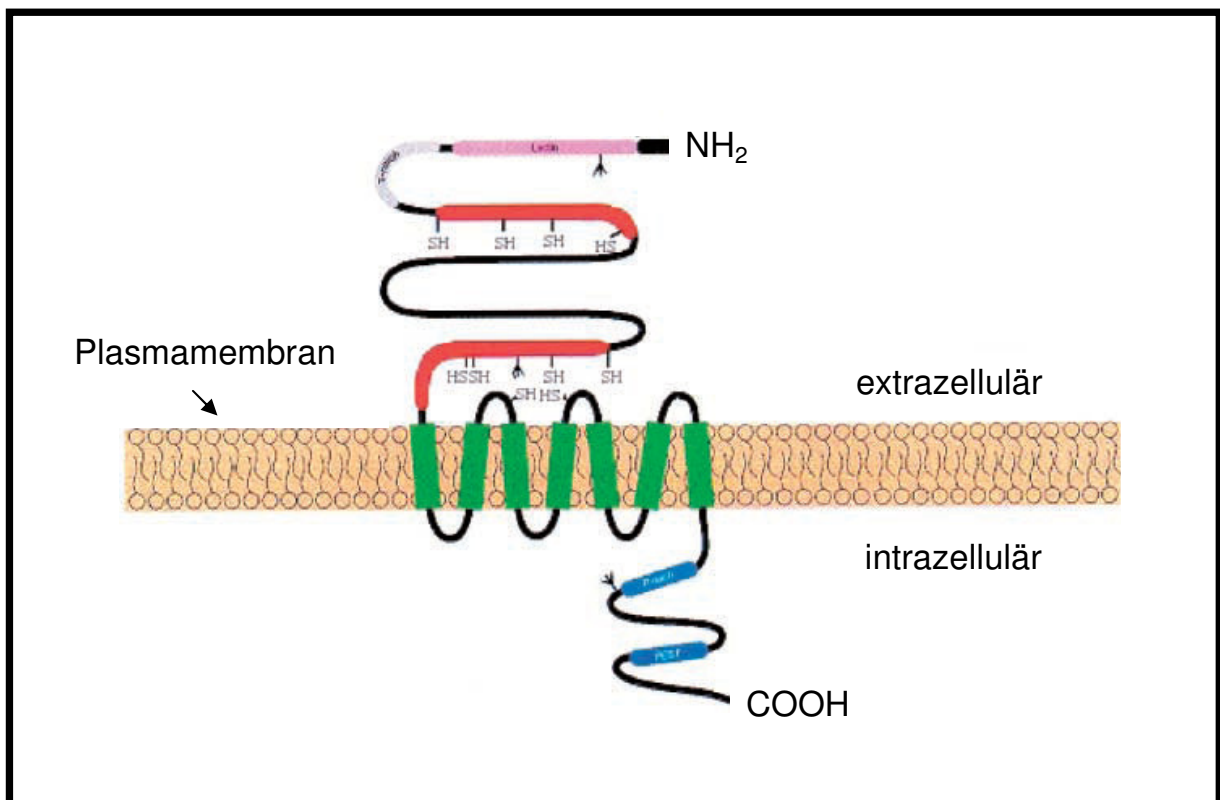


Abb. 2: Schematische Darstellung des heptahelikalen Transmembranrezeptors Hc110-R (modifiziert nach Saeger, 2001)

2.4.1.2 *Caenorhabditis elegans* LAT-1

In *C. elegans* wurde auf dem Cosmid B0457.1 ein homologer Rezeptor zu Hc110-R mit Ähnlichkeiten zu den Latrophilinen der Säuger identifiziert (s. 4.4.3). Das Gift der Schwarzen Witwe wirkt in seiner vollständigen Zusammensetzung toxisch auf *C. elegans*, wohingegen die Komponente α -LTX keine sichtbare Wirkung herbeiführt (Mee et al., 2004). In entsprechenden *lat-1* Mutanten, in denen die Expression von

lat-1 durch RNAi unterdrückt wurde, wurde die Wirkung des Giftes jedoch aufgehoben, was zu der Annahme führt, dass es sich bei LAT-1 um den homologen Rezeptor zu Latrophilin handelt (Mee et al., 2004). Außerdem wurde eine geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Acetylcholinrezeptor Agonisten Levamisol und Imipramin verzeichnet. Phänotypisch zeigen die *lat-1*-RNAi-behandelten Würmer einen veränderten Defäkationsablauf, der Darm ist besonders aufgebläht (Mee et al., 2004). Außerdem wurde in einer anderen Studie beobachtet, dass *lat-1*-Mutanten eine verringerte Pharynxaktivität aufwiesen (Willson et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass Emodepsid einen paralyisierenden Effekt auf den Pharynx besitzt, dieser jedoch bei den *C. elegans*-Nullmutanten nicht auftritt. Die allgemeine Beweglichkeit des Wurmes war nicht beeinflusst, was zu der Vermutung führt, dass weitere Rezeptoren in den Wirkmechanismus involviert sind (Willson et al., 2004). Die *lat-1*-Expression in adulten *C. elegans* ist in vorderen Neuronen des Pharynx lokalisiert. Es gibt eine punktuelle Expression in einem Neuron im Bulbus, sowie einigen Neuronen im Korpus, von denen sich Synapsen bis zum Isthmus verfolgen lassen. Bei Larven hingegen erscheint die Expression hauptsächlich in den Muskelzellen des Pharynx (Willson et al., 2004).

2.4.1.3 Depsiphiline

Orthologe Rezeptoren zu LAT-1 wurden bereits in den Trichostrongyliden *C. oncophora* und *O. ostertagi*, parasitischen, gastrointestinalen Nematoden des Rindes, identifiziert (Welz et al., 2005). Die Aminosäuresequenzen der beiden Rezeptoren haben untereinander eine Ähnlichkeit von 91 %, zu Hc110-R jeweils 89 % und zu LAT-1 von *C. elegans* 49 %. Sie wurden in Abgrenzung zu den Säugerlatrophilinen und dem LAT-1 des freilebenden Nematoden *C. elegans* als Depsiphiline benannt (Welz et al., 2005).

2.4.1.4 Latrophiline der Säuger

Die Latrophiline der Säuger gehören innerhalb der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in die Sekretin-Gruppe. Es wurden Latrophiline in zahlreichen Säugerarten beschrieben. Es werden mittlerweile drei Latrophilin-Homologe unterschieden, die sich hauptsächlich in den COOH-Termini unterscheiden. Latrophilin 1 wird in den terminalen Enden von Neuronen und in endokrinen Zellen exprimiert (Lelianova et al., 1997; Davletov et al., 1998; Krasnoperov et al., 1997).

Latrophilin 3 wird ausschließlich im Gehirn exprimiert, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß, als Latrophilin 1. Latrophilin 2 kommt dagegen in vielen verschiedenen Gewebetypen und Organen vor, wie z. B. Leber, Lunge und Gehirn. Beim Rind liegen die Ähnlichkeiten der drei Latrophiline zueinander zwischen 70 und 75 %, wohingegen Latrophilin1 von Rind und Ratte zueinander zu 99,4 % identisch sind. Eine Bindung von LTX erfolgt nur an Latrophilin 1 (Matsushita et al., 1999).

2.4.2 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle stellen die größte Gruppe von Ionenkanälen dar. Sie werden je nach Anzahl ihrer Transmembrandomänen (2, 4 oder 6) in drei Gruppen unterteilt. Die größte Gruppe bilden hier Vertreter der Gruppe mit sechs Transmembrandomänen. Dazu gehören spannungsabhängige K^+ -Kanäle, KCNQ-Kanäle, Typ eag K^+ -Kanäle und drei Arten Ca^{2+} -abhängiger, zum Teil spannungsabhängiger K^+ -Kanäle. Die Gruppe der Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle wird ihrerseits wieder in fünf Untergruppen unterteilt. Innerhalb dieser befinden sich die K^+ -Kanäle vom SK (small K^+ -conductance), IK (intermediate K^+ -conductance) und BK (big K^+ -conductance) Typ. Die funktionelle Rolle dieser Kanäle besteht darin, den zellulären Ca^{2+} -Metabolismus und das Membranpotential zu koppeln, also chemische und elektrische Signale ineinander umzuwandeln. Sie tragen zur Regulierung des Ruhemembranpotentials und der K^+ -Homöostase bei (Miller, 2000; Wei et al., 1996).

2.4.2.1 Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle vom BK-Typ

Die Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle vom BK-Typ weisen eine hohe Leitfähigkeit auf. Ihre Aktivierung erfolgt entweder durch einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg oder durch eine Erhöhung des Membranpotentials. In Säugern regulieren sie in Neuronen und Skelettmuskelzellen die schnelle Repolarisation des Membranpotentials und die Ausschüttung von Neurotransmittern. Sie werden durch Iberotoxin blockiert. Sie setzen sich aus einer α -Untereinheit mit sieben Transmembrandomänen (abweichend von der Gruppenzugehörigkeit), einem extazellulär gelegenen NH_2 -Terminus mit einer β -Untereinheit und einem intrazellulär liegenden $COOH$ -Terminus zusammen (Meera et al., 1997). In Abbildung 3 ist ein BK-Kanal vom Typ SLO-1 schematisch dargestellt. Die Schleife, die von den Transmembranhelices S5 und S6 gebildet wird, ist in Abbildung 3 mit P gekennzeichnet. Sie bildet den selektiven Eingang des Ionenkanals, durch den die K^+ -Ionen wandern und wird auch als

Selektivitätsfilter bezeichnet. Es wird angenommen, dass der COOH-Terminus als Sensor für den Ca^{2+} -Spiegel fungiert (Benatar, 2000). Die sogenannte Ca^{2+} -bowl besteht aus einem hoch konservierten Teil von 28 Aminosäuren. Schreiber und Salkoff (1997) zeigten, dass Mutationen in dieser Region zu einer reduzierten Ca^{2+} -Sensitivität führten. Außerdem befinden sich intrazellulär noch zwei Domänen, die den K^+ -Strom regulieren (S7, S8).

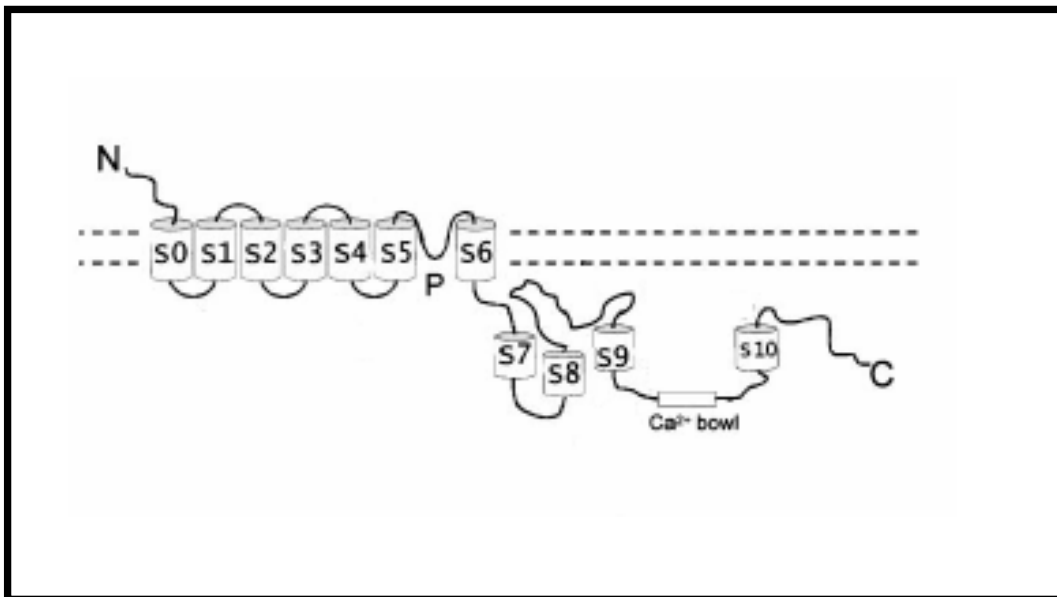


Abb. 3: Schematische Darstellung eines BK-Kanals. Mit N: NH_2 -Terminus, sieben Transmembranregionen (S0–S6), S7, S8: Regulation des K^+ -Flusses, dem Kanal für den K^+ -Durchtritt P, der sogenannten „ Ca^{2+} -bowl“ zwischen S 9 und S10, sowie dem COOH-Terminus C (modifiziert nach Wang 2001).

2.4.2.2 Der Calcium-gesteuerte Kaliumkanal SLO-1 von *C. elegans*

Elkins und Mitarbeiter (1986) beschrieben einen Kaliumkanal in der Fruchtfliege *Drosophila*, dessen Fehlen zu verminderter Flug- und Bewegungsfähigkeit führte. Der Name geht auf den Begriff *slowpoke*, Langweiler, Trödler, zurück und beschreibt das Verhalten von *Drosophila*-Mutanten, in denen nur ein verkürzter, nicht funktioneller SLO-1-Kanal exprimiert wird. Bei Säugern kommen vier verschiedene *slo*-Varianten vor: *slo-1*, *slo-2*, *slo-2.2* und *slo-3*. Kaliumkanäle vom SLO-Typ wurden bei *C. elegans* zuerst von Wei (1996) beschrieben. Es kommen zwei *slo*-Gene vor, *slo-1* und *slo-2*, die zwar untereinander konservierte Domänen aufweisen, aber insgesamt eher eine geringe Ähnlichkeit besitzen. SLO-2 reguliert die Na^+ - und Cl^- -Interaktion mit dem COOH-Terminus und gilt als Ortholog zu den SLO-2 der Säuger.

Über die genaue Funktion von SLO-2 in *C. elegans* ist bisher noch nichts bekannt. SLO-1 spielt eine bedeutende Rolle im Nervensystem von *C. elegans* und beeinflusst viele verschiedene Funktionen. Es existieren drei Spleißingvarianten: *slo-1a*, *slo-1b* und *slo-1c*, deren funktionelle Unterschiede bisher nicht bekannt sind. SLO-1 wird vorwiegend in Motoneuronen und in Muskelzellen der Körperwand und der Vulva exprimiert (Wang et al., 2001; Carre-Pierrat et al., 2006). In verschiedenen Studien wurde beobachtet, dass SLO-1 knockout-Mutanten in ihrer Bewegungsweise verändert sind (Wang et al., 2001; Guest et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass die Aktivität von Kaliumkanälen vom BK-Typ eng mit spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen gekoppelt ist und es wird vermutet, dass hierdurch die Freisetzung von Neurotransmittern reguliert wird (Marrion und Tavalin, 1998; Wang et al., 2001). Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass in *slo-1* knockout-Mutanten eine Hypersensitivität gegenüber dem Acetylcholinesteraseinhibitor Aldicarb besteht, was dafür spricht, dass SLO-1 einen inhibitorischen Effekt auf die Neurotransmission hat (Wang et al., 2001). SLO-1 spielt außerdem eine Rolle bei der Wirkung von Ethanol. Davies und Mitarbeiter (2003) identifizierten dreizehn *slo-1*-Mutanten, die alle in Bezug auf die Lokomotion und das Eiablageverhalten resistent gegenüber Ethanol sind. Rescue-Versuche zeigten, dass nur unter einem neuronalen Promotor die Ethanol sensitivität wieder hergestellt werden konnte, die Expression unter einem muskulären Promotor dagegen ergab keine signifikante Änderung.

Das Octadepsipeptid Emodepsid hat vielfältige Wirkungen auf *C. elegans*. Es unterdrückt Entwicklung, Bewegung, Eiablageverhalten und Nahrungsaufnahme (Bull et al., 2007). Diese breit gefächerte Wirkungsweise ließ auf einen neuronalen Mechanismus schließen. Ein genetisches Screening von Guest et al. (2007), ergab verschiedene *slo-1*-Mutanten, wovon eine komplett resistent gegen Emodepsid war. Hier konnte über rescue-Versuche gezeigt werden, dass sowohl neuronale als auch muskuläre Expression von *slo-1* für sich ausreichen, um die Emodepsid-Sensitivität wieder herzustellen. Diese Würmer zeigten ein dem Wildtyp ähnliches Verhalten, wenn sie Emodepsid ausgesetzt wurden. Ihre Bewegungsweise ist schwerfällig, die Pumprate des Pharynx ist herabgesetzt und die Eiablage ist reduziert.

2.5 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

Der freilebende Nematode *C. elegans* wurde schon in den 60er Jahren als Modell für entwicklungsbiologische Zusammenhänge und genetische Analysen verwendet (Brenner, 1974). Mittlerweile hat er sich zu einem vielfach verwendeten Modellsystem für genetische, molekulare und physiologische Fragestellungen entwickelt. Er ist leicht auf Agarplatten zu halten und sein Entwicklungszyklus ist kurz.

2.5.1 Biologie von *C. elegans*

Caenorhabditis elegans gehört im Stamm der Nematoda in die Klasse der Chromadorea, Unterklasse Rhabditia, Ordnung Rhabditida und die Familie der Rhabditidae. Er ist bakteriovor, lebt hauptsächlich in der Erde und wird oft in sehr nährstoffreichen Bereichen gefunden, wie z. B. Komposthaufen oder verfallende Früchte. Er kommt weltweit in gemäßigten Klimazonen vor.

Die adulten Würmer sind etwa 1 mm lang. Es kommen hauptsächlich hermaphrodite Adulte vor, die selbstbefruchtend sind. Nur etwa 0,05 % einer Population sind männlich. Bemerkenswert ist die Zellkonstanz (Eutelie): Hermaphrodite Adulte bestehen immer aus 959, männliche Tiere aus 1031 Zellen. Die Art besitzt fünf Paar autosomale Chromosomen (I-V) und ein Paar Geschlechtschromosom (X). Das Geschlecht wird über ein XX (hermaphrodit)-XO (männlich)-System bestimmt. Der Entwicklungszyklus verläuft über vier Larvenstadien (L1-L4) und ist bei 25 °C nach drei Tagen abgeschlossen. Unter bestimmten Umweltbedingungen, die Stress auslösen, entwickelt sich eine abweichende L3, die so genannte Dauerlarve. Überbevölkerung, Nahrungsmangel, zu hohe oder zu niedrige Temperaturen führen zu erhöhten Pheromonausschüttungen, welche die Entwicklung des Dauerstadiums induzieren. Es entwickelt sich zunächst eine Prä-Dauerlarve, die Fettreserven anlegt und die Entwicklung der Gonaden einstellt. Bei der Dauerlarve ist die Pharynx- oder die Darmöffnung meist nicht vorhanden und die Larve ist, trotz einer verdickten Kutikula, deutlich dünner, als die normalen L3. Auf diese Weise können Dauerlarven viele Wochen ungünstige Umweltbedingungen überstehen, dieses Stadium wird auch als Diapause oder Hypobiose bezeichnet. Die normale Entwicklung wird wieder aufgenommen, wenn die entsprechenden Bedingungen dies wieder zulassen (Hu, 2007; Cassada und Russell, 1975; Brenner, 1974) Das Dauerstadium von *C. elegans* wird von manchen Autoren als analog zum infektiösen L3-Stadium parasitischer

Nematoden betrachtet (Riddle und Albert, 1997; Tissenbaum et al., 2000; Hotez et al., 1993). Es wurde z. B. nachgewiesen, dass sowohl bei *C. elegans* als auch bei *A. caninum* muscarinerge Agonisten die Weiterentwicklung fördern, wohingegen der Antagonist Atropin für den muscarinergen Signalweg diese inhibiert (Tissenbaum et al., 2000).

2.5.2 Das Modell *C. elegans*

Seit 1998 ist das Genom von *C. elegans* komplett sequenziert (C.elegans Sequence Consortium, 1998). Es hat eine Größe von 100,2 Mb und es sind über 20.000 Protein-kodierende Sequenzen bekannt und über 300.000 expressed sequence tags (ESTs) hinterlegt.

C. elegans zeichnet sich aus zahlreichen Gründen als Modellorganismus für die verschiedensten Forschungsgebiete aus. Da es sich bei *C. elegans* um einen vielzelligen Organismus handelt, der trotz seiner einfachen Anatomie, einen komplexen Entwicklungszyklus mit Embryogenese, Morphogenese bis Wachstum zum adulten Tier durchläuft, können Ableitungen zu komplexeren Organismen gemacht werden. Physiologische Abläufe können aufgrund des einfachen Baus leicht verfolgt werden. So besitzt *C. elegans* nur 302 Nervenzellen, deren Aufgaben mittlerweile identifiziert sind. Der Molekularbiologe und Nobelpreisträger John Sulston konnte einen „Zellstammbaum“ erstellen, in dem er die Entwicklung jeder einzelnen Zelle ab der Eizelle aufgeklärt hat. Bei den Hermaphroditen ist die Apoptose von 131 Zellen dokumentiert. Für etwa 35 % seiner Gene sind Homologe im Menschen bekannt. *C. elegans* hat eine kurze Generationszeit und lässt sich einfach und kostengünstig im Labor halten. Die Transparenz dieses Nematoden macht eine einfache Beobachtung unter dem Mikroskop möglich. Außerdem lassen sich die Würmer bei -80 °C einfrieren und nach einer Lagerzeit wieder reaktivieren, was die Stammhaltung sehr erleichtert. Es werden mittlerweile je nach Anwendung viele verschiedene Stämme im Labor eingesetzt. Neben dem Wildtyp-Stamm gibt es zahlreiche Stämme, die z. B. für die Selektion transfizierter Individuen bestimmte, gut sichtbare Merkmale aufweisen.

Auch das Verhalten von *C. elegans* ist detailliert dokumentiert. Besonders Untersuchungen zur Chemotaxis, Thermotaxis, Mechanotransduktion und dem Paarungsverhalten der Männchen stehen im Fokus der Forschung. Dies erlaubt es,

genetische Veränderungen auch anhand von geänderten Verhaltensweisen zu beschreiben (Hart, 2006).

2.5.3 RNA interference (RNAi)

Im Jahre 2006 wurde die Arbeit von Andrew Fire und Craig Mello über RNA interference (RNAi) bei *C. elegans* mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Mit RNAi lässt sich die Expression von Genen gezielt inhibieren (Fire et al., 1998). Die Methode des RNAi wurde, nachdem erstmals in *C. elegans* durchgeführt, mittlerweile in verschiedenen Organismen unterschiedlicher Tierstämme und -klassen etabliert. Es handelt sich hierbei um eine Technologie, die Expression bestimmter Gene zu unterdrücken, indem genspezifische doppelsträngige RNA (dsRNA) in einen Organismus eingeschleust wird. Sie wird außer bei Wirbellosen wie *C. elegans* auch bei Protozoen, Insekten, Amphibien und Säugern angewendet, um gezielt die Expression von Genen zu unterdrücken und so Informationen über deren Funktion zu erhalten (Ullu et al., 2004; Oelgeschlager et al., 2000; Kennerdell und Carthew, 1998; Hannon, 2002). Bei *C. elegans* kann das Einschleusen der dsRNA über Mikroinjektion erfolgen, ebenso ist dies über die Aufnahme von dsRNA-exprimierenden Bakterien möglich oder über die Aufnahme durch die Kutikula über ein Medium. Diese Methode wurde auch eingesetzt, um homologe Gene parasitischer Nematoden zu untersuchen, wie z. B. bei der Untersuchung neuer Zielproteine für die Bekämpfung von Nematoden (Britton und Murray, 2006; Kumar et al., 2007; Issa et al., 2005; Aboobaker und Blaxter, 2003). Da sich aber für viele Gene parasitischer Nematoden keine homologen Gene in *C. elegans* finden lassen, gibt es zunehmend Versuche RNAi direkt bei parasitischen Nematoden anzuwenden. Die Erfolge sind bisher, hauptsächlich aufgrund mangelnder Spezifität, nur eingeschränkt positiv zu bewerten (Geldhof et al., 2007; Issa et al., 2005). Zudem scheint die Methode nicht für alle Gene anwendbar zu sein (Britton und Murray, 2006).

2.5.4. *Caenorhabditis elegans* als Modell für parasitische Nematoden

Die in vitro Haltung und Vermehrung von parasitischen Nematoden ist für die meisten Arten sehr aufwändig bzw. gar nicht möglich. Lediglich *Parastrongyloides trichosuri* und das frei lebende Stadium von *Strongyloides stercoralis* konnte bislang erfolgreich als Modell für die Untersuchung parasitischer Lebensweisen eingesetzt

werden (Grant et al., 2006b; Grant et al., 2006a; Lok, 2007). Da es sich bei *Strongyloides stercoralis* aber um einen für den Menschen pathogenen Organismus handelt, sind einige Sicherheitsvorkehrungen zu treffen, die das Arbeiten einschränken. Ein Restrisiko bleibt bestehen. Physiologische oder verhaltensbiologische Untersuchungen sind an parasitischen Würmern, die sich nicht in der natürlichen Umgebung, also im Wirt, befinden, nicht möglich. Phylogenetische Analysen der kleinen ribosomalen Untereinheiten gruppierten *C. elegans* innerhalb des Stammes der Nematoda in die Clade V, zu der auch *Haemonchus contortus*, *Nippostrongylus brasiliensis* und *Ancylostoma caninum* gehören (Blaxter, 1998). Aufgrund der verwandschaftlichen Nähe von *C. elegans* und parasitischen Nematoden stellt dieser eine geeignete Möglichkeit dar, genetische, regulatorische und physiologische Zusammenhänge parasitischer Nematoden zu untersuchen (Bürglin et al., 1998). Es wird angenommen, dass die genetischen Ähnlichkeiten zwischen *C. elegans* und parasitischen Nematoden besonders bei Genen groß sind, die bei der Evolution des Parasitismus eine Rolle gespielt haben, z. B. Verdauungsenzyme oder sezernierte Hydrolasen (Geary und Thompson, 2001). Die bisher identifizierten Gene der filarischen Nematoden *Brugia malayi* und *Onchocerca volvulus* weisen eine Identität von über 40 % zu denen von *C. elegans* auf (Hashmi et al., 2001). In einigen Studien gelang die Expression von Reportergenen in *C. elegans* unter der Kontrolle von Promotoren parasitischer Nematoden. Britton und Mitarbeiter (1999) zeigten, dass Promotoren des Pepsinogen Gens *pep-1* und der Cystein Protease AC-2 von *H. contortus* zur Expression eines Reportergens in Darmzellen von *C. elegans* führen. Die Identität der Promotoren zu denen der homologen Protease von *C. elegans* liegt bei 50 % (Ray und McKerrow, 1992). Dieselbe Studie dokumentierte eine Expression des kutikulären Kollagens *colost-1* in Zellen der Hypodermis von L4. In einer weiteren Untersuchung wurde eine 745 bp lange Sequenz strangaufwärts des Startcodons der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) des pflanzenpathogenen Nematoden *Globodera rostochiensis* mit dem Grünfluoreszierenden Protein (GFP) als Reportergen gekoppelt und in *C. elegans* exprimiert. Die Expression erfolgte hauptsächlich in den Muskelzellen der Körperwand (Qin et al., 1998). Auch die Promotorregion eines Glutamat-gesteuerten Chloridkanals von *H. contortus* führte in *C. elegans* zur Expression von GFP in Neuronen des Pharynx (Liu et al., 2004).

Couthier und Mitarbeiter (2004) exprimierten den GATA Transkriptionsfaktor HcELT-2 von *H. contortus* in endodermalen Zellen von *C. elegans*. Sie konnten damit demonstrieren, dass ELT-2, das für die Entwicklung und Differenzierung des Endoderms eine große Rolle spielt, zwischen den beiden Nematoden funktional konserviert ist. Des Weiteren gelang die Expression von Pepsinogen von *H. contortus* in *C. elegans* unter einem spezifischen Promotor von *C. elegans*, der zu Expression im Darm führt. Hierbei ist unter anderem bemerkenswert, dass hier die genomische Sequenz des Pepsinogens eingesetzt wurde und diese dann in *C. elegans* korrekt gespleißt wurde (Redmond et al., 2001). Dies konnte auch in einer ähnlichen Studie für die Glutathion-S-Transferase von *O. volvulus* nachgewiesen werden (Krause et al., 2001). Die Expression von Genen parasitischer Nematoden in *C. elegans* wurde noch in wenigen weiteren Studien erfolgreich durchgeführt (Kwa et al., 1995; Pillai et al., 2005).

2.5.5 Verhaltensweisen von *C. elegans* als Untersuchungsparameter

Die Verhaltensweisen von *C. elegans* sind detailliert untersucht. Es werden besonders die Lokomotion, das Verhalten bei der Eiablage, das Paarungsverhalten der Männchen und die Futtersuche und -aufnahme beschrieben (Schafer, 2005; Barr und Garcia, 2006; Hart, 2006). Neben grundsätzlichen morphologischen Veränderungen am Tier werden insbesondere auch diese Verhaltensweisen als Parameter zur Beurteilung der Auswirkung einer genetischen Veränderung herangezogen. Es soll hier auf die Lokomotion und die Futtersuche bzw. -aufnahme besonders eingegangen werden, da sie einen Teil der Untersuchungsparameter dieser Arbeit darstellen.

Eine vollständige Schlängelbewegung ist definiert als eine sinusoidale Bewegung, bei der der Kopf einmal wieder an den Ausgangspunkt der Wellenbewegung zurückkehrt. Die Anzahl der einzelnen sinusoidalen Bewegungen (*body bends*) wird gezählt und mit einer Kontrollgruppe verglichen. So können sowohl Veränderungen, die Muskelrezeptoren direkt betreffen, detektiert werden, als auch Auswirkungen auf neuronaler Ebene eingeordnet werden.

Bei Genen, die im Bereich des Pharynx, seiner Muskulatur oder im Nervenring, exprimiert werden und die Auswirkungen auf dessen Aktivität haben, kann diese zur Beurteilung von genetischen Veränderungen herangezogen werden. Dazu kann z.B.

die Anzahl der Pumpbewegungen des Bulbus dienen, oder auch Änderungen der elektrophysiologischen Erregbarkeit (Hart, 2006).

2.5.6 Stämme und knockout-Mutanten

Neben dem *C. elegans* Wildtyp Stamm Bristol N2, gibt es zahlreiche weitere Stämme mit unterschiedlichen geno- und phänotypischen Merkmalen, die in der Forschung eingesetzt werden. Diese Stämme können unter anderem über das *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) bezogen werden. Das CGC ist eine Einrichtung des National Institutes of Health der USA mit Sitz an der University of Minnesota in Twin Cities. Hier werden alle bekannten Stämme von *C. elegans* gehalten und an Labore weltweit verschickt. Das *C. elegans* knockout Consortium produziert über chemische bzw. radioaktive Mutagenese knockout-Mutanten für jedes gewünschte Gen und versendet die entsprechenden Stämme ebenfalls über das CGC. Außerdem können knockout-Mutanten über das japanische „National Bioresource Project for the Experimental Animal“ bezogen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind unter Abschnitt 3.11 aufgeführt.

2.6 Quantitative real-time PCR

Um die Transkriptionsrate eines Genes zu bestimmen und damit Rückschlüsse auf seine Expression ziehen zu können, eignet sich die quantitative real-time PCR, der eine reverse Transkription der mRNA vorausgeht. Die Quantifizierung des PCR-Produktes erfolgt während der PCR (real-time) mittels Messung eines Fluoreszenzsignals, welches direkt proportional zur Amplifikation der Ausgangsmatrize ansteigt. Dieses Signal wird entweder unspezifisch über einen interkalierenden Farbstoff erzeugt oder über spezifische fluoreszierende Sonden. Die Intensität der Fluoreszenz wird während eines jeden Zyklus der PCR gemessen. Die Produktmenge korreliert an dem ersten signifikanten Anstieg in die exponentielle Phase mit der Menge der Ausgangs-DNA. Dieser Punkt ist erreicht, wenn das Signal erstmals den Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz übersteigt und wird auch als cycle threshold (C_T) bezeichnet (Bustin et al., 2005). Die Quantifizierung der Werte kann über zwei Wege erfolgen, die absolute und die relative Quantifizierung, die im Folgenden näher beschrieben werden.

2.6.1 Absolute Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung wird verwendet, wenn es notwendig ist, die genaue Kopienzahl des Transkripts zu bestimmen. Dazu wird während der PCR eine Verdünnungsreihe von cDNA *templates* des Zielgens in bekannter Kopienzahl mitgeführt. Im Vergleich mit der hieraus resultierenden Kalibrierungskurve kann die tatsächliche Kopienzahl der zu untersuchenden Probe bestimmt werden (Schmittgen, 2001; Livak und Schmittgen, 2001).

2.6.2 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird eine Änderung der Transkription eines Gens vergleichend zu einer Referenzgruppe, die als Kalibrator dient, bestimmt. Diese kann z.B. eine unbehandelte Gruppe darstellen oder eine Probe zum Zeitpunkt Null in einer Verlaufstudie. Außerdem wird die Transkription des Zielgens über die Transkription eines nicht regulierten so genannten housekeeping Gens normalisiert. Hierdurch soll gewährleistet werden, dass Unterschiede in der RNA-Extraktion, der cDNA-Synthese, aber auch gewebespezifische Unterschiede sowie Pipettierfehler ausgeglichen werden können. Eine Methode zur Analyse der relativen Transkription von Genen ist die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Voraussetzung hierfür ist, dass die Amplifikationseffizienzen des Ziel- und Referenzgens möglichst gleich 1 sind. Ist dies der Fall, erfolgt eine Verdopplung der Produktmenge in jedem PCR-Zyklus. Die Erstellung einer Standardkurve entfällt. Die Menge des Zielgens, welches auf ein endogenes Referenzgen normalisiert wurde und gegen einen Kalibrator relativiert wurde, wird mit folgender Gleichung dargestellt:

$$\text{Menge des Zielgens} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Dabei ist $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Zielgen} - \Delta C_T \text{ Referenzgen}$ (Livak und Schmittgen, 2001). Diese Methode erfordert eine gleich bleibende ideale Amplifikationseffizienz. Da dies nicht immer gegeben ist, wurde das effizienzkorrigierte Quantifizierungsmodell entwickelt, das Unterschiede in den Effizienzen der PCR in die Berechnung einbezieht (Pfaffl, 2001).

2.6.3 Housekeeping Gene

Als so genannte housekeeping Gene (HKG) oder auch konstitutive Gene werden Gene bezeichnet, die innerhalb eines Organismus, unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und Umwelteinflüssen konstant exprimiert werden. Sie kodieren im Allgemeinen für grundlegende Stoffwechsellzyme, Proteine des Zytoskeletts und ribosomale RNA, die für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion benötigt werden (Brown, 1999). Verschiedene Untersuchungen haben mittlerweile gezeigt, dass jedoch auch HKG Expressionsschwankungen unterliegen. So wurde z. B. für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen, dass sie individuell und während verschiedener Entwicklungsstadien differentiell exprimiert wird, und die Transkription durch eine Reihe anderer Faktoren, wie z.B. Insulin, Wachstumshormone und Vitamin D, beeinflusst wird (Bustin et al., 1999; Puissant et al., 1994; Calvo et al., 1997; Rolland et al., 1995; Freyschuss et al., 1994; Desprez et al., 1992). Auch für andere HKG wurden Unterschiede in der Transkriptionsrate dokumentiert. Daher ist bei der Auswahl der zu verwendenden HKG auf die Konstanz der Transkriptionsrate unter allen untersuchten Bedingungen zu achten (Bustin, 2000). Trivedi und Mitarbeiter (2005) haben für *A. caninum* bereits eine solche Evaluierung durchgeführt. Es wurden verschiedene Stadien (Eier, L1/L2, L3 und adulte Männchen und Weibchen) untersucht, sowie zwei verschiedene Stämme und serumstimulierte und nicht behandelte L3. Folgende Gene wurden hinsichtlich ihres Transkriptionsgrades untersucht: Aktin, 18S rRNA, 60S acidic ribosomal protein (arp), cAMP abhängige Protein Kinase A (cAMP), β -Tubulin und die RNA Polymerase II Untereinheit (RNA pol II). RNA pol II und β -Tubulin zeigten im Vergleich der verschiedenen Entwicklungsstadien die geringsten Unterschiede, wiesen allerdings große Unterschiede im Vergleich unterschiedlicher Stämme und Behandlungsgruppen auf. Insgesamt wurde für das 60 S acidic ribosomal protein für alle untersuchten Gruppen die geringste Schwankungsbreite dokumentiert und von den Autoren als geeignetes Referenzgen für Studien mit *A. caninum* empfohlen.

2.7 Intron-/Exonorganisation bei Nematoden

Um Genome von Nematoden und insbesondere parasitischen Nematoden zu erfassen, werden seit wenigen Jahren so genannte expressed sequence tags (ESTs) von zahlreichen Organismen dokumentiert. Es liegen momentan ESTs von 32 Arten parasitischer Nematoden vor. Bei der Analyse der bislang bekannten Daten konnte

festgestellt werden, dass es große Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen und Arten gibt und dass einige Gene einzigartig für den Stamm der Nematoda sind (Viney, 2006). Diese Tatsache wirft unter anderem die Frage auf, wie diese Unterschiede sich entwickelt haben, zu deren Beantwortung phylogenetische Analysen von Genen und Gengruppen, sowie Untersuchungen der Intron-/Exonorganisation beitragen können. Nach dem heutigen Wissenstand variiert die Genomgröße von Nematoden von 50-250 Mb, es gibt aber auch kleinere und deutlich größere, wie z. B. das Genom von *Parascaris univalens*, das eine Größe von ca. 2100 Mb aufweist (Niedermaier und Moritz, 2000; Leroy et al., 2003). Im *C. elegans* Genom fallen etwa 26 % der DNA auf Introns, 27 % auf Exons und 47 % ist intergenische DNA. Das durchschnittliche Gen hat eine Größe von 3 kb und enthält 5 Introns. Die mittlere Größe der Introns liegt bei 65 bp (der Wert ist durch das Vorhandensein weniger, sehr großer Introns verschoben), die am häufigsten vorkommende Größe beträgt etwa 47 bp (beim Menschen 87 bp) (Spieth und Lawson, 2006). Bei parasitischen Nematoden gibt es trotz Genomprojekten noch nicht sehr viele Informationen zu Introngrößen. Für *H. contortus* wurde beschrieben, dass Introns im Durchschnitt deutlich größer sind als bei *C. elegans* (Liu et al., 2004; Pratt et al., 1990). Auch der filarische Nematode *B. malayi* weist größere Introns auf und ihre Anzahl ist, verglichen mit orthologen Genen von *C. elegans*, ebenfalls höher (Guiliano et al., 2002). Von Prachumwat und Mitarbeitern (2004) wurde gezeigt, dass die Introngröße mit der Rekombinationsrate positiv korreliert ist (anders als z. B. bei *Drosophila* und dem Menschen). Kurze Introns werden hauptsächlich in häufig exprimierten Genen gefunden (Castillo-Davis et al., 2002).

Das Vorkommen und die Verteilung von Introns wurde unter anderem für *C. elegans* in phylogenetische Analysen einbezogen (Roy und Gilbert, 2005; Kiontke et al., 2004). Allerdings weist die hohe Dynamik, mit der Introns innerhalb einer Gattung verloren gehen oder hinzu gelangen, darauf hin, dass diese Parameter nur eingeschränkt für derartige Analysen geeignet ist (Kiontke et al., 2004; Fitch, 2005b).

3 Material und Methoden

3.1. Puffer und Lösungen

0,5 %, 1 % bzw. 2 %

Agarosegele

0,5 % (w/v), 1 % (w/v) bzw. 2 % (w/v) Agarose in 1 × TAE-Puffer aufgekocht, auf 56 °C im Wasserbad abgekühlt. Direkt vor Gebrauch wurde 1 µl GelStar[®] Nukleinsäurefarbstoff pro 10 ml Agarose zugefügt

DEPC-Aqua bidest.

0,1 % Diethylpyrocarbonat in Aqua bidest., 12 H bei Raumtemperatur rühren, anschließend autoklavieren

DEPC-Ethanol 75 %

75 % Ethanol in DEPC-Aqua bidest.

Gesättigte NaCl-Lösung

ca. 400 g NaCl in 1 L Leitungswasser (Dichte bei 20 °C: 1,2)

Gesättigte Zuckerlösung

60 g Succrose in 40 ml Aqua bidest.

40 % Zuckerlösung

40 ml gesättigte Zuckerlösung ad 100 ml Aqua bidest., mit blauer Lebensmittelfarbe gefärbt

25 % Zuckerlösung

25 ml gesättigte Zuckerlösung ad 100 ml Aqua bidest., mit roter Lebensmittelfarbe gefärbt

10 % Zuckerlösung

10 ml gesättigte Zuckerlösung ad 100 ml Aqua bidest., mit grüner Lebensmittelfarbe gefärbt

Guanidinthiocyanat-Puffer
(GIT-Puffer)

4 M Guanidinthiocyanat, 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), 1 % β-Mercaptoethanol in autoklaviertem Aqua bidest.

Material und Methoden

Glycerol Stocklösung	65 % Glycerol; 100 mM MgSO ₄ ; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) in Aqua bidest.
Homogenisierungspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % SDS, 50 mM DTT
Ladungspuffer für Agarosegele, 6x	0,25 % Bromphenolblau; 40 % Saccharose in Aqua bidest.
Emodepsid Stammlösung I	20 mM Emodepsid in Ethanol
Emodepsid Stammlösung II	2 mM Emodepsid in Ethanol
Emodepsid Stammlösung III	200 nM Emodepsid in Ethanol
Emodepsid Stammlösung IV	20 nM Emodepsid in Ethanol
Emodepsid Stammlösung V	2 nM Emodepsid in Ethanol
M9-Puffer	22 mM KH ₂ PO ₄ , 22 mM Na ₂ HPO ₄ , 85 mM NaCl, 1mM MgSO ₄ in Aqua bidest., autoklavieren
Physiologische NaCl-Lösung	0,9 % NaCl in Aqua bidest.
TAE-Puffer, 1x	40 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA (pH 8,0) in Reinstwasser
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA in Reinstwasser

3.2 Medien und Nährböden

Luria Bertani (LB)-Medium	1 % Bacto Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl (pH 7)
---------------------------	---

LB-Agarplatten	LB-Medium mit 15 % Agar/l
NGM-Agar	2 % Agar (w/v), 50 mM NaCl, 0,25 % Pepton (w/v) → autoklavieren, dann: 1 mM MgSO ₄ , 1 mM CaCl ₂ , 0,1 % (v/v) einer Cholesterol-Lösung (0,5 % (w/v) in Ethanol), 2,5 % einer 1M KPO ₄ Lösung in Aqua bidest. pH6
NZY-Medium	10 % Casein (enzymatisch verdaut), 0,1 % Casein (hydrolysiert), 5 % Hefeextrakt, 2 % MgSo ₄ , 5 % NaCl

Lösungen und Agar wurden autoklaviert. Vor der Verwendung von LB oder NZY wurde als Antibiotikum Kanamycin oder Carbenicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugefügt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Sigma-Aldrich, Steinheim und Merck, Darmstadt verwendet.

3.3 Reagentien

Emodepsid (Reinsubstanz)
Bayer AG, Monheim

Gel Star™ (Nukleinsäurefarbstoff)
Biozym, Hessisch Oldendorf

Ethanol
Carl Roth GmbH, Karlsruhe

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder
Fermentas, St. Leon-Roth

Ampuwa™
Fresenius, Bad Homburg

Trizol™ Reagent

250 bp DNA Ladder

Invitrogen, Karlsruhe

GBX Developer and Replenisher; GBX Fixer and Replenisher;

Kodak, Rochester, New York, USA

Arecolin Bromid , Chloroform

Merck Pharma GmbH, Darmstadt

RNasin® RNase Inhibitor, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Promega, Mannheim

DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled, 0,12-21,2 kb, Anti-Digoxigenin-AP,

Fab fragments

Roche, Basel

Glycogen (20 mg/ml)

Sigma-Aldrich, Steinheim

3.4. Enzyme

BD Advantage® 2 Polymerase Mix

Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France

T4 DNA Ligase; *Bam*HI; *Eco*RI; *Eco*RV; *Hind*III; *Nhe*I

Fermentas, St. Leon-Roth

SuperScript® III Reverse Transcriptase

Invitrogen, Karlsruhe

RQ1 RNase-freie DNase
Promega, Mannheim

SanDI
Stratagene, Amsterdam, Niederlande

3.5 Reaktionskits

BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit; BD Advantage® 2 PCR Kit,
GenomeWalker® Universal Kit
Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France

3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends; TOPO TA Cloning® Kit for
Sequencing
Invitrogen, Karlsruhe

NucleoBond® AX 100, NucleoSpin® Plasmid
Macherey & Nagel, Düren

Brilliant® QPCR Master Mix
Stratagene, Amsterdam, Niederlande

3.6 Geräte

Standard Power Pack P25; Trio-Thermoblock; Personal Cyclor
Biometra, Göttingen

Zentrifuge 5415 R; Pipetten 1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl; 500-5000 µl
Femtojet (Mikroinjektion), TransferMan NK2 (Manipulator)
Eppendorf, Hamburg

Bidest-Aufbereitung Fistream™ Cyclon
Fistream International Ltd., Loughborough, UK

Inkubator "Wärmeschrank 3033"

GFL, Burgwedel

Biofuge Pico; Omnifuge 2 ORS; Inkubator "Wärmeschrank BT 5042 E"

Heraeus Sepatech, Osterode

HE33 Mini Submarine Electrophoresis Unit

Hofer, San Francisco, USA

UV Illuminator TF-M 20x40 cm, 312nm

Intas, Göttingen

Wasserbad

Janke & Kunkel, Staufen

Zentrifuge BR4i

Jouan, Unterhaching

PTC-200 Peltier Thermo Cycler (PCR Cycler)

MJ Research Incorporation, Watertown, Massachusetts, USA

Nikon Eclipse Te 2000 (Mikroskop), Nikon SMZ 800 (Stereomikroskop), mit
Quecksilberlampe und GFP-Filter (GFP-B)

Nikon, Tokio, Japan

GeneAmp PCR System 9700 (PCR Cycler)

Perkin Elmer, Wellesley, USA

Spectrophotometer Nanodrop ND 1000

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

2303 Multidrive XL Stromquelle

Pharmacia LKB Bromma, Stockholm, Schweden

TissueRuptor™ (zum mechanischen Aufschließen von Gewebe)
Qiagen, Hilden

Elektronische Präzisionswaage L610D
Sartorius, Göttingen

P-2000 (Mikropipettenzieher)
Sutter Instruments, Novato, USA

Stereomikroskop Standard 14
Zeiss, Jena

Mx 4000 (real-time PCR-Gerät)
Stratagene, Amsterdam, Niederlande

3.7 Computerprogramme

Primer Express® Software v2.0
Applied Biosystems

DNASTAR
GATC Biotech, Konstanz

BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)

ClustalW v1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>); (Chenna et al., 2003)

ClustalX v1.83 (<http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>)

ConPred II (<http://bioinfo.si.hirosaki-u.ac.jp/~ConPred2/>)

Gene2Promotor, MatInspector
Genomatix Software GmbH

Sigma Stat

Jandel Scientific Corporation; Erkrath

MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007)

NCBI BLAST (Altschul et al., 1997)

NCBI CD-SEARCH (Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer et al., 2007)

PHOBIUS (<http://phobius.cgb.ki.se/index.html>); (Kall et al., 2004)

Align[®] Plus 4.0

Scientific and Educational Software, USA

Mx 4000 Software

Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Reference Manager 10.0

Thomson ISI ResearchSoft

TMMOD (<http://liao.cis.udel.edu/website/servers/TMMOD>)

3.8 Einwegartikel

10 µl, 100 µl und 1000 µl gestopfte Pipettenspitzen, 0,2 ml 1,5 ml und 2 ml
Reaktionsgefäße

Biozym, Hessisch-Oldendorf

0,5 ml Safe-lock Reaktionsgefäße

Eppendorf, Hamburg

Aluminiumsilikat Glaskapillaren SM 100-F-10, 1,00 mm (Part. No.: 30-0108)

Harvard Apparatus, Holliston, USA

Kodak[®] BioMax Light Film Light-1
Kodak, Rochester, New York, USA

Steritop[®] (Sterilfilter), Microcon[®] Centrifugal Filter Units
Millipore, Taufkirchen

1000 µl Pipettenspitzen
Ratiolab, Dreieich

Parafilm; Sterilfilter 0,22 µm Celluloseacetat Membran
Renner, Dannstadt

10 µl und 100 µl Pipettenspitzen; 10 ml und 25 ml Pipetten
Sarstedt, Nümbrecht

Optical Caps, 8 × Strip; Strip Tube 8 ×, 0.2 ml Format
Stratagene, Amsterdam, Niederlande

3.9 *Escherichia coli*-Stämme

One shot[®] Top 10 Chemically Competent *Escherichia coli*
F- *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) Φ 80/*lacZ*_M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1*
araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*
Invitrogen, Karlsruhe

JM109 Competent Cells
e14-(*McrA*-) *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* (*rK*- *mK*+) *supE44* *relA1* Δ (*lac-proAB*) [*F'* *traD36* *proAB* *lacIqZ*_M15]

XL10[®]-Gold Ultracompetent Cells
TetrD(*mcrA*)183 D(*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*)173 *endA1* *supE44* *thi-1* *recA1* *gyrA96* *relA1*
lac Hte [*F'* *proAB* *lacIqZDM15*]
Tn10 (Tetr) Amy Camr]
Stratagene, Amsterdam, Niederlande

3.10 Vektoren

pPD30.69 (Addgene Plasmid: 1444) zur Expression in *C. elegans*, mit *myo-2* Promoter und *unc-54* 3' UTR

pPD 95.75 (Addgene Plasmid: 1494) zur Expression in *C. elegans* mit GFP-Reporter gen und *unc-54* 3'UTR

pPD 118.33 (Addgene Plasmid: 1596) zur Expression in *C. elegans* mit GFP-Reporter gen und *myo-2*-Promotor und *unc-54* 3'UTR

Addgene, Cambridge, USA

pBK 3.1 (Wang et al., 2001) ist abgeleitet von pRM248 (Nonet et al., 1993) und enthält einen Neuronen-spezifischen Synaptobrevin (*snb-1*)-Promotor von *C. elegans*

pBK 4.1 (Wang et al., 2001) ist abgeleitet von pPD96.52 und enthält den Muskel-spezifischen Myosin (*myo-3*)-Promotor von *C. elegans*

pRF4 (*rol-6*(su1006)) zur Expression in *C. elegans* (Mello et al., 1991), 4 kb *rol-6* Gen von *C. elegans* im Bluescribe Vektor (Stratagene)

pC1 (*pha-1*(wt)) zur Expression in *C. elegans* (Granato et al., 1994), pC1 von Promega

pCR[®] 4 Topo[®]

Invitrogen, Karlsruhe

3.11 *C. elegans*-Stämme

Bristol N2 (*Caenorhabditis* Genetics Centre, Minnesota)

XA3749 *lat-2*(tm463) *lat-1*(ok1465) Doppelknockout (*Caenorhabditis* Genetics Centre, Minnesota)

NM1968 *slo-1*(js379) (Wang, 2001)

pha-1 (*Caenorhabditis* Genetics Centre, Minnesota)

3. 12 Haltung und Gewinnung der verwendeten Nematoden

3.12.1 *Ancylostoma caninum*

Nematodenfreie, etwa 3 Monate alte Beagle wurden mit je 400-500 L3 von *A. caninum* (Stamm Hannover) oral infiziert. Nach einer Präpatenzzeit von etwa 3 Wochen wurde der Kot der Tiere täglich gesammelt, und zur Stammhaltung der Parasiten Larven aufgereinigt. Diese wurden bei 4 °C in Schraubdeckeldosen in Leitungswasser gelagert.

3.12.1.1 Gewinnung und Aufreinigung der Larven

Der Kot der Hunde wurde gesammelt, mit Sägespänen und Kohle zu einer lockeren, feuchten Masse vermischt, in Gläser gefüllt und bei 25 °C und 70-80 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Gewinnung von ersten bzw. zweiten Larven wurden die Gläser nach zwei Tagen bis zum Rand mit Leitungswasser aufgefüllt, mit einer Glaspetrischale abgedeckt und umgedreht bei Raumtemperatur 12-16 h inkubiert. Während dieser Zeit wandern die Larven in die Petrischale aus, wo sie dann mit einer Pipette abgesaugt werden können. Um die Larven von groben Kotresten zu reinigen, wurden sie nochmals 12-16 h über einen Baermann-Trichter aufgereinigt. Dazu wurde ein Sieb aus je vier Lagen groben Zellstoffs und zwei Lagen Mulltuch verwendet, dies auf einen Plastiktrichter gelegt, der mit einer Klemme am Auslass verschlossen wurde. Die Larven wurden dann über das Sieb gegossen und mit Leitungswasser bis zum Siebrand aufgefüllt. Nach 12-16 h waren die Larven durch das Sieb gewandert und befanden sich vor der Verschlussklemme. Dort wurden sie durch kurzes Öffnen der Klemme in einem Becherglas aufgefangen. Zur Gewinnung infektiöser dritter Larven wurde die Inkubationszeit bei 25 °C auf sieben Tage erweitert, der weitere Ablauf war identisch. Im Folgenden wurden die Larven mikroskopisch auf Stadien- und Artenreinheit überprüft und gezählt. Dazu wurden jeweils 12 mal 10 µl Larvensuspension ausgezählt, der jeweils höchste und niedrigste Wert wurde gestrichen und aus den verbleibenden Werten der Mittelwert gebildet. Die Larven wurden zu je 5000 in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, bei 16.000 × g zentrifugiert, einmal mit DEPC-Bidest gewaschen und schließlich in 250 µl GIT-Puffer bei -80 °C eingefroren.

3.12.1.2 Gewinnung und Aufreinigung der Eier

Zur Gewinnung von Eiern wurde der Kot experimentell mit *A. caninum* infizierter Hunde mit Leitungswasser versetzt und zu einem dickflüssigen Brei homogenisiert. Dieser wurde dann über einem 200 µm Sieb gespült, um grobe Kotpartikel zu entfernen. Das Filtrat wurde aufgefangen und über einem 25 µm Sieb gespült. Der Inhalt des Siebes wurde in Zentrifugenbecher überführt und für 5 min bei 380 × *g* zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Becher mit gesättigter Kochsalzlösung aufgefüllt und erneut für 5 min bei 170 × *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde mit den an der Oberfläche flotierenden Eiern über einem 25 µm Sieb mit Leitungswasser gespült und die Eier mit wenig Wasser in ein 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Um die Eier zusätzlich von feinsten Kotpartikeln zu trennen, wurden sie mittels eines Zuckergradienten aufgereinigt. Hierzu wurden in einem 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß jeweils 10 ml verschiedene mit Lebensmittelfarbe gefärbte Zuckerlösungen von 10 % (grün), 25 % (rot) und 60 % (blau) vorsichtig untereinander geschichtet. Dann wurden 10-15 ml der Eisuspension vorsichtig auf den Zuckergradienten pipettiert und die Gefäße für 5 min bei 380 × *g* zentrifugiert. Die Eier sammelten sich zwischen der 10 % und der 25 % Phase, während die Kotpartikel zu Boden gesunken waren. Die Eier wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen und über einem 25 µm Sieb mit Leitungswasser gespült, um den Zucker auszuwaschen. Danach wurden sie in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 16.000 × *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Eier einmal mit DEPC-Bidest gewaschen. Die Eier wurden gezählt (wie in Abschnitt 3.12.1.1 für die Larven beschrieben) und zu je 5000 in GIT-Puffer in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen bei -80 °C eingefroren.

3.12.1.3 Gewinnung adulter *A. caninum*

Um adulte Nematoden zu gewinnen, wurden jeweils zwei infizierte Beagle mit je 4 mg/kg KG Arecolin Bromid (Arecolin) in wässriger Lösung oral behandelt. Arecolin ist ein pflanzliches Alkaloid, das früher bei Hunden zur Behandlung gegen Cestoden eingesetzt wurde, wegen seiner starken Nebenwirkungen heute aber nicht mehr verwendet wird. Es hat eine parasymphomimetische Wirkung, wodurch die Darmperistaltik erhöht wird. Dies hat eine Austreibung der paralysierten Nematoden zur Folge.

Nach etwa einer halben Stunde zeigten die Hunde eine schleimige, zum Teil blutige Diarrhoe. Die Ausscheidungen wurden über einen Zeitraum von 6-8 h etwa alle 30-60 min gesammelt und über einem 100 µm Sieb mit Leitungswasser gewaschen. Die adulten Nematoden wurden mit einer Pinzette abgesammelt und in eiskalter physiologischer NaCl-Lösung aufbewahrt. Anschließend wurden die Würmer nach Geschlecht differenziert und einzeln oder zu je 10 Tieren in GIT-Puffer oder trocken bei -80 °C eingefroren.

3.12.2 Haltung von *C. elegans*

Die Versuche mit *C. elegans* wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Lindy Holden-Dye, der Abteilung Neurowissenschaften der Biological School der Universität von Southampton, Großbritannien, durchgeführt. Die verwendeten Stämme wurden auf NGM-Agarplatten (Petrischalen Ø 2,5 cm) gehalten, *E. coli* OP50 diente als Nahrung. Die Platten wurden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, mit Parafilm® abgedichtet. Die Würmer wurden im Inkubator bei 20 °C gehalten oder außerhalb, bei RT, die aber 25 °C nicht überstieg. Im Abstand von 2-3 Tagen wurden die Stämme auf frische Platten überführt, hierzu wurden jeweils sterile Präpariernadeln, Platindrähte oder Skalpellklingen verwendet, um entweder einzelne Würmer zu übertragen oder ganze Agarstücke mit Wurmern auf eine neue Platte zu überführen.

3.13 Nukleinsäureisolierung

3.13.1 DNA-Isolierung

Für die Isolierung von genomischer DNA wurde für einen Ansatz je ein männlicher und ein weiblicher Nematode verwendet. Die zuvor bei -80 °C trocken eingefrorenen Würmer wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 100 µl Homogenisierungspuffer versetzt und für 10 min bei -20 °C eingefroren. Dann wurden sie mit einem Mikropistill homogenisiert, mit 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und für ca. eine Stunde bei 55 °C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Phenol-Chloroform zugesetzt, der Ansatz gründlich gemischt und für 10 min bei RT und 16.000 × g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 10 µl 5 M NH₄-Acetat und 300 µl Ethanol (98 %, eiskalt) versetzt, vorsichtig gemischt und bei -20 °C für 12-16 h eingefroren, um die DNA zu fällen. Der Ansatz wurde anschließend für 1 Stunde bei 4 °C und 16.000 × g zentrifugiert und das Pellet zweimal mit kaltem Ethanol (70 %) gewaschen (je 5 min Zentrifugation mit

16.000 × *g* für 5 min). Abschließend wurde das Pellet an der Luft getrocknet, in 50-200 µl Aqua bidest. resuspendiert und bei -20 °C eingefroren.

3.13.2 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde das Trizol[®]-Reagenz von Invitrogen verwendet. Die entsprechende, in GIT-Puffer eingefrorene Probe des Parasiten wurde auf Eis aufgetaut und die Isolierung nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol erfolgte in Abwandlung des Protokolls dreimal, da somit die Reinheit der RNA erhöht werden konnte. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in 10-12 µl DEPC-Aqua bidest. resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

3.14.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Über die Messung der optische Dichte (OD) kann die Menge an DNA oder RNA in einer Probe bestimmt werden. Alle Nukleinsäuren absorbieren bei 260 nm. Die OD einer DNA-Lösung mit 50 µg/ml beträgt bei 260 nm 1, worüber dann die Konzentration der Probe mit folgender Formel bestimmt werden kann:

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

Für RNA gilt bei einer Konzentration von 40 µg/ml bei 260 nm ebenfalls eine OD von 1, womit sich die Formel lediglich um diesen Faktor ändert. Die Messung der optischen Dichte wird bei 230 nm, 260 nm und 280 nm vorgenommen. Wobei das Verhältnis der OD_{260} zu OD_{280} die Verunreinigung mit Protein bewertet und das Verhältnis der OD_{260} zu OD_{230} Hinweise auf den Grad des Salzgehaltes in der Probe gibt. Für reine DNA liegt der Wert für die $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ Ratio zwischen 1,8 und 2,0, für RNA bei 1,8 und 2,1. Die $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ Ratio sollte bei 2,0 liegen. Ein hoher Salzgehalt sowie der pH-Wert der Probe kann die Messung beeinflussen. Für Anwendungen wie z. B. den Southern Blot und die Erstellung einer Genome Walk Bank ist es notwendig möglichst ungescherte, nicht degradierte DNA zu verwenden. Zur Überprüfung der Integrität wurden 2 µl der DNA-Probe mit 2 µl 6 × Ladungspuffer vermischt, auf ein 0,5 % Agarosegel aufgetragen und bei 2-4 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Nicht oder wenig gescherte DNA ergibt eine einzelne Bande zwischen 25 und 100 kb, degradierte DNA stellt sich als unspezifisches Signal in der gesamten

Spur dar. Die Intaktheit der RNA wurde nicht gelelektrophoretisch überprüft, da hierfür zu wenig Ausgangsmaterial vorhanden war.

3.14 cDNA-Synthese

Um kodierende Sequenzen eines Gens zu ermitteln, wird in der PCR cDNA eingesetzt, die keine Introns enthält. Diese komplementäre DNA wird mittels der Reversen Transkriptase aus einem RNA Molekül synthetisiert. Reverse Transkriptasen sind Enzyme aus Retroviren, die in der Lage sind, RNA in die entsprechende cDNA-Sequenz umzuschreiben. Dazu wird in der Regel ein oligo-dT-Adapterprimer eingesetzt der als Startpunkt für die Synthese dient und am polyadenylierten 3'-Ende des mRNA-Moleküls bindet. In den zwei in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur cDNA-Synthese wurde jeweils eine Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV-RT) eingesetzt.

3.14.1 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit

Die **R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds (RACE) ermöglicht die Verlängerung einer Sequenz in 3'- bzw. 5'-Richtung. Dazu wird bei der cDNA Synthese durch die Reverse Transkriptase das 5'-Ende der Sequenz mit einer Adaptersequenz versehen, für die dann für die PCR spezifische Primer eingesetzt werden können. Die Synthese der 3'-cDNA erfolgt über einen Oligo(dT)-Primer, der außerdem noch einen Sequenzbereich aus der 5'-Adaptersequenz enthält. Dies ermöglicht den Einsatz des gleichen Universal-Adapterprimers sowohl in der 5'- als auch in der 3'-Reaktion. Somit kann die vollständige kodierende Sequenz amplifiziert werden. Die Synthese der cDNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die cDNA wurde sowohl für konventionelle PCR als auch für RACE verwendet.

3.15 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)

Mit der PCR lassen sich spezifisch DNA Fragmente vervielfältigen. Zunächst wird bei einer Temperatur von 94 °C der DNA-Doppelstrang denaturiert, das heißt, in seine beiden Einzelstränge getrennt. Dieser Schritt kann je nach Probe ca. 5-120 s in Anspruch nehmen. Im Folgenden wird bei einer niedrigeren Temperatur ein spezifisches kurzes Oligonukleotid (Primer) angelagert. Die optimale Temperatur ergibt sich aus der Primersequenz und den chemischen Bedingungen in der

Reaktionslösung, sie liegt im Allgemeinen zwischen 50 °C und 65 °C. Die Anlagerung erfolgt je nach Primerspezifität in 10-60 s. Anschließend erfolgt, ausgehend von der Primeranlagerungsstelle, die Verlängerung des komplementären DNA Fragments, so dass ein neuer Doppelstrang entsteht. Die Länge dieses Schrittes ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Als Faustregel gilt: Für 1000 bp werden etwa 1 min benötigt. Die genannten drei Schritte werden bis zu 45 Mal wiederholt, so dass am Ende das gewünschte DNA Fragment in größerer Menge vorliegt. Je nach Ausgangsmaterial, Salzgehalt und pH-Wert der Reaktionslösung ergeben sich andere Temperatur- und Zeitprofile. Für die konventionelle PCR wurde der BD Advantage[®] 2 Polymerase Mix verwendet. Die Durchführung erfolgte mit 0,2 µl Polymerase Mix pro 25 µl Ansatz, ansonsten nach Angaben des Herstellers.

3.15.1 Primer

Die Auswahl der Primer für die RACE, Genome Walk und konventionelle PCR erfolgte mit Hilfe des im Internet frei verfügbaren Programmes Primer 3 (Rozen und Skaletsky, 2000). Primer und Sonden für die quantitative real-time PCR wurden mit dem Programm Primer Express[®] (Applied Biosystems) ausgewählt.

3.15.2 RACE

Für die RACE wurde ebenfalls der BD Advantage[®] 2 Polymerase Mix verwendet. Zudem wurde der Universalprimer Mix (UPM) von BD Clontech[®] zur Anlagerung an das 3'- bzw. 5'-Ende der cDNA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte in Abwandlung der Herstellerangaben mit 0,2 µl Polymerase Mix pro 25 µl Ansatz.

3.16 Quantitative real-time PCR

Mittels der quantitativen real-time PCR sollten mögliche Unterschiede in der Transkription des Dapsiphilins von *A. caninum* in verschiedenen Entwicklungsstadien aufgedeckt werden. Als Referenzgene für die Normalisierung wurden die 18S ribosomale RNA (18S rRNA), sowie das 60S acidic ribosomal protein (60S arp) eingesetzt. Letzteres war für *A. caninum* bereits als geeignetes Referenzgen ermittelt worden (siehe Abschnitt 2.6.3). Mittels konventioneller PCR wurden für 18S rRNA, 60S arp und Dapsiphilin jeweils die Fragmente amplifiziert, die auch in der real-time PCR amplifiziert werden sollten. Tabelle 2 zeigt die verwendeten Primer, die

korrespondierenden Produktgrößen, sowie die eingesetzten Sonden. Die Produkte wurden wie beschrieben kloniert und Plasmid-DNA wurde aufgereinigt. Für jedes Experiment der real-time PCR wurde jeweils eine Verdünnungsreihe der entsprechenden Plasmid-DNA von 10^2 - 10^7 Kopien/ μ l cDNA mitgeführt.

Primer	Sequenz 5' – 3'	Produktgröße
Ac 18S Q fw	5' – TTT AAT ATA CGC TAT TGG AGC TGG AA – 3'	69 bp
Ac 18S Q rev	5' – GAG GAT CTA TTG GAG GGC AAG TC – 3'	
Ac 60S fw	5' – TCG GAA TCG TCG GAA AGT ACG – 3'	143 bp
Ac 60S rev	5' – CCA GAT GCC AAC AGC TTT GC – 3'	
Ac depsi fw	5' – CGC AAG TGT TCC ACC ACA GG – 3'	150 bp
Ac depsi rv	5' – ACG AAC CGC CAT CAG AAT ACG – 3'	

Tab. 2: In der real-time PCR verwendete Primer

3.16.1 RNA-Isolierung für die real-time PCR

Die Isolierung der RNA erfolgte nach dem unter Abschnitt 3.13.2 beschriebenen, abgewandelten Trizol[®]-Protokoll. Es wurden jeweils dreimal zehn adulte Männchen, zehn adulte Weibchen, 3000 erste/zweite und dritte Larven und 5000 Eier in der Isolierung eingesetzt. Das Pellet wurde mit 1 μ l RNasin[®] Plus RNase Inhibitor (Promega) versetzt und anschließend mit 1 μ l 10 x DNase Puffer und 0,5 μ l RQ 1 DNase (beides Promega) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde 1 μ l Stop Solution (Promega) hinzugefügt und die Reaktion für 10 min bei 65°C abgestoppt. Die RNA wurde auf Eis überführt und die Konzentration mittels Absorption im Nanodrop-Photometer gemessen.

3.16.2 cDNA-Synthese für die real-time PCR

In die cDNA-Synthese wurde jeweils 1 μ g RNA eingesetzt. Es wurden jeweils der Oligo(dT)₂₀-Primer (Invitrogen) sowie genspezifische Primer verwendet. Die Synthese erfolgte für das zu untersuchende Gen Depsiphilin, sowie für die beiden Referenzgene 18 S rRNA und 60 S arp. Zu 1 μ g Gesamt RNA in einem Volumen von 9,5 μ l DEPC-Bidest wurden 1 μ l Oligo (dT)₂₀-Primer, 1 μ l Ac 18 S Q rv Primer, 1 μ l Ac 60 S rv Primer, 1 μ l Ac depsi rv Primer und 1 μ l dNTP - Mix (10 mM) zugefügt. Anschließend wurde der Ansatz bei 70 °C für 7 min inkubiert und dann für 2 min auf

Eis abgekühlt. Die Probe wurde kurz zentrifugiert, 4 µl 5 × First Strand Puffer, 1 µl DTT (0,1 M) und 0,5 µl SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) wurden zugefügt und anschließend bei 55 °C für 60 min inkubiert. Die Synthese wurde mit einer Inkubation von 10 min bei 72 °C abgeschlossen. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

3.16.3 Durchführung der real-time PCR

Für jedes Experiment der real-time PCR wurden sowohl für die Referenzgene, als auch für das Zielgen Dpsiphilin Verdünnungsreihen von 10^2 - 10^7 Kopien/µl cDNA mitgeführt. Als Grundlage diente Plasmid-DNA des jeweiligen Fragments. Die Verdünnungsreihen dienten dazu, Standardkurven für jedes Gen zu erhalten, mittels derer absolute Kopienzahlen der in den Proben untersuchten Genen bestimmt werden konnten. Außerdem konnten so die Effizienzen der PCR ermittelt werden, die idealerweise zwischen 90 und 100 % liegen soll. Die verwendeten Sonden wurden mit dem Programm Primer Express®-Software der Firma Applied Biosystems erstellt und sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Sonde	Sequenz	Schmelztemperatur
Ac 18S	5'-FAM-TAC CGC GGC TGC TGG CAC C-TAMRA-3'	65,0 °C
Ac 60S	5'-FAM-ACC CGA TAC GGT GCG TCT TTG CGT-TAMRA-3'	67,9 °C
Ac Dpsiphilin	5'-FAM-ACT TCT CGC CAC CGC CGC CAC-TAMRA-3'	68,3 °C

Tab. 3: In der real-time PCR verwendete Sonden

Für die Reaktion wurde der Brilliant® QPCR MasterMix (Stratagene) verwendet. Reaktionsansatz und Temperaturprofil sind im Folgenden aufgeführt:

25 µl Ansatz:

- 12,50 µl Brilliant® MasterMix
- 0,75 µl Vorwärtsprimer (10 µM)
- 0,75 µl Rückwärtsprimer (10 µM)
- 0,05 µl Sonde (100 µM)
- 0,75 µl Referenzfarbstoff ROX (2µM)

Temperaturprofil:

- 95°C 10 min
 - 95°C 30 sec
 - 57°C 1 min
 - 72°C 30 sec
- } 40 Zyklen

3.17 Genome Walk

Um auf Basis von genomischer DNA von bereits bekannten in unbekannte Bereiche hinein zu amplifizieren, wurde das Genome Walker™ Kit (BD Clontech) verwendet. Dies diente insbesondere dazu, die genomische Sequenz des Depsiphilins von *A. caninum*, sowie mögliche Promotorregionen von Depsiphilin und *slo-1* zu amplifizieren. Voraussetzung ist intakte, möglichst nicht degradierte genomische DNA. Die DNA-Isolierung erfolgte wie unter Abschnitt 3.13.1 beschrieben. Genomische DNA wurde in vier unterschiedlichen Ansätzen mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Anschließend wurden an die geschnittenen Enden Adaptersequenzen angehängt, die in der PCR als Erkennungssequenz für entsprechende Adapterprimer dienen. Für die bereits bekannte Sequenz wurden spezifische Primer entworfen, die dann in der PCR in Kombination mit dem Adapterprimer Amplifikate von bisher unbekanntem Bereichen ermöglichen. Durch die vier Ansätze wurde eine Überlappung der amplifizierten Fragmente erreicht, und somit die größtmögliche Größe eines Amplifikats gewonnen. Die Herstellung der Genome Walk Bank und die entsprechenden PCRs erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte wie unter Abschnitt 3.18 beschrieben.

3.18 Analyse der PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden je nach erwarteter Größe auf 0,5 %, 1 % oder 2 % TAE-Agarosegelen analysiert. Als Nukleinsäurefarbstoff wurde GelStar[®] (Cambrex) nach Herstellerangaben (1µl/10ml Agarose) verwendet. Die PCR-Produkte wurden bei etwa 2-4 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt und mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm analysiert.

3.19 Isolierung von Banden aus Agarosegelen

Um die gewünschte Bande aus dem Agarosegel zu isolieren, wurde sie unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend bei 16.000 × *g* für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vom restlichen Gel abgenommen und sofort in die Klonierung eingesetzt.

3.20 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde der Vektor pCR4[®]-TOPO[®] (Invitrogen) verwendet. Eine Voraussetzung für die Verwendung dieses Vektors ist die Durchführung der PCR mit einer *Taq*-Polymerase, die sogenannte *sticky ends*, also A-Überhänge an den 3'-Enden der PCR-Produkte produziert. Die Ligation erfolgt dann an den am Vektor befindlichen T- oder U-Überhängen und wird durch die Topoisomerase katalysiert, die kovalent am Vektor gebunden ist.

3.20.1 Ligation

Für die Ligation wurde der TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen) verwendet. Die Anwendung folgte den Herstellerangaben. Es wurden 4 µl PCR-Produkt eingesetzt, 1 µl Salzlösung und 1 µl Vektor. Der Ansatz wurde für 5-15 min bei RT inkubiert.

3.20.2 Transformation in One Shot[®] TOP10 chemisch kompetente Zellen (Invitrogen)

Die kompetenten Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut, dann wurde der gesamte Ligationsansatz hinzugefügt und die Probe auf Eis 5-15 min inkubiert. Für die Transformation wurden die Zellen abschließend für 30 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Daraufhin wurde der Ansatz mit 37 °C warmen SOC-

Medium (Invitrogen) versetzt und bei 37 °C und 200 rpm für 1 h im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden ca. 100 µl und 150 µl der Bakterienkultur auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.20.3 Transformation in JM 109 kompetente Zellen (Stratagene)

Je nach PCR-Produkt erfolgte die Transformation in JM 109 kompetente Zellen (Stratagene). Der Ablauf ist identisch mit Abschnitt 3.20.2

3.20.4 Transformation in XL10-Gold kompetente Zellen (Stratagene)

Alle Konstrukte zur Expression in *C. elegans* wurden in XL10-Gold kompetenten Zellen (Stratagene) transformiert. Die Transformation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.20.5 Bakterienkulturen

Von den Nährplatten wurden jeweils einzelne Kolonien mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in ein LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht im Wärmeschrank inkubiert. Je nach gewünschter Menge wurde eine 5 ml oder 50 ml Kultur angesetzt.

3.20.6 Antibiotika

Abhängig vom Resistenzgen des Vektors wurden als Antibiotika Kanamycin oder Carbenicillin (jeweils 50 µg/ml Medium oder Agar) eingesetzt. Carbenicillin wurde anstelle von Ampicillin verwendet. Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein β-Lactam Antibiotikum, welches aber eine höhere Stabilität aufweist.

3.20.7 Glycerolstocks

Um für weitere Verwendungen Bakterienkulturen zu lagern, wurden jeweils 250 µl der Kultur mit 250 µl Glycerollösung vermischt und bei -20 °C eingefroren. Bei Bedarf wurden 50 µl entnommen und in eine 50 ml LB-Flüssigkultur überführt.

3.21 Plasmidpräparation

3.21.1 Miniprep

Zur Präparation wurde der NucleoSpin® Plasmid-Kit (Macherey&Nagel) verwendet. Zunächst wurden die 5 ml LB-Kulturen für 20 min bei $1550 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Präparation erfolgte dann nach Angaben des Herstellers, mit der Ausnahme, dass die Elution mit Aqua bidest durchgeführt wurde.

3.21.2 Midiprep

Die Plasmidpräparation von 50 ml Kulturen erfolgte mit dem Nucleobond® Ax-100-Kit (Macherey&Nagel). Die Kulturen wurden analog zu Abschnitt 3.21.1 zentrifugiert, die Präparation folgte den Angaben des Herstellers. Das Pellet wurde in 50 µl Aqua bidest. resuspendiert.

3.21.3 Kontrolle und Darstellung des Inserts

Um das Vorhandensein des gewünschten Inserts zu überprüfen, wurde ein Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* durchgeführt, da der Vektor pCR®4TOPO® zwei das Insert flankierende *EcoRI*-Schnittstellen in der multiple cloning site aufweist. Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

- 16,5 µl autoklaviertes Aqua bidest.
- 2,0 µl 10 × Puffer (Fermentas)
- 0,5 µl *EcoRI* (12 U/µl , Fermentas)
- 1,0 µl Plasmid-DNA

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt 3.18) analysiert. Die Menge der isolierten Plasmid-DNA wurde, wie in Abschnitt 3.13.3 beschrieben, mit dem Nanodrop-Photometer bestimmt.

3.21.4 Sequenzierung und Analyse der Sequenzen

Die Sequenzierung der Amplifikate wurde von der Firma SeqLab Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Die Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm Align® Plus 4.0 bearbeitet. Des Weiteren wurde die Datenbank der NCBI

mit Hilfe des BLAST (**b**asic **l**ocal **a**lignment **s**earch **t**ool) zur Analyse von Identitäten zu bereits bekannten Genen verwendet.

3.22 Southern Blot

Mittels des Southern Blot kann über eine Sonde das Vorhandensein einer bestimmten Sequenz im Genom eines Organismus nachgewiesen werden. Um zu ermitteln, ob im Genom von *A. caninum* eine Latrophilin-ähnliche Sequenz vorkommt, wurde auf Basis eines Teilstücks der Transmembranregion von Hc110-R mittels konventioneller PCR eine Digoxigenin (DIG)-markierte Sonde hergestellt, zur Markierung wurden DIG-markierte dNTPs (ROCHE) verwendet. Diese Region wurde wegen ihrer Konserviertheit innerhalb der Gruppe der Latrophilin-ähnlichen Proteine ausgewählt. Das Fragment war 404 bp lang und umfasste den Bereich der Transmembranhelices 5 bis 7. Sequenz und Lage der Sonde, sowie die Lage der entsprechenden Primer sind in Abbildung 4 dargestellt. Nach der gelelektrophoretischen Überprüfung des PCR-Produkts wurde es mittels Microcon[®]-Säulen (Millipore) aufgereinigt, um kleinere Nukleotide und Enzyme zu entfernen.

Genomische DNA von *A. caninum* wurde wie unter Abschnitt 3.13.1 beschrieben isoliert. Es folgte ein Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI*. Hierfür wurden ca. 3 µg DNA eingesetzt. Der Verdau erfolgte für 12 h. Anschließend wurde die geschnittene DNA auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und bei 2-4 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente der DIG-markierte DNA Molecular Weight Marker III von Roche.

Die folgenden Schritte folgten dem Southern Blot Protokoll *des* DIG Application Manual for Filter Hybridization der Firma Roche, die verwendeten Lösungen entstammten dem Roche DIG Hybridization Kit.

Für die Hybridisierung wurden 20 ml DIG Easy Hyb Hybridisierungspuffer eingesetzt, es wurden 2 µl der DIG-markierten Sonde pro ml Puffer verwendet. Die Hybridisierung fand bei 42 °C über Nacht statt. Die Waschungen mit hoher Stringenz wurden mit 0,2 × SSC + 0,1 % SDS bei 62 °C durchgeführt. Es wurden die DIG-Antikörper der Firma Roche nach Herstellerangaben eingesetzt. Es wurde weiterhin eine chemilumineszente Detektionsmethode mit CSPD (Roche) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem genannten Protokoll. Abschließend wurde auf die eingeschweißte Membran in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm (Kodak) gelegt und dieser für 45 min belichtet. Der Film wurde dann für ca. 4 min in einem Entwicklerbad

(Kodak) geschwenkt, 4 min in Leitungswasser gespült und 4 min im Fixierbad (Kodak) geschwenkt. Danach wurde der Film etwa 5-10 min in Leitungswasser gespült und getrocknet.

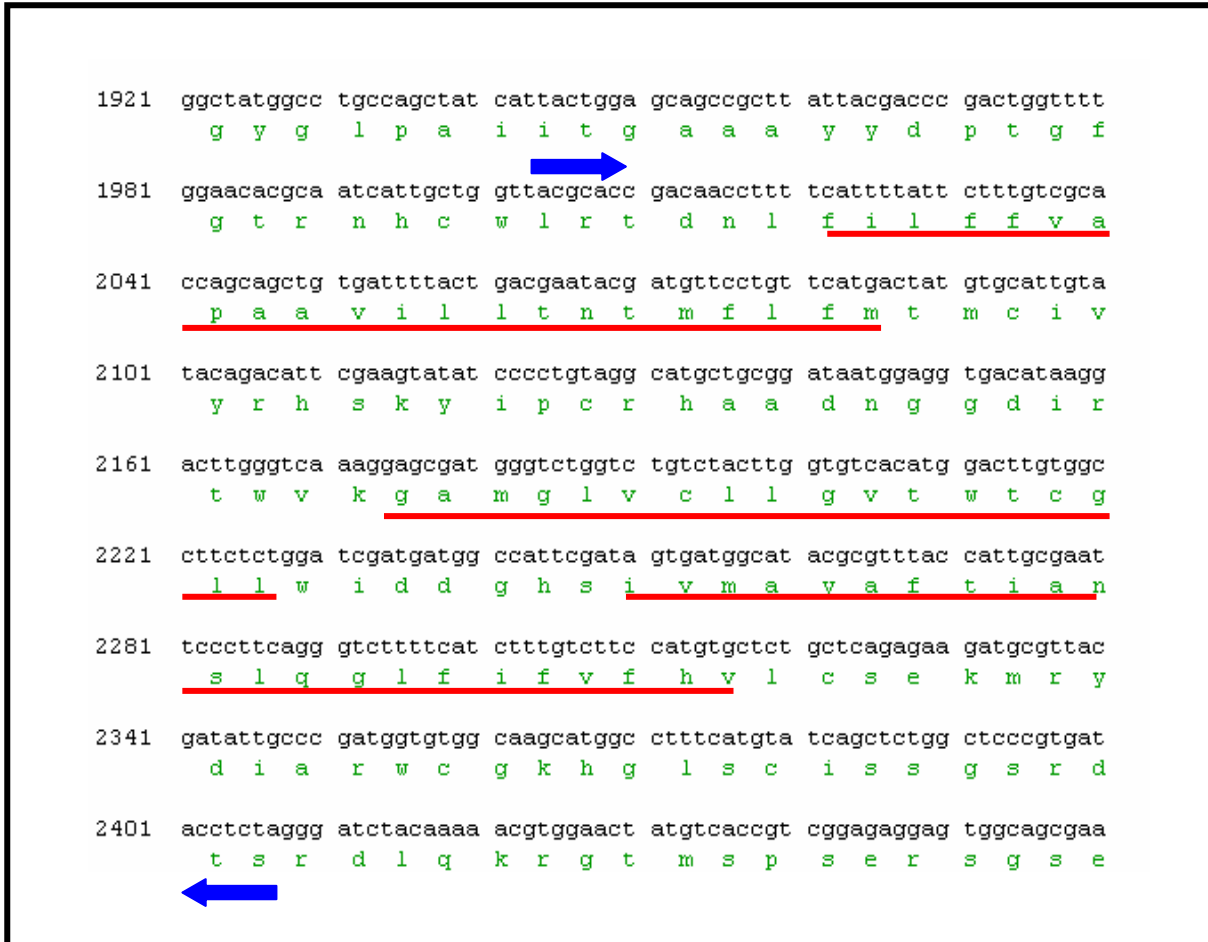


Abb. 4: Lage der Sondensequenz. Dargestellt ist ein Teilstück der kodierenden Sequenz von Hc110-R in 5'→3'-Richtung (schwarze Buchstaben), die korrespondierende **Aminosäuresequenz** ist in grünen Buchstaben darunter aufgeführt. Die **Transmembranhelices** 5 bis 7 sind rot unterstrichen. Die blauen Pfeile markieren jeweils die Lage der **Vorwärts- und Rückwärtsprimer** und umgrenzen somit die gesamte Sondensequenz.

3.23 Heterologe Expression in *Caenorhabditis elegans*

Um die Funktionalität und die Lokalisation der identifizierten Gene zu untersuchen, sollten sie in dem freilebenden Nematoden *C. elegans* exprimiert werden.

3.23.1 Heterologe Expression von *A. caninum* und *C. oncophora* Depsiphilin in *C. elegans*

Um die Funktionalität von Depsiphilin von *A. caninum* und *C. oncophora* nachzuweisen, sollten die Rezeptoren zunächst in *C. elegans* exprimiert werden und anschließend die Empfindlichkeit der Würmer gegenüber Emodepsid ermittelt werden. Hierfür wurden *lat-1/lat-2* Doppel-knockout-Mutanten von *C. elegans* (*lat-2(tm463)lat-1(ok1465)*) verwendet, die bei einer erfolgreichen funktionalen Expression des Depsiphilins der parasitischen Nematoden ihre Empfindlichkeit gegenüber Emodepsid wiedererlangen sollten. Als Vektor wurde das modifizierte Plasmid pPD30.69 (Fire Lab Vector Kit, Addgene) verwendet. Dieser enthält, als wichtige Komponenten für die Expression, anstelle des *myo-2*-Promotors eine etwa 3 kb lange Promotorregion des *lat-1* von *C. elegans*, sowie die kodierende Sequenz des Depsiphilins von *A. caninum* bzw. *C. oncophora* und die 3'UTR des *C. elegans unc-54*. Um die kodierenden Sequenzen der Depsiphiline in den Vektor zu ligieren, wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die die entsprechend notwendigen Restriktionsschnittstellen enthielten. Hierzu wurde der Vorwärtsprimer mit *Sma*I- und der Rückwärtsprimer mit *Nhe*I-Schnittstellen versehen. Eine Übersicht über den verwendeten Vektor ist in Abbildung 5 dargestellt. Die verwendeten Primer mit den entsprechenden Restriktionsenzym-schnittstellen sind im Anhang unter Abschnitt 7.4 in Tabelle 70 aufgeführt.

Die PCR-Produkte der jeweiligen kodierenden Sequenzen wurden in den pCR[®]4TOPO Vektor kloniert und in JM 109 kompetente Zellen transformiert. Das Vorhandensein des Inserts wurde sowohl mittels *Eco*RI-Restriktionsenzymverdau als auch mittels Verdau mit *Sma*I und *Nhe*I überprüft. Anschließend wurde, um eine größere Menge Plasmid-DNA zu erhalten, eine 50 ml LB-Kultur angesetzt und hiervon eine Midiprep (siehe 3.21.2) durchgeführt. Anschließend wurde sowohl der pPD30.69 Vektor als auch der, das Insert enthaltene pCR[®]4TOPO mit *Sma*I und *Nhe*I verdaut. Der Verdau erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde 1 µg Plasmid mit *Nhe*I und 1 × Tango[™] Puffer (Fermentas) für 2 h verdaut, anschließend folgte ein Verdau von 2 h mit *Sma*I und 2 × Tango[™] Puffer. Auf diese Weise wurde der

pPD30.69 direkt hinter der *lat-1* Promotorregion geschnitten und die kodierende Depsiphilin Sequenz aus dem pCR[®]4TOPO geschnitten. Die Reaktion wurde über ein 0,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande für den pPD30.69 Vektor hatte eine Größe von 3,8 kb, die Bande für die kodierende Depsiphilin Sequenz etwa 3,5 kb. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und wie in Abschnitt 3.19 angegeben zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in die Ligation eingesetzt. Die Ligationsreaktion wurde wie folgt angesetzt:

4 µl pPD30.69

4 µl Insert

1 µl T4 Ligase

1 µl Ligasepuffer

Die Ligation erfolgte bei 22 °C für 4 h. Die Reaktion wurde für 10 min bei 65 °C abgestoppt. Anschließend wurden 2 µl des Ligationsansatzes in XL10-Gold kompetente Zellen transformiert. Um zu vermeiden, dass gewählte Klone nicht den pCR[®]4TOPO Vektor enthalten, wurden diese jeweils sowohl in LB-Kulturen mit Kanamycin als auch mit Carbenicillin überführt. Der Vektor pPD30.69 enthält ein Resistenzgen für Ampicillin, nicht aber für Kanamycin, während pCR[®]4TOPO Resistenzgene für beide enthält. Es wurden nur Klone weiterverarbeitet, die in Carbenicillin nicht aber in Kanamycin gewachsen waren. Die Sequenzen der Klone wurden mittels Sequenzierung (Seqlab Laboratories) überprüft. In Abbildung 5 ist das entsprechende Ligationsschema dargestellt.

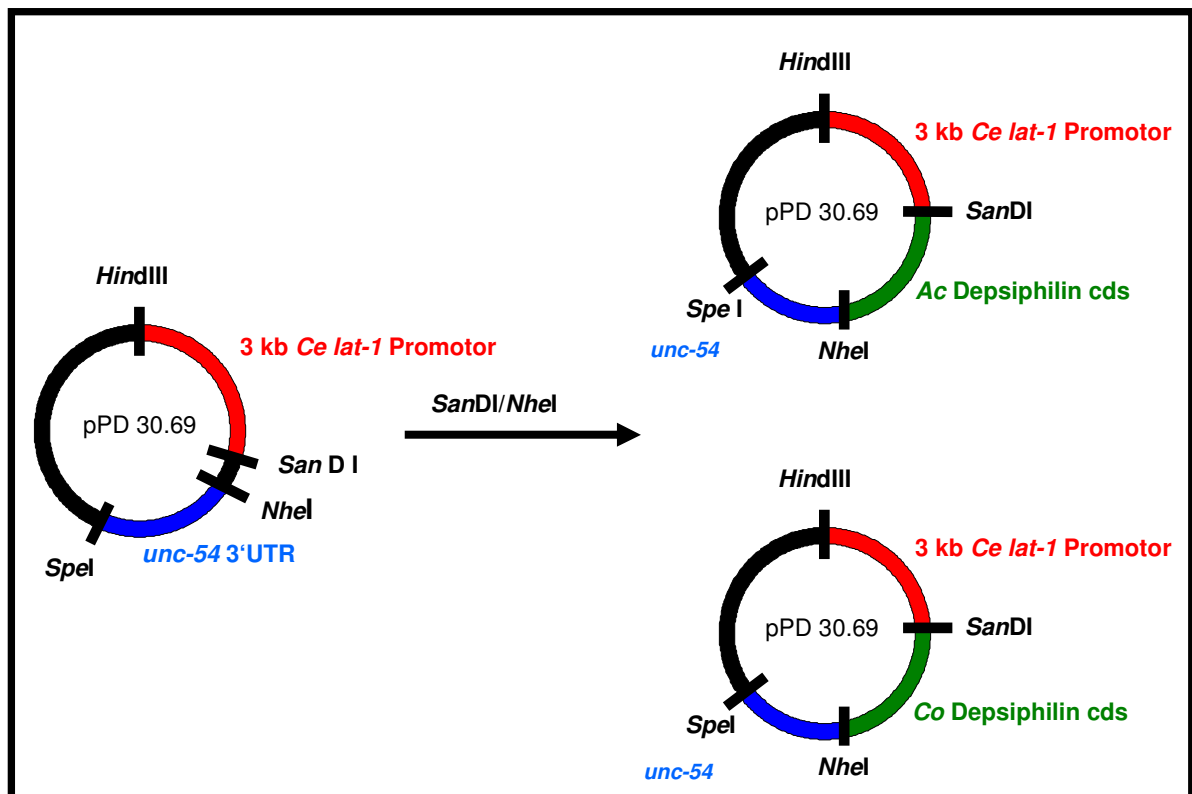


Abb. 5: Darstellung des modifizierten Vektors pPD30.69 vor und nach der Ligation der kodierenden **Depsiphilin-Sequenz** von *A. caninum* und *C. oncophora*.

3.23.2 Heterologe Expression von *A. caninum* und *C. oncophora slo-1* in *C. elegans*

Für die Expression von SLO-1 in *C. elegans* wurden Vektoren mit jeweils zwei verschiedenen Promotoren verwendet. Der Vektor pBK3.1 enthält den *snb-1*-Promotor, der zu einer Expression in Neuronen führt. Der Vektor pBK4.1 enthält einen Promotor, der zur Expression in Muskelzellen führt, *myo-3*. Die kodierenden Sequenzen von *A. caninum slo-1*, sowie *C. oncophora slo-1* wurden mittels zielgerichteter Mutagenese mit den Restriktionsenzymchnittstellen *Xba*I (Vorwärtsprimer) und *Bam*HI (Rückwärtsprimer) versehen. Die PCR-Produkte wurden analog zu Abschnitt 3.23.1 in die entsprechenden Vektoren ligiert und in XL10-Gold kompetente Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte wie in Abschnitt 3.23.1 beschrieben. Eine Übersicht über die Vektoren und das Ligationsschema ist in den Abbildungen 9 und 10 gegeben. Außerdem wurde in den Vektoren pBK3.1, die bereits die kodierenden Sequenzen von *A. caninum slo-1* und *C. oncophora slo-1* enthielten, der *snb-1*-Promotor durch eine 3 kb große, mögliche Promotorregion des *slo-1* von *C. elegans* ersetzt. Hierzu wurde zunächst auf Basis genomischer DNA von *C. elegans* ein ca. 3 kb großes Fragment stromaufwärts des Startcodons von *slo-1*

amplifiziert (*Ce slo-1* prom). Anschließend wurde durch zielgerichtete Mutagenese auf Basis der Plasmid-DNA des Ausgangsfragments Schnittstellen für *Hind*III und *Xba*I eingefügt und in pCR®4TOPO® kloniert. Folgend wurde der *snb-1*-Promotor mittels Restriktionsenzymverdau mit *Hind*III und *Xba*I aus dem Vektor geschnitten und das 3 kb Promotorfragment hinein ligiert (Ligation siehe Abschnitt 3.23.1). Hierzu war ein partieller Restriktionsenzymverdau des pCR®4TOPO Vektors, der die *slo-1*-Promotorsequenz enthielt nötig, da diese eine interne *Xba*I Schnittstelle enthielt. Dieser wurde wie folgt durchgeführt:

0,83 µl (2,5 µg) Plasmid-DNA (pCR®4TOPO® mit *Ce slo-1* prom)
10,00 µl 10 × Tango Puffer
5,00 µl *Hind*III (10U/µL)
84,17 µl ddH₂O
100,00 µl

Dieser Ansatz wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufteilung in fünf verschiedene Ansätze und Zugabe von 50 U *Xba*I nach folgendem Schema (Abbildung 6):

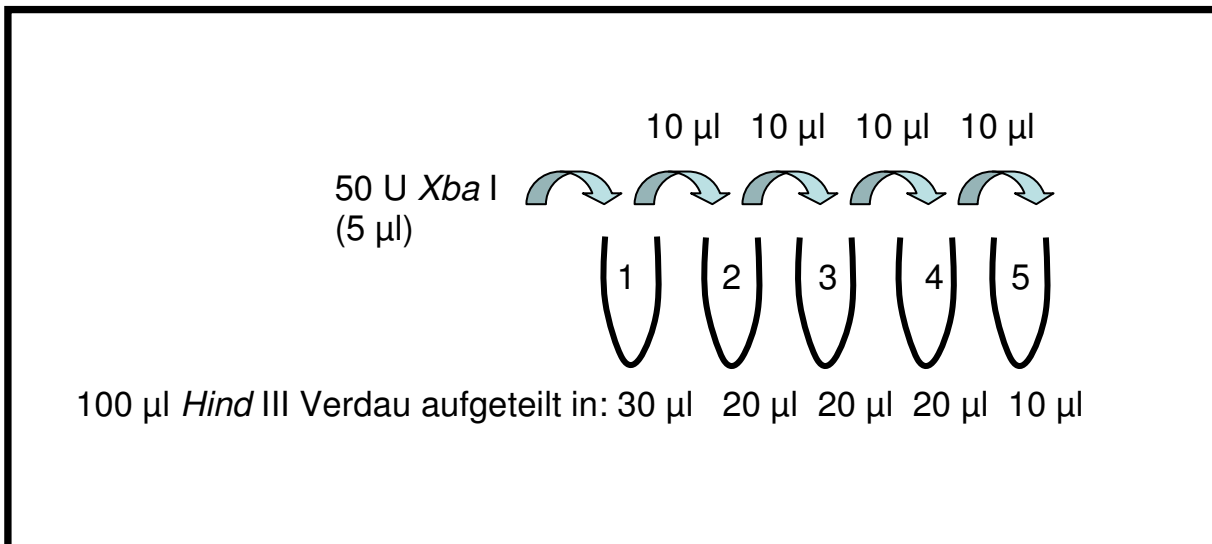


Abb. 6: Pipettierschema für den partiellen Verdau mit *Xba*I von pCR®4TOPO mit *Ce slo-1* prom *Hind*III/*Xba*I

Diese Ansätze wurden wiederum für 15 min bei 37 °C inkubiert, es folgte eine Inkubation für 15 min bei 65 °C, um die Reaktion abzustoppen. Anschließend wurden die Reaktionsansätze auf ein 0,5 % Agarosegel geladen und bei 2-4 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Aufgrund der beiden *Xba*I-Schnittstellen waren sechs

verschiedene Fragmentgrößen zu erwarten. Abbildung 7 zeigt, wie die verschiedenen Fragmente zustande kommen. Abbildung 8 zeigt ein Bild des Agarosegels, auf dem die fünf Ansätze des partiellen Restriktionsenzymverdaus aufgetrennt sind. Das Fragment von 3 kb wurde aus dem Gel ausgeschnitten und analog zu Abschnitt 3.23.1 in die entsprechenden Vektoren liegert (siehe Abbildung 11).

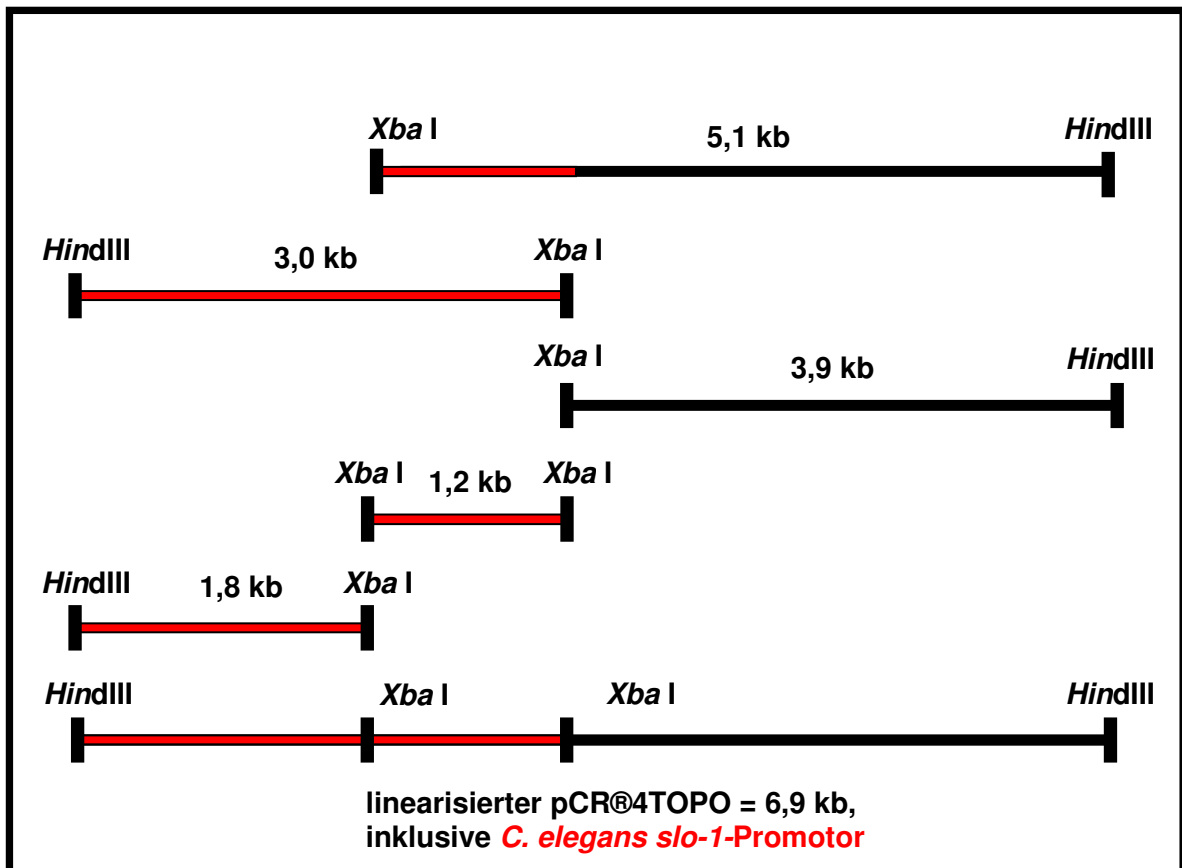


Abb. 7: Schematische Darstellung der Restriktionsenzymchnittstellen *Hind*III und *Xba*I des pCR®4TOPO mit *Ce slo-1* prom *Hind*III/*Xba*I und der möglichen Fragmentgrößen, rot bezeichnet die 3 kb Promotorsequenz von *C. elegans slo-1*, schwarz das „Gerüst“ des Vektors.

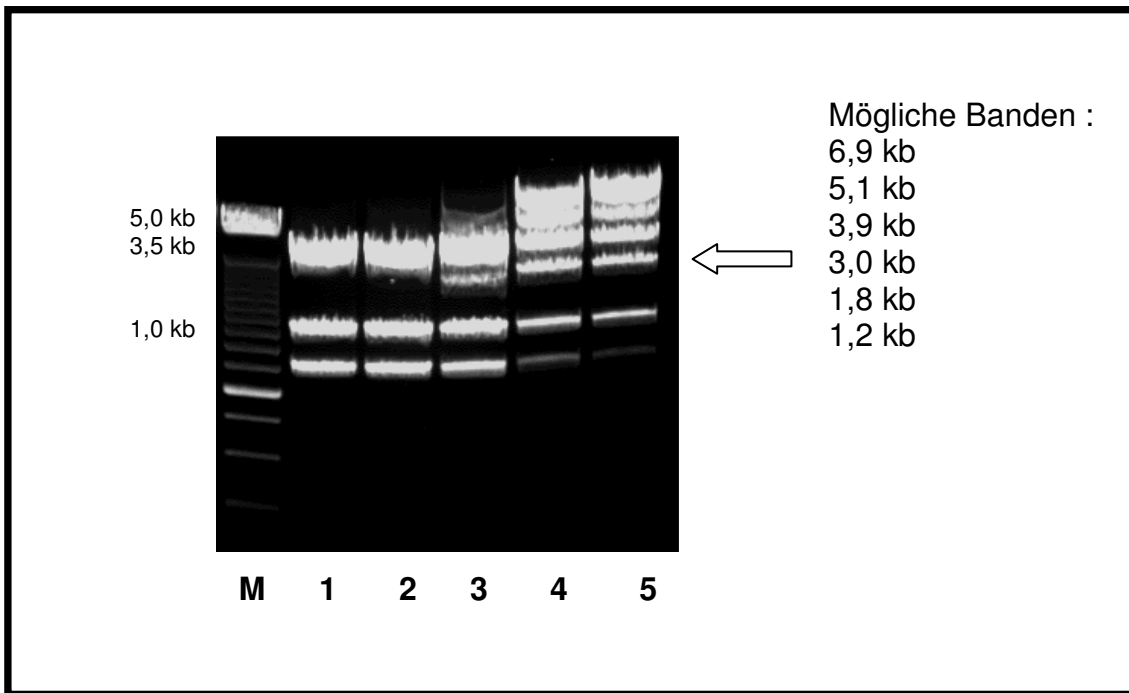


Abb. 8: 0,5 % Agarosegel mit den fünf Ansätzen des partiellen Restriktionsenzym-verdaus. M: 250 bp DNA-Marker, 1- 5 korrespondieren mit den Ansätzen 1-5 in Abb. 7. Der Pfeil weist auf die gewünschte 3 kb Bande des *Ce slo-1* prom Fragments.

Eine Übersicht über die Ligationsschemata ist in den Abbildungen 9 bis 11 gegeben.

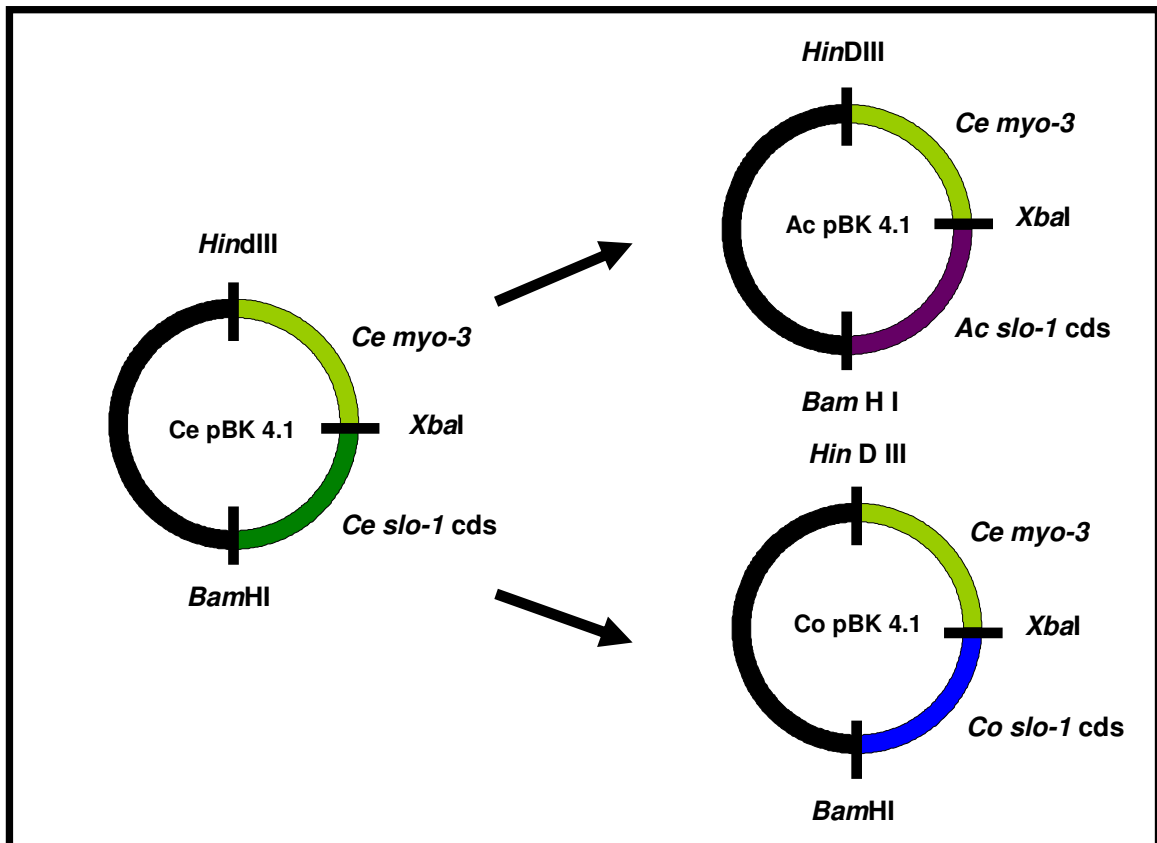


Abb. 9: Schema der Ligation der kodierenden Sequenzen von *A. caninum* *slo-1* (Ac *slo-1* cds) und *C. oncophora* *slo-1* (Co *slo-1* cds) in den Vektor Ce pBK 4.1

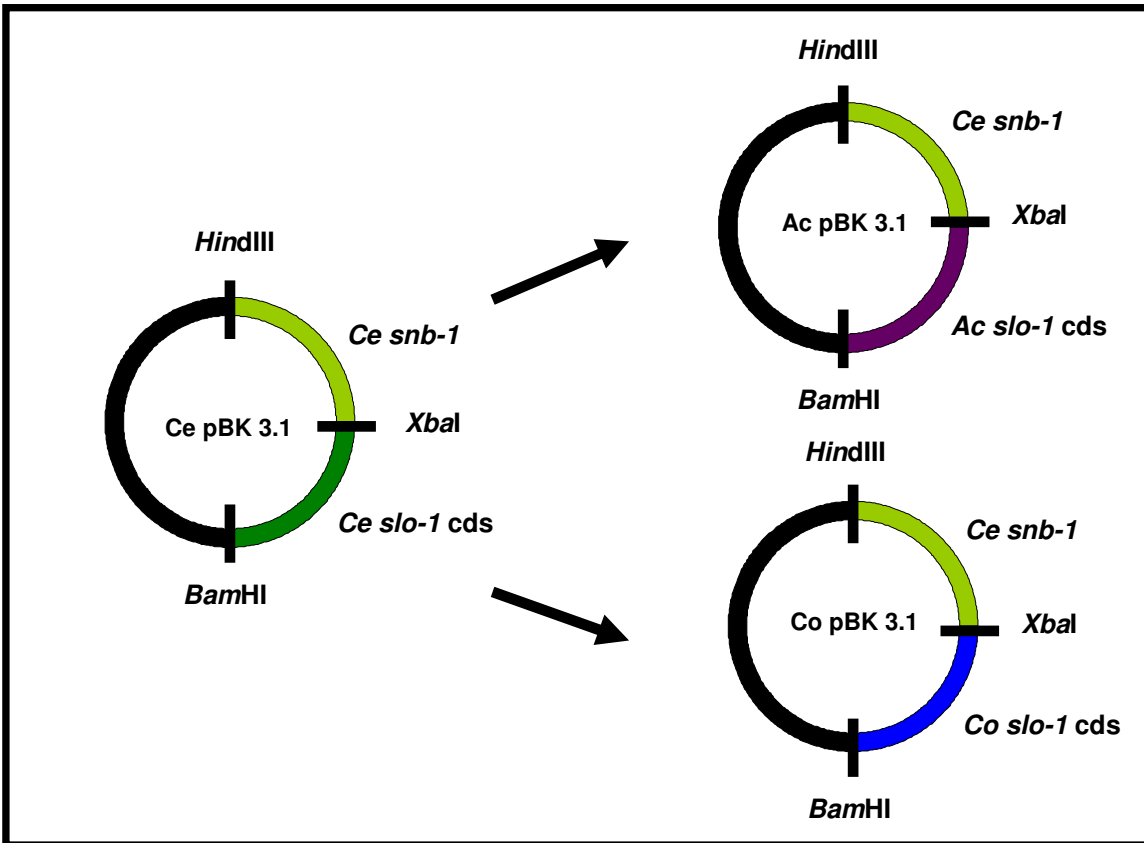


Abb. 10: Schema der Ligation der kodierenden Sequenzen von *A. caninum slo-1* (Ac *slo-1* cds) und *C. oncophora slo-1* (Co *slo-1* cds) in den Vektor Ce pBK 3.1

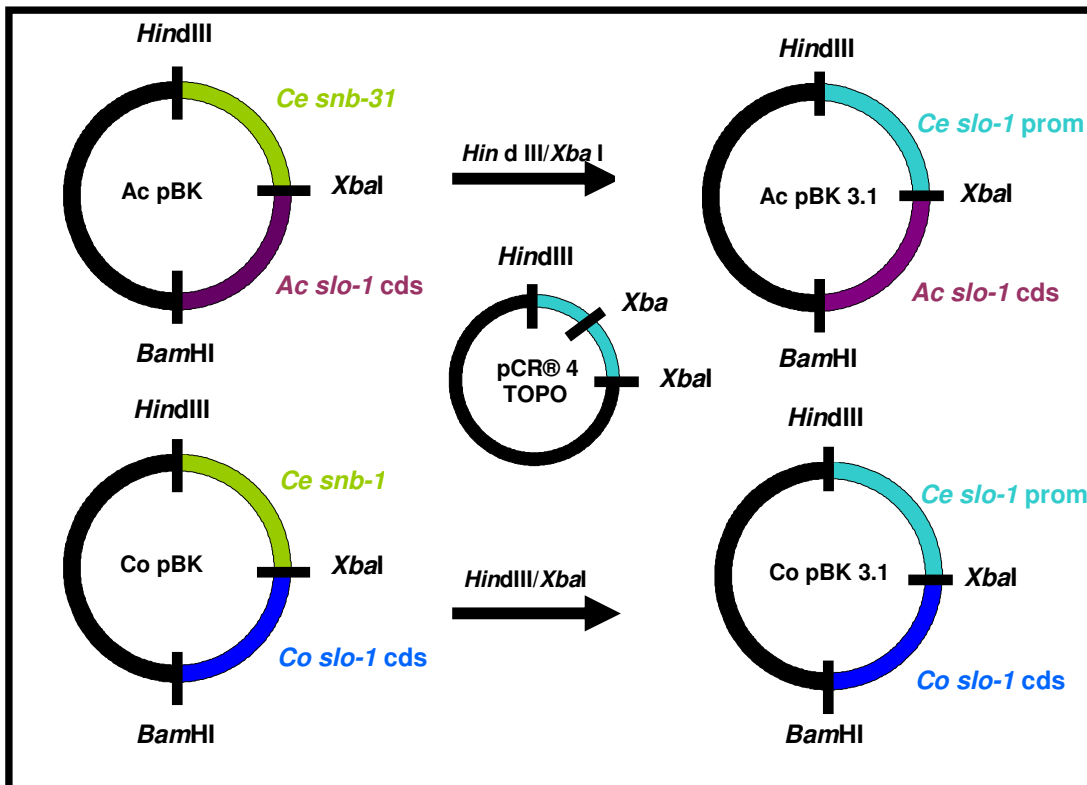


Abb. 11: Schema der Ligation der Promotorsequenz von *C. elegans slo-1* in die Vektoren Ac pBK 3.1 und Co pBK3.1

Da *slo-1* von *C. elegans* in den geplanten Assays bisher noch nicht unter dem *C. elegans slo-1*-Promotor exprimiert worden war, sollte hierfür ebenfalls ein Expressionskonstrukt hergestellt werden. Da die kodierende Sequenz von *C. elegans slo-1* eine interne Schnittstelle für *Hind*III aufweist und diese sehr nah an der *Xba*I-Schnittstelle liegt, war es nicht möglich über einen partiellen Verdau die Fragmente auf dem Gel sauber zu trennen. Daher wurden für die Konstruktion dieses Vektors drei einzelne Fragmente (*Ce slo-1* prom, *Ce slo-1* cds, pBK3.1-„Vektorgerüst“) ligiert. Das Ligationsschema ist in Abbildung 12 dargestellt.

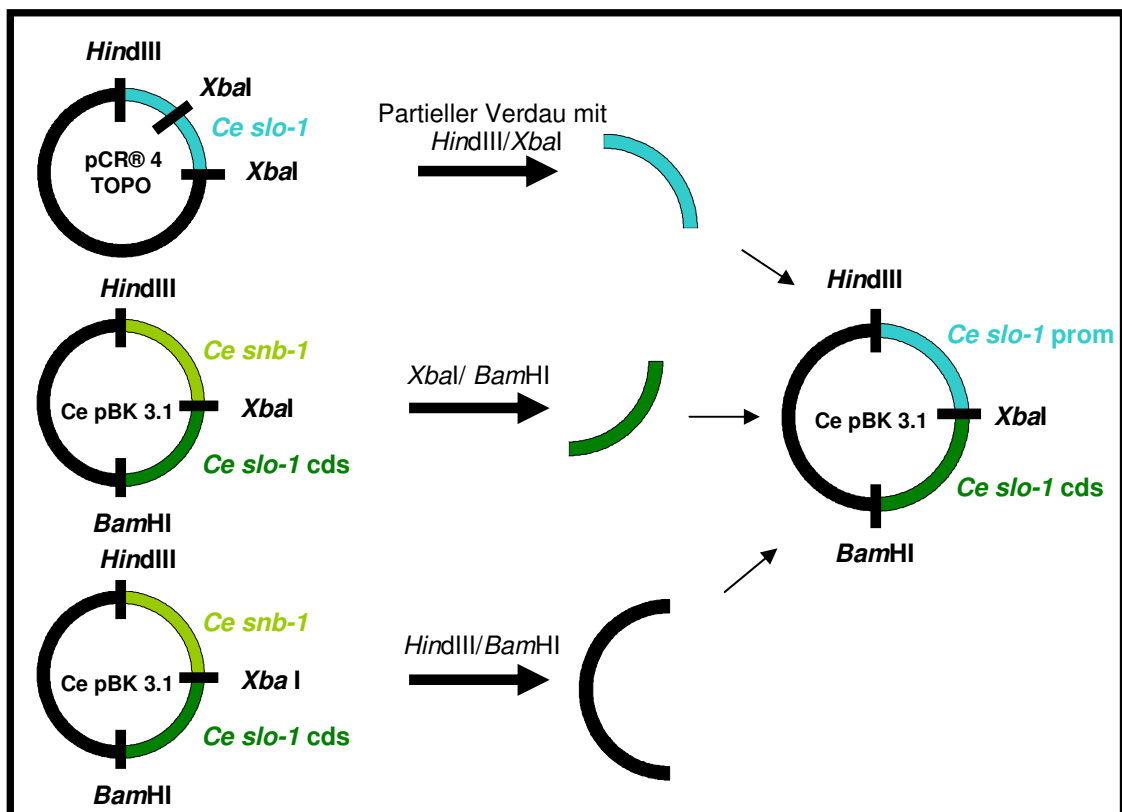


Abb. 12: Ligationsschema für den Vektor pBK3.1 mit der Promotorsequenz von *C. elegans* und dessen kodierende *slo-1* Sequenz

3.23.3 GFP-Reporterkonstrukte

Um zu ermitteln, in welchen Zellen im Wurm Depsiphilin bzw. *slo-1* exprimiert werden, wurden zunächst mittels der Genome Walk PCR mögliche Promotorregionen der einzelnen Gene amplifiziert. Über einen Vektor, der ein GFP-Reporter gen enthält und mit dem *C. elegans* transfiziert wird, kann bei funktionfähigem Promotor der Ort der Expression des entsprechenden Proteins über das GFP-Signal lokalisiert werden. Der verwendete Vektor pPD95.75 (Addgene) ist in Abbildung 13 dargestellt. Nach Amplifikation einer ca. 3 kb großen

Promotorregion für *slo-1* und Dapsiphilin von *A. caninum* und *C. oncophora* mittels Genome Walk, wurden diese wiederum durch zielgerichtete Mutagenese mit den geeigneten Restriktionsenzymchnittstellen versehen. Die verwendeten Primer inklusive der Restriktionsenzymchnittstellen sind im Anhang unter Abschnitt 7.4 in Tabelle 71 aufgeführt. Mittels Restriktionsenzymverdau und anschließender Ligation wurden die Promotorregionen vor ein artifizielles Intron, das die Expression fördert und die dann folgende GFP-kodierende Sequenz in den Vektor ligiert. Außerdem wurde die in Abschnitt 3.23.2 verwendete Promotorregion von *slo-1* von *C. elegans* ebenfalls in ein GFP-Reporterkonstrukt ligiert. Eine Übersicht über den verwendeten Vektor und das Ligationsschema ist in Abbildung 13 dargestellt. Die anschließende Transformation und Analyse der Klone erfolgte analog zu Abschnitt 3.23.1.

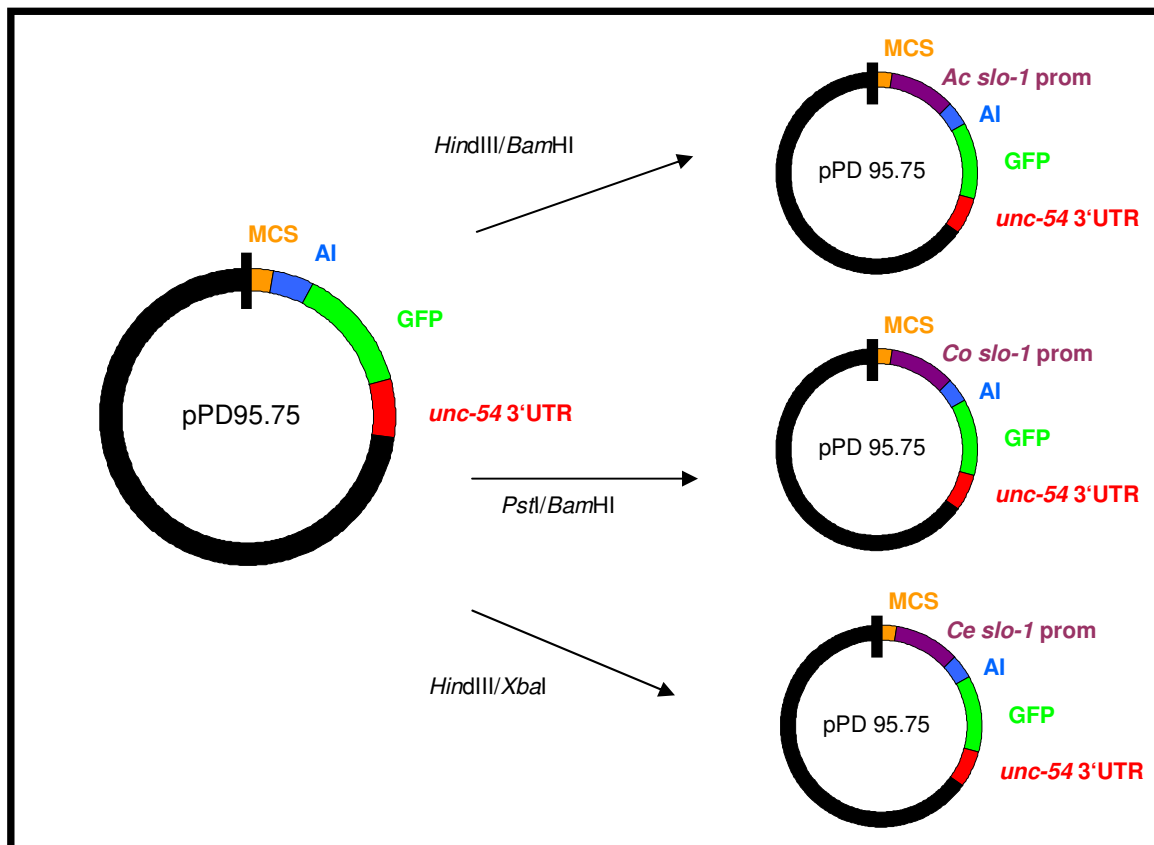


Abb. 13: Ligationsschema *Ac slo-1* prom, *Co slo-1* prom, *Ce slo-1* prom in den Vektor pPD 95.75. MCS: Multiple Cloning Site, AI: Artificial Intron, GFP: GFP cds

3.23.4 Verwendete *C. elegans* Stämme

Für die Expressionsversuche in *C. elegans* wurden verschiedene Stämme verwendet. Aus früheren Versuchen mit *lat-1* von *C. elegans* waren in der AG Holden-Dye doppelte knockout-Mutanten vorhanden, bei denen die Expression von

lat-1 und *lat-2* unterdrückt ist (*lat-2(tm463)lat-1(ok1465)*). Dieser Stamm weist eine unvollständige Resistenz gegenüber Emodepsid auf, d.h. Emodepsid hat weiterhin einen Effekt auf die Bewegungsaktivität aber die Pharynxaktivität lässt sich nicht mehr vollständig hemmen, wie das im Wildtyp der Fall ist (Guest et al., 2007). Dieser Stamm wurde für die Expression der Depsiphiline von *A. caninum* und *C. oncophora* verwendet.

Der Stamm NM1968 *slo-1(js379)* (im folgenden *js379*) ist ein emodepsidresistenter Stamm, der eine Mutation in der vierten Transmembrandomäne aufweist, die zur frühzeitigen Termination des SLO-1 führt. Dieser Stamm wurde für die Versuche mit SLO-1 der parasitischen Nematoden verwendet. Bei beiden Stämmen war das Ziel, die Sensitivität gegenüber Emodepsid durch die funktionale Expression von *slo-1* der parasitischen Nematoden wiederherzustellen. Für die Expression der GFP-Promotor-Reporterkonstrukte wurden entweder der Wildtyp Stamm Bristol N2 verwendet oder eine temperatursensible Linie, *pha-1*, die nur bei Temperaturen unter 25 °C überlebt.

3.23.5 Verwendete Marker zur Selektion transfizierter *C. elegans*

Für die Kontrolle der erfolgreichen Transfektion werden Plasmide kotransfiziert, deren Expression eine leichte phänotypische Erkennung zulässt. Für die Transfektion von *slo-1* wurde gleichzeitig das Plasmid pPD118.33 (Addgene) kotransfiziert, das zu einer Expression von GFP in der Muskulatur des Pharynx führt. Erfolgreich transfizierte Würmer konnten so leicht selektiert werden. Für die Selektion der Depsiphilin-transfizierten Würmer wurde der Marker *rol-6* kotransfiziert. Dieser führt dazu, dass die Würmer sich auf eine korkenzieherähnliche Art fortbewegen, sie drehen sich um die eigene Achse und es kommt zu keiner gerichteten Vorwärtsbewegung. Dieser Marker wurde anstelle des pPD118.33 gewählt, da letzter einen Einfluss auf die Pharynxaktivität hat. In Abbildung 14 und 15 sind adulte *C. elegans* dargestellt, die diese Marker exprimieren. Der *pha-1* Stamm wurde mit *pha-1* kotransfiziert, einem Plasmid das die Temperatursensibilität wieder aufhebt. Die transfizierten Würmer wurden bei 25 °C inkubiert und nur die erfolgreich transfizierten überlebten und reproduzierten sich.

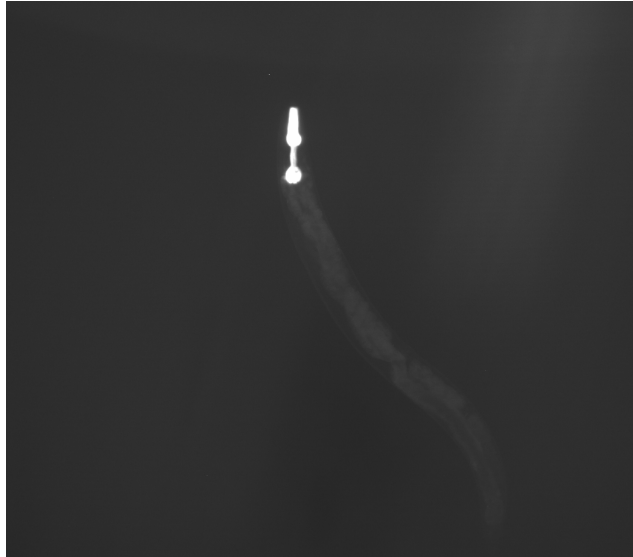


Abb. 14: Adulter *C. elegans*, transfiziert mit pPD 118.33, GFP-Expression in der Muskulatur des Pharynx

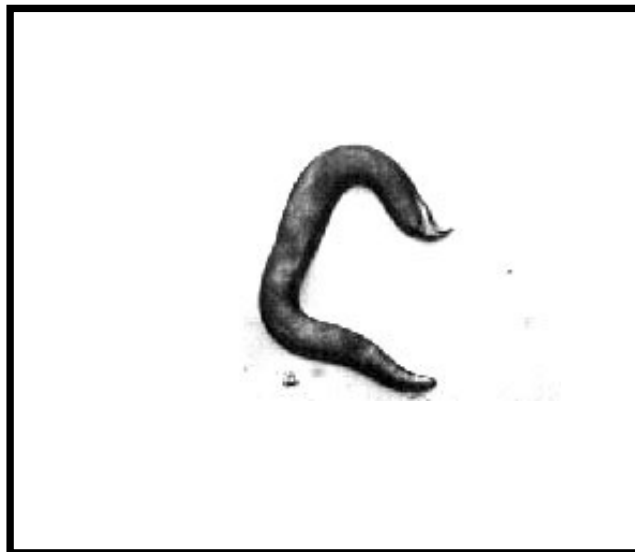


Abb.15: Adulter hermaphroditer *C. elegans*, Expression von *rol-6* führt zu einer korkenzieherähnlichen Fortbewegung

(Quelle:<http://www.bio.unc.edu/faculty/goldstein/lab/movies.html>)

3.23.6 Injektionsnadeln und Plasmide für die Mikroinjektion

Als Injektionsnadel für die Mikroinjektion von *C. elegans* wurden Glaskapillaren der Firma Harvard Apparatus verwendet (\varnothing 0,1 mm), die mit dem Laser-Kapillarenzieher P-2000 von Sutter Instruments ausgezogen wurden. Der Durchmesser der Öffnungen der Kapillaren betrug etwa 1 μm . Für die Injektion wurde die Plasmid-DNA

des jeweiligen zu untersuchenden Gens mit der des Markers gemischt. Dabei wurde die Ziel-DNA jeweils in einer Konzentration von 50 ng/µl und die Marker-DNA in einer Konzentration von 25 ng/µl eingesetzt. Die Befüllung der Kapillaren erfolgte durch einfaches Eintauchen des offenen Hinterendes der Kapillare in das die Plasmid-DNA enthaltene Eppendorfgefäßes. Die DNA-Lösung zieht sich durch den Kapillareffekt selbst in die Kapillare. Anschließend wurde die Kapillare in die Halterung des Mikromanipulators eingespannt.

Ein Deckgläschen wurde zwischen zwei Papiertüchern vorsichtig in größere Stücke zerbrochen. Ein Glasstück mit einer spitzen Kante wurde mittels eines Tropfens Mineralöls auf einen Objektträger aufgeklebt. Unter dem Mikroskop wurde bei 100-facher Vergrößerung die Spitze der Kapillaren an der scharfen Kante des Deckgläschens vorsichtig abgebrochen, so dass eine dünne Öffnung entstand. Mittels des Druckgebers wurde zur Kontrolle ein Tropfen der DNA-Lösung freigesetzt. Die Injektionsnadel konnte je nach Qualität für bis zu 50 Injektionen verwendet werden.

3.23.7 Mikroinjektion von *C. elegans*

Für die Mikroinjektion von *C. elegans* werden zunächst vierte Larven des entsprechenden Stammes auf eine neue Agarplatte überführt. Diese wachsen bis zum folgenden Tag zu jungen Adulten heran. Dadurch ist zum einen gewährleistet, dass sich alle transfizierten Tiere im gleichen Entwicklungsstadium befinden, zum anderen sind die Tiere noch jung genug, um einige Tage lang Eier legen zu können. Um die Tiere auf einem Objektträger fixieren zu können wird dieser mit einem Tropfen 2 %iger Agarose versehen. Dieser wird mit einem Deckgläschen flachgedrückt, welches nach ca. 1 min vorsichtig wieder entfernt wird. Die Agarose wird nun an der Luft oder auf einer Heizplatte getrocknet. Vor direktem Gebrauch wird der Objektträger kurz angehaucht, um der Agaroseunterlage wieder etwas Feuchtigkeit zu geben. Der Wurm wird nun mit einer feinen Präpariernadel kurz in ein Tröpfchen Mineralöl getaucht und dann auf der Agaroseunterlage ausgestreckt aufgeklebt. Unter der 100-fachen Vergrößerung eines inversen Mikroskops (Nikon) wird der Objektträger nun so gedreht, dass die Gonaden des Wurms etwa in einem Winkel von 45° Grad zur Injektionsnadel liegen. Mit Hilfe des Mikromanipulators (Eppendorf) wurde die Injektionsnadel in die Gonaden des Wurms geführt. Mittels des Druckgebers (Eppendorf) wurden wenige picoliter DNA-Lösung in die Gonaden

gespritzt. Nach Entfernen der Injektionsnadel wurde der Wurm mit ca. 5-10 µl M9-Puffer von der Agaroseunterlage gelöst und auf eine frische NGM-Platte mit Bakterienrasen überführt. Es wurden pro Zielgen etwa 20-50 Würmer transfiziert. Die Würmer wurden dann bei 20 °C inkubiert.

3.23.8 Selektion der transfizierten Nachkommenschaft

Bei einer idealen Entwicklungsdauer von vier Tagen (bei 20 °C) konnten nach etwa vier Tagen Larven selektiert werden. Die Selektion erfolgte je nach Marker nach dem entsprechenden Merkmal. Für die Erkennung der GFP-Expression im Pharynx wurde ein Stereomikroskop mit Quecksilberlampe und einem GFP-Filter (Nikon) verwendet. Die positiven Larven oder jungen Adulten wurden jeweils einzeln auf eine frische NGM-Platte mit Bakterienrasen überführt. Es wurden pro Zielgen, wenn möglich, mindestens 45 einzelne positive Larven selektiert. Diese wiederum wurden weiterhin auf eine positive zweite Generation selektiert. Die Selektion der Promotor-GFP-Reporterkonstrukte erfolgte auf das exprimierte GFP-Signal, welches in allen Bereichen des Körpers vorkommen konnte.

3.23.9 Kontrolle der funktionalen Expression von *slo-1*

Um zu überprüfen, ob das *slo-1* der parasitischen Nematoden in *C. elegans js379* (*slo-1*-knockout-Mutanten) funktional exprimiert wird, wurden die transfizierten Würmer Emodepsid ausgesetzt. Hierzu wurden sie für 24 h auf NGM-Platten inkubiert, die eine Konzentration von 10 µg Emodepsid/ml Agar aufwiesen. Für die Herstellung der Platten wurde jeweils am Vortag aus einer 20 mM Emodepsidstammlösung in Ethanol (siehe Abschnitt 3.1) 0,5 ml in 100 ml ca. 45 °C warmen NGM-Agar überführt und damit umgehend Petrischalen (Ø 2,5 cm) etwa zu einem Drittel befüllt. Außerdem wurden zur Kontrolle Platten angefertigt, die anstelle des Emodepsids nur Ethanol als Trägerstoff enthielten. Die Platten wurden offen auf der Sterilbank für ca. 2 h getrocknet und dann mit je 50 µl frischen *E. coli* OP50 beimpft. Die Platten wurden über Nacht bei RT inkubiert. Es wurden für die Gruppe der transfizierten Würmer, sowie für nicht-transfizierte *js379* und Bristol N2 jeweils zwei Platten jeder Emodepsidkonzentration bzw. Ethanolkontrolle vorbereitet. Am folgenden Tag wurden pro Gruppe je 5 vierte Larven auf jede Platte überführt und für 24 h bei 20 °C inkubiert.

3.23.10 Bestimmung der Bewegungsaktivität *slo-1*-transfizierter

***C. elegans* nach Emodepsidexposition**

Nach 24 h wurde der Effekt des Emodepsids auf die Würmer überprüft. Hierzu wurde als Parameter die Bewegungsfähigkeit herangezogen. Diese wurde über die Anzahl der abgeschlossenen sinusiodalen Bewegungen (im Folgenden: *body bends*) bewertet. Ein Wurm wurde zunächst mit der Präpariernadel einzeln ca. 1 cm vom Bakterienrasen entfernt abgesetzt und hier für ca. 1 min belassen. Dies sollte gewährleisten, dass am Wurm anhängende Bakterien so weit wie möglich abgestreift werden. Dann wurde der Wurm auf eine frische NGM-Platte ohne Zusätze und *E. coli* OP50 überführt. Nach einer Minute wurden für eine Minute die *body bends* gezählt. Danach wurde der Wurm verworfen. Dies wurde für alle Würmer aller Gruppen durchgeführt.

3.23.11 Durchführung der dosisabhängigen Emodepsidexposition und Bestimmung der Bewegungsaktivität *slo-1*-transfizierter

C. elegans

Um einen dosisabhängigen Effekt des Emodepsids auf die transfizierten Würmer nachzuweisen, wurde der in Abschnitt 3.23.9 und 3.23.10 beschriebene Versuch für verschiedene Konzentrationen von Emodepsid im Agar durchgeführt. Es wurden neben der höchsten Konzentration von 10 μM außerdem 1 μM , 100 nM, 10 nM und 1 nM eingesetzt. Die Durchführung des Versuchs erfolgte analog zu Abschnitt 3.23.9. und 3.23.10. Der Versuch wurde an mehreren Tagen durchgeführt. Da pro Wurm eine reine Versuchszeit von 3 min anfiel, wurden lediglich drei Konzentrationen an einem Tag untersucht. Der Versuch wurde jeweils mit einer weiteren stabilen Linie jedes heterolog exprimierten Gens wiederholt.

3.23.12 Dokumentation der *slo-1*- bzw. Depsiphilinpromotor-gesteuerten GFP-Expression

Die Expression des GFPs unter Kontrolle des entsprechenden verwendeten *slo-1*- oder Depsiphilin-Promotors der parasitischen Nematoden wurde mittels einer, für Fluoreszenzaufnahmen geeigneten, CCD-Kamera unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung dokumentiert. Hierzu wurden 50 μl frische 2 %ige Agarose auf einen Objektträger gegeben und mittels eines Deckgläschens flachgedrückt, anschließend wurde das Deckgläschen vorsichtig entfernt. Auf den

Agaroseuntergrund wurde 3 μ l 5 %ige Natriumazidlösung aufgetropft. Der Wurm wurde dann in die Natriumazidlösung überführt, was zu einer Paralyse führte. Anschließend wurde das Präparat mit einem Deckgläschen abgedeckt und mikroskopiert.

4 Ergebnisse

In Rahmen dieser Arbeit wurde die orthologe Sequenz des G-Protein-gekoppelten Rezeptors Hc110-R in *A. caninum* identifiziert und als Depsiphilin benannt. Für Hc110-R wurde bereits eine Bindung mit dem anthelminthisch wirksamen Cyclooctadepsipeptid PF1022A, einem Vorläufer des Emodpesids, nachgewiesen. Außerdem konnte in *A. caninum* für den Calcium-gesteuerten Kaliumkanal SLO-1 von *C. elegans*, der ebenfalls an dem Wirkmechanismus von Emodpesid beteiligt ist, die entsprechende orthologe Sequenz nachgewiesen werden. Beide Proteine, sowie die jeweiligen orthologen Proteine von *C. oncophora*, wurden auf ihre Funktionalität und Lokalisation überprüft. Hierfür diente *C. elegans* als Modellorganismus. Im Folgenden wird zunächst die orthologe Sequenz von *A. caninum* zu Hc110-R vorgestellt, mögliche konservierte Strukturen dargestellt und die genomische Organisation analysiert. Anschließend werden die mittels quantitativer real-time PCR untersuchten Unterschiede der Transkriptionsraten des Depsiphilins in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum* dargestellt. Es folgt die Vorstellung des SLO-1 von *A. caninum*. Abschließend werden die Ergebnisse der Promotor-Reporter-Expressionstudien mit Depsiphilin und SLO-1 von *A. caninum* und *C. oncophora*, sowie die Analyse der funktionalen Expression dieser Gene in *C. elegans* dargestellt.

4.1 Identifizierung, Charakterisierung, Organisation und Untersuchungen zur Transkription und Expression des Depsiphilins von *A. caninum* und *C. oncophora*

Für *A. caninum* konnte der orthologe Rezeptor zu Hc110-R von *H. contortus*, LAT-1 von *C. elegans*, sowie den Depsiphilinen von *C. oncophora* und *O. ostertagi* identifiziert werden. Für den Rezeptor wurde analog zu den entsprechenden Rezeptoren der parasitischen Nematoden *C. oncophora* und *O. ostertagi* ebenfalls die Bezeichnung Depsiphilin gewählt.

4.1.1 Southern Blot

Um nachzuweisen, ob eine Hc110-R-ähnliche Sequenz bei *A. caninum* grundsätzlich vorhanden ist, wurde zunächst ein Southern Blot durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels einer DIG-markierten Sonde, die auf der Basis eines Teilstücks der Transmembranregion von Hc110-R hergestellt worden war. Die Sonde umfasst den

Bereich der Transmembranhelices 5 bis 7. Die von der Sonde abgedeckten Bereiche weisen zwischen dem Hc110-R von *H. contortus* und dem Depsiphilin von *A. caninum* auf Nukleotidebene Identitäten von 75 % auf. Abbildung 16 zeigt die entsprechende Autoradiographie. Es zeigt in der Spur 1 die Detektion der hybridisierten Sonde des Teilbereichs der Transmembranregion von Hc110-R in genomischer DNA von *H. contortus* bei einer Größe von etwa 5 kb. In Spur 2 ist das Signal der Sonde, die den genannten Bereich der Transmembranregion abdeckt, in genomischer DNA von *A. caninum* bei ca. 4 kb zu erkennen. Da die DNA vor der gelelektrophoretischen Auftrennung restriktionsenzymatisch geschnitten wurde, kann der Ähnlichkeit der Größe des detektierten Fragments keine Bedeutung beigemessen werden. Trotzdem wird auf diese Weise der Nachweis einer Hc110-R-ähnlichen Sequenz bei *A. caninum* dokumentiert.

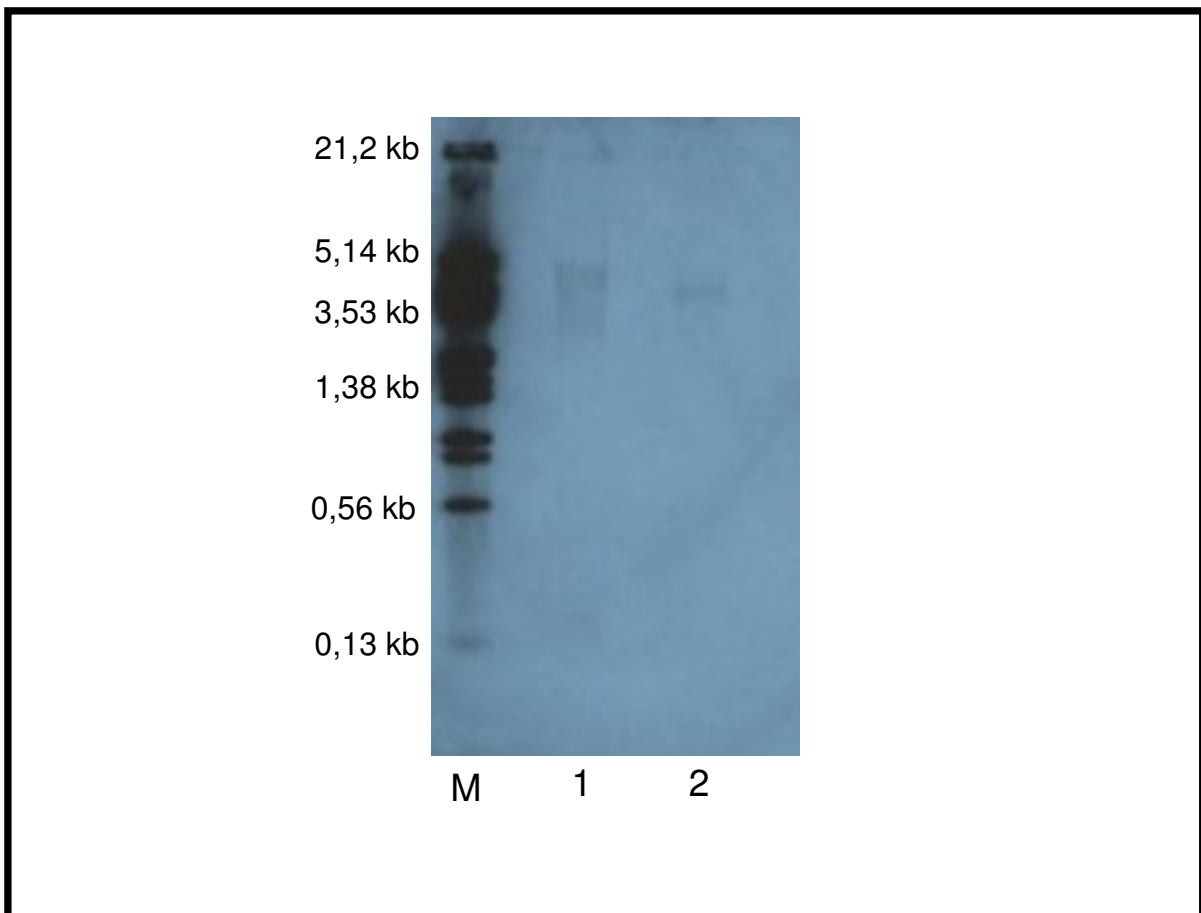


Abb. 16: Southern Blot mit genomischer DNA von 1: *H. contortus*, 2: *A. caninum*, M: Größenmarker in Kilobasen (kb)

4.1.2 Identifikation der kodierenden Sequenzen des *A. caninum* Depsiphilins

In der Datenbank von nematode.net (Wylie et al., 2004) wurde auf Basis der Nukleotidsequenz von Hc110-R für *A. caninum* nach Übereinstimmungen gesucht. Es konnte so ein 769 bp großes Fragment einer *whole genome shot gun library* (Acc. no.: CZ196895) von *A. caninum* indentifiziert werden. Mittels dieser Sequenz wurden spezifische Primer entworfen, um das entsprechende Teilstück zu amplifizieren. Nach der Verifizierung des Fragments wurde mittels RACE die gesamte kodierende Sequenz, inklusive der 5'- und 3'-UTR, amplifiziert. Abschließend wurde die gesamte kodierende Sequenz mit spezifischen Primern amplifiziert und sequenziert. Die kodierende Sequenz des Depsiphilins von *A. caninum* ist 3000 bp lang und endet mit einem TAA-Stoppkodon. Die Länge der Aminosäuresequenz beträgt 999 Aminosäuren. Die mittels RACE amplifizierte cDNA Sequenz inklusive der 5'- und 3'-UTR hat eine Länge von 3699 bp. In der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ergab die Suche mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) mit der Funktion blastn (Vergleich auf Nukleotidebene) eine signifikante Übereinstimmung mit den Depsiphilinen von *O. ostertagi* und *C. oncophora*, Hc110-R von *H. contortus* und *lat-1* von *C. elegans*. Mit der Funktion blastp (Vergleich auf Aminosäureebene) wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der entsprechenden Gene auf Ähnlichkeiten zu entsprechenden Rezeptoren anderer Arten untersucht. Mit dieser Funktion wurde, neben den oben genannten, auch das Protein CBG03206 von *C. briggsae*, sowie verschiedene Latrophiline von Säugern identifiziert. Die Identitäten zu diesen liegen nur noch um etwa 30 %. Tabelle 4 gibt eine Übersicht der Ähnlichkeiten der Depsiphiline und seiner Orthologen bei Nematoden.

	<i>C. oncophora</i> Depsiphilin (2985 bp/994 AS)	<i>O. ostertagi</i> Depsiphilin (2985 bp/994 AS)	<i>H. contortus</i> Hc110-R (2985 bp/986 AS)	<i>C. elegans</i> LAT-1 (3045 bp/1012 AS)
<i>A. caninum</i> Depsiphilin (3000 bp cds)	73 %	73 %	73 %	54 %
<i>A. caninum</i> Depsiphilin (999 AS)	80 %	81 %	80 %	46 %

Tab. 4: Übersicht über die Identitäten von Depsiphilinen und deren Orthologen in Prozent, in Klammern jeweils die Länge der jeweiligen kodierenden Nukleotidsequenz in Basenpaaren (bp) bzw. der abgeleiteten Aminosäuresequenz in Aminosäuren (AS).

4.1.3 Untersuchungen zu Transmembranregionen und Signalpeptide

Die Gendatenbank National Center for Biotechnology Information (NCBI) bietet mit dem Programm CDART (Marchler-Bauer et al., 2004) die Möglichkeit, Voraussagen zur Struktur eines Proteins zu treffen. Es wurden mit Hilfe der Pfam Datenbank (Finn et al., 2006) konservierte Proteindomänen identifiziert. Hierbei wurde für die abgeleitete Aminosäuresequenz des Depsiphilins von *A. caninum* in dem Bereich von Aminosäure (AS) 38 bis 122 eine Galaktose-bindende Lektin-Domäne detektiert (pfam 02140), von AS 161 bis 222 eine Domäne, die Ähnlichkeiten zu Hormonrezeptoren aufweist (pfam 02793), von 473 bis 516 eine Latrophilin/CL-1 GPS Domäne bzw. eine GPCR Domäne mit Proteolyseregion (pfam01825 bzw. smart 00303). Es wurde des Weiteren eine Transmembrandomäne mit sieben Transmembranhelices identifiziert, die der Sekretinfamilie zugeordnet wird (pfam 00002). Im Vergleich mit den Depsiphilinen von *C. oncophora* und *O. ostertagi*, sowie Hc110-R von *H. contortus* und LAT-1 von *C. elegans*, zeigen sich keine Unterschiede in der Voraussage dieser Domänen. Die Latrophiline der Säuger, wie z.B. jenes des Rindes (*Bos taurus*) weisen zusätzlich zu den genannten von AS 142 bis 398 noch eine Olfaktomedin-ähnliche Domäne auf. Außerdem wird von AS 1040 bis 1356 eine C-terminale cytoplasmatische Latrophilin-Domäne identifiziert, die bei den Nematoden nicht detektiert wird. Mit den verwendeten Voraussage-Programmen wurden ebenfalls sieben Transmembranhelices (TMH) detektiert, sowie ein extrazellulärer NH₂-Terminus. Außerdem erkannten die Programme Phobius und ConPred II ein Signalpeptid innerhalb der ersten 17 bzw. 24 Aminosäuren. In

Abbildung 17 ist eine schematische Übersicht über die Proteinstruktur der Depsiphiline von *A. caninum*, *C. oncophora* und *O. ostertagi*, Hc110-R, LAT-1 und des Latrophilins des Rindes dargestellt. Im Anhang im Abschnitt 7.1 Tabelle 7 sind die Anzahl und Positionen der TMH dargestellt.

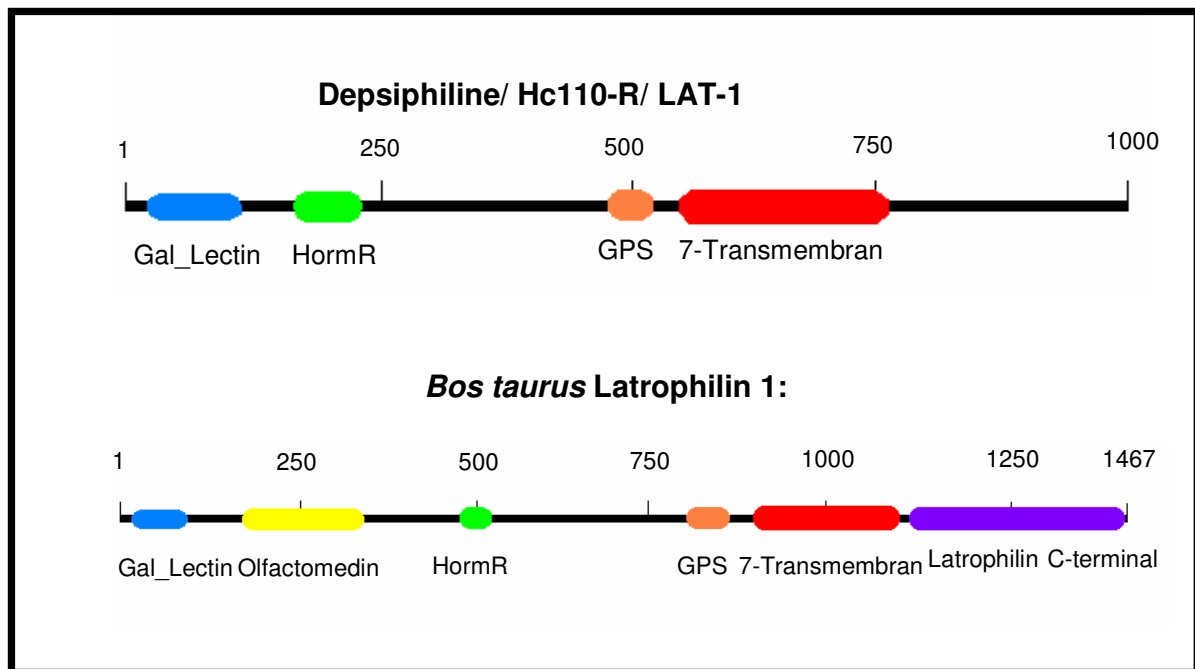


Abb. 17: Schematische Übersicht über die Proteinstruktur der Depsiphiline, Hc110-R, LAT-1 und des Latrophilins des Rindes. Die Zahlen markieren die Positionen der Aminosäuren. Die farbigen Felder markieren die identifizierten Domänen: Galaktose bindende Lektin-Domäne, Hormonrezeptor-Domäne, GPCR-Domäne, 7-Transmembran-Domäne, C-terminale cytoplasmatische Latrophilin-Domäne

4.1.4 Phylogenetische Analyse

Um Unterschiede und Ähnlichkeiten von Latrophilinen, Latrophilin-ähnlichen Proteinen und Depsiphilinen zu analysieren, wurde mit dem Programm ClustalW ein Alignment erstellt und die Identitäten berechnet. Dabei weist das LAT-1 von *C. elegans* eine Identität von 81 % zu LAT-1 von *C. briggsae* auf, zu den Depsiphilinen der parasitischen Nematoden und zu Hc110-R liegt diese nur zwischen 45 und 46 %. Die Ähnlichkeit von *C. elegans* LAT-1 zu *C. elegans* bzw. *C. briggsae* LAT-2 liegt nur bei 19 bis 21 %. Die Identitäten von *C. elegans* LAT-1 zu den Latrophilinen der Säuger sind mit 22 bis 24 % sehr gering. Die drei Latrophiline der Säuger sind jeweils untereinander mit Identitäten zwischen 91 und 98 % hoch konserviert. LAT-2 von *C. elegans* und *C. briggsae* wiesen zueinander eine Identität von 81 % auf, zu

dem orthologen LAT-2 von *C. oncophora* 45 bzw. 47 % und zu den Latrophilinen 2 der Säuger nur noch zwischen 16 und 20 %.

Auf Basis eines Alignments mit der Software ClustalX und BioEdit, wurde mit dem Programm Mega4 mittels des Neighbour Joining Verfahrens ein phylogenetischer Baum erstellt, der die verwandschaftlichen Beziehungen der einzelnen Arten in Bezug auf SLO-1 darstellt. Das Neighbour Joining Verfahren ist eine distanzbasierte Methode zur Berechnung von Verwandtschaftsverhältnissen der zu untersuchenden Organismen bzw. Gene. Hierbei werden jeweils die Gruppen verbunden, die sich voneinander wenig unterscheiden, zugleich aber weit von den anderen entfernt sind. Die statistische Signifikanz wurde durch eine Bootstrap-Analyse mit jeweils 1000 Replikaten untersucht. Im Dendrogramm in Abbildung 18 sind an den Verzweigungen der Äste nur die Bootstrap-Werte über 50 % angegeben. Es werden hier die Latrophiline der Säuger entsprechend ihrer Gruppen (Latrophilin 1, 2 und 3) gruppiert. Die LAT-1-Proteine und die Depsiphiline, bzw. das Hc110-R der parasitischen Nematoden werden, von den Latrophilinen der Säuger abgeleitet, in einer Gruppe zusammengefasst. Bei letzteren sind das Depsiphilin von *C. oncophora* und *O. ostertagi* und Hc110-R von *A. caninum* Depsiphilin abgeleitet. LAT-2 der Nematoden wird ebenfalls als eigene Gruppe dargestellt. Die Bootstrap-Unterstützung für diese Analyse liegt, bis auf die Ableitung dieser Gruppe, immer über 50 %, in den meisten Fällen bei 99 bzw. 100 %.

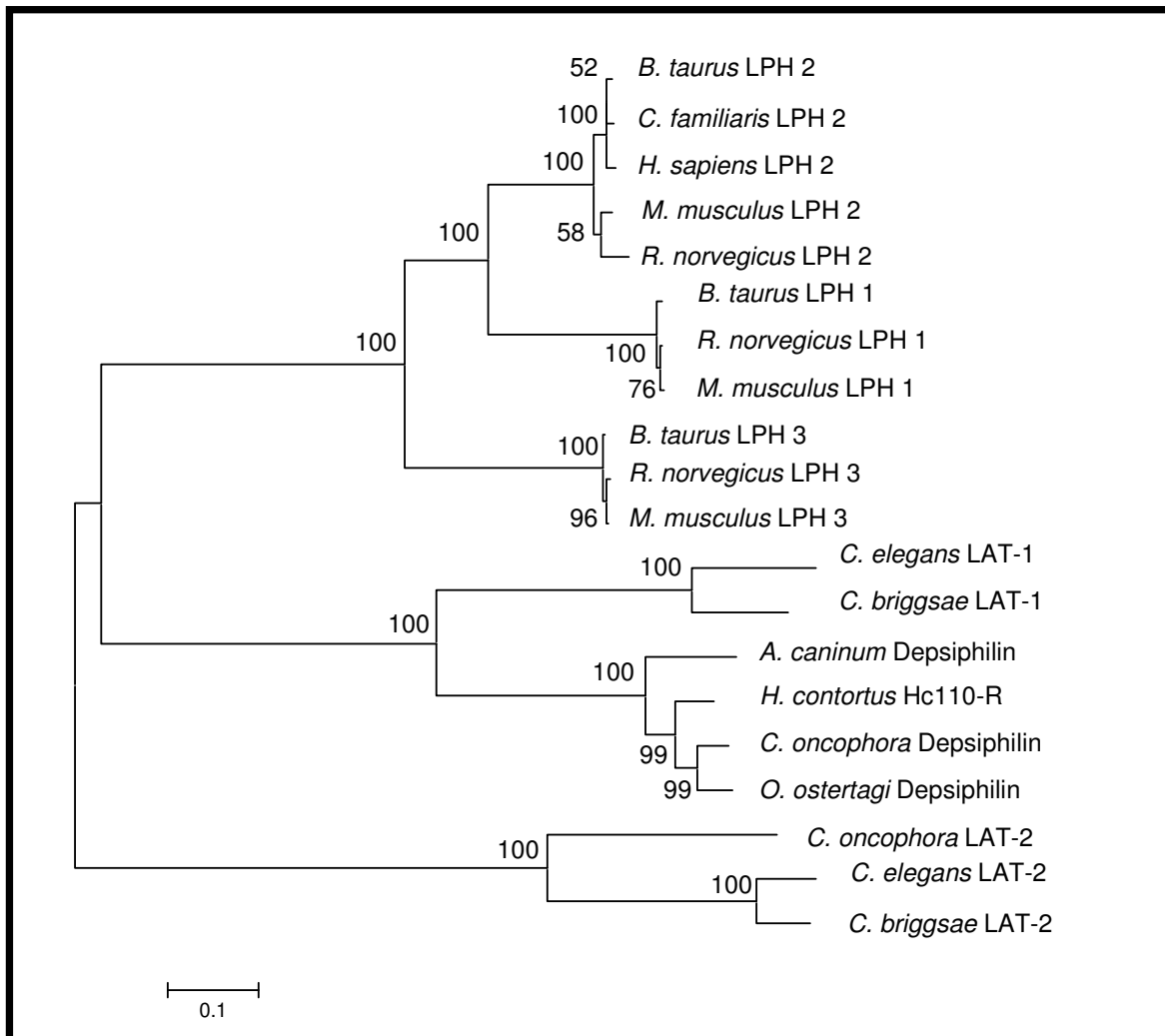


Abb 18: Phylogenetischer Baum der Latrophiline, Latrophilin-ähnlichen Proteine, sowie der Depsiphiline, erstellt mit dem Neighbour Joining Verfahren. Die Zahlen an den Ästen zeigen die Bootstrap-Werte in Prozent an (1000 Replikate). Der Balken zeigt die Anzahl der Substitutionen pro Aminosäure an. Die Accession numbers der verwendeten Sequenzen sind im Anhang unter Abschnitt 7.6 aufgeführt.

4.1.5 Genomische Organisation des *A. caninum* Depsiphilin

Mittels des Genome Walker™ Kits (BD Clontech) wurde die genomische Sequenz des Depsiphilin von *A. caninum* untersucht. Es wurde insgesamt eine Sequenz von 28.000 bp amplifiziert. Dieses beinhaltet einen möglichen Promotorbereich von 4450 bp stromaufwärts des Startcodons und endet 756 bp hinter dem Stoppkodon. Die Sequenz setzt sich aus 20 Introns und 21 Exons zusammen. Alle Introns folgen der GT-AG Regel. Die Introngrößen variieren stark, sie reichen von 61 bp bis 11.000 bp, wobei die Größe der meisten Introns zwischen 60 und 100 bp liegt (12 von 20), fünf liegen etwa zwischen 100 und 530 und zwei Introns weisen eine Größe von 9413 und 10.969 bp auf. Abbildung 19 zeigt eine schematische Darstellung der

genomischen Organisation im Vergleich zu LAT-1 von *C. elegans* und Hc110-R von *H. contortus*. Die genomische Sequenz des Gens für Hc110-R wurde ebenfalls im Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover angefertigt, ist aber noch unvollständig. Bei dem Vergleich zu der *lat-1* Sequenz von *C. elegans* fällt zunächst die deutlich geringere Anzahl Introns auf. Die Gesamtlänge beträgt lediglich ca. 12.00 bp. Obwohl die genomische Sequenz des Gens von Hc110-R noch nicht vollständig analysiert wurde, sind auch hier bereits mehr Introns zu verzeichnen als bei *C. elegans*. Eine Übersicht über die Lage der Introns des Depsiphilins von *A. caninum*, sowie die Größe der Exons und Introns ist in Tabelle 5 gegeben.

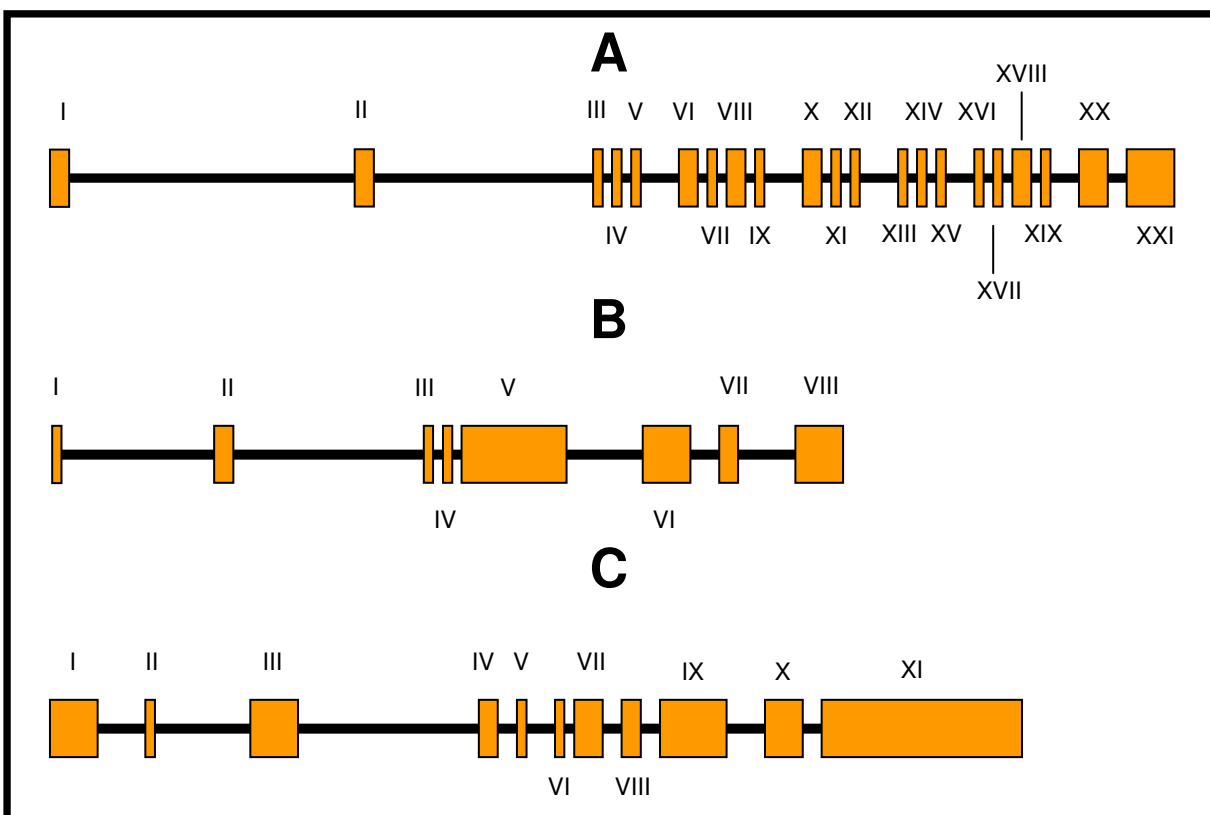


Abb. 19: Schematische Darstellung der Exon-/Intron-Organisation des Depsiphilins von *A. caninum* (A), *lat-1* von *C. elegans* (B) und Hc110-R (C). Exons sind durch orangefarbene Kästen, Introns durch die schwarze Linie dargestellt.

Exon Nr.	Exon-Position	Exongröße (bp)	Exon-Intron Übergänge (5'-Spleiß-Donor und 3'-Spleiß-Akzeptor Sequenzen)	Intron-Position	Intron Größe (bp)
I	1-187	187	CCAACAgtag....ttccagGTTCAA	188 - 11157	10969
II	188 - 263	75	GAAGAGgtcag....ttacagTTGTGA	11158-20571	9413
III	264-408	114	TGGAGGtagg....ttacagTCACAA	20572-20672	100
IV	409-496	87	GAGAGAgtag....ttccagTATGGG	20673-20734	61
V	497- 613	116	CGAGGGgtgag.....cttcagGAACAT	20735-21268	533
VI	614- 760	146	CCGGAGgtaga....tttcagCTGCTC	21269-21338	69
VII	761- 902	141	AACCAGgtag....tttcagCTCATC	21339-21407	68
VIII	903-1101	198	ATCAAGgtggg....tttcagACGTCT	21408-21474	66
IX	1102- 1217	115	TTTTAGgtttg....ttccagACCGCT	21475-21958	483
X	1218- 1409	191	AGACCGgttgg....cctcagATTGTC	21959-22055	96
XII	1410- 1497	87	CTTCAGgtgag....tttcagTGGTCC	22056-22146	90
XIII	1498- 1607	108	CATGAGgtgag...taatagGTTTCG	22147-22552	405
XIV	1608- 1730	122	TGATAGgtaaa....tttcagGGTATT	22553-22653	100
XV	1731- 1816	85	GAAAAGgtagg....tttcagTTCGAG	22654-22779	125
XVI	1817- 1919	102	GTCGAGgtaat....ttccagGTGTTC	22780-22984	204
XVII	1920- 2042	122	TTGCTGgtttg....ttacagGCTACG	22985-23055	70
XVIII	2043- 2200	158	ATTTAGgtaaa....tttagGACCTG	23056-23129	73
XIX	2201- 2372	172	GATAAGgtaga....tttcagATGCGC	23130-23219	89
XX	2373- 2514	141	TTCATAgtaag....tttcagTACCCA	23220-23508	288
XXI	2515- 2630	115	CTAATGgtaag....ttaaagGCACCT	23509-23686	77
XXII	2631- 3000	3696			

Tab 5: Exon-Intron Organisation des Depsiphilins von *A. caninum*.

4.1.5.1 Mögliche Spleißingvarianten

Bei LAT-1 von *C. elegans* kommen drei Spleißingvarianten vor: LAT-1a, LAT-1b und LAT-1c (B0457.1a, B0457.1b, B0457.1 c)(*C.elegans* Sequence Consortium, 1998). Variante c codiert nur für ein 114 Aminosäuren langes Protein. Die Varianten a und b unterscheiden sich innerhalb der Galaktose-bindenden Lektin-Domäne. Im direkten Vergleich dieser beiden unterschiedlichen Fragmente, zeigt sich eine Identität von 41 % auf Aminosäureebene. Im Vergleich der beiden gesamten Sequenzen beträgt der Unterschied lediglich 2 %. Innerhalb des zweiten Introns des Depsiphilins von *A. caninum* befindet sich ein Fragment kodierender Sequenz der Galaktose-bindenden Lektin-Domäne des Depsiphilins von 93 bp Länge. Die abgeleitete Aminosäuresequenz weist zu der korrespondierenden Sequenz des Depsiphilins nur eine Ähnlichkeit von 43 % auf. In Tabelle 6 sind die Identitäten der einzelnen Fragmente der verschiedenen Varianten der Gene aufgeführt. Die deutlich höhere Ähnlichkeit des Intronfragments von *A. caninum* zu der entsprechenden Region des LAT-1b (im Vergleich zu LAT-1a), spricht dafür, dass für das Depsiphilin von *A. caninum* ebenfalls mindestens eine weitere Variante vorhanden ist. Diese Variante konnte allerdings bisher nicht direkt mittels PCR amplifiziert werden.

	<i>A. caninum</i> Depsi a	<i>C. elegans</i> Lat-1a	<i>C. elegans</i> Lat-1b
<i>A. caninum</i> Depsi a	/	47 %	35 %
<i>A. caninum</i> Depsi b	43 %	43 %	51 %
<i>C. elegans</i> Lat-1b	/	41 %	/

Tab. 6: Identitäten zwischen den unterschiedlichen Fragmenten der Galaktose-bindenden Lektin-Domäne von *A. caninum* Depsiphilin Variante a (Depsi a), Variante b (Depsi b), sowie LAT-1a und LAT-1b von *C. elegans* auf Aminosäureebene in Prozent.

4.1.6 Mögliche Promotorregion für das Depsiphilin von *A. caninum*

Unter Verwendung des Genome Walker™ Kits (BD Clontech) wurde eine mögliche Promotorregion des Depsiphilins amplifiziert. Diese ist 4450 bp lang und endet mit dem Startcodon. Mit Hilfe der Programme Genome2Promoter und MatInspector von

Genomatix konnten keine spezifischen Promotorelemente oder Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert werden. Die manuelle Suche nach bekannten eukaryotischen Promotorelementen führte für die TATA-Box zu keinem Ergebnis. Es gibt fünf GGGCG-Fragmente (- 151, - 189, - 933, -1180, - 1922, ausgehend vom Startcodon), die jeweils Bindungsstellen für die RNA-Polymerase darstellen können. Außerdem kommen in der untersuchten Sequenz an sechs Positionen CAAT-Motive vor, von denen allerdings keines dem für Eukaryoten bisher bekannten Promotorelement 5'-GGNCAATCT-3' entspricht. Dieses Element stellt eine Bindestelle für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren dar.

4.1.7 Quantitative Untersuchung zur Transkription von Despsiphilin mittels real-time PCR

Mittels der quantitativen real-time PCR sollten mögliche Unterschiede in der Transkriptionshäufigkeit des Despsiphilins in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum* untersucht werden. Hierfür wurde in einem PCR-Experiment jeweils ein Stadium untersucht. Für jedes Entwicklungsstadium und jedes untersuchte Gen wurde eine Verdünnungsreihe von 10^1 - 10^7 Kopien/ μ l cDNA mitgeführt. Diese wurde zuvor aus Plasmid-DNA, die das entsprechende Genfragment enthielt, hergestellt. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor: 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:50) einer cDNA-Probe, synthetisiert aus 1 μ g RNA der Männchen für jedes Gen, sowie die Proben selbst in Duplikaten eingesetzt.

4.1.7.1 Bestimmung der Amplifikationseffizienzen von Ziel- und Referenzgenen

Die Voraussetzung für die Anwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode ist die Übereinstimmung der Amplifikationseffizienzen der PCR für das Ziel- und Referenzgenen. Um dies zu überprüfen und um die Vergleichbarkeit der einzelnen real-time PCR-Experimente zu gewährleisten, wurde eine Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor: 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:50) einer Probe der cDNA der Männchen (synthetisiert aus 1 μ g RNA) für jedes Gen mitgeführt und anschließend der ΔC_T -Wert = $C_{T(\text{Despsiphilin})} - C_{T(\text{Referenzgen})}$ gegen die jeweilige Verdünnung grafisch aufgetragen. Die Steigung der resultierenden Kurve sollte hier laut Livak et al. (2001) nahe Null liegen, das heißt, dass das Verhältnis der C_T -Werte des Despsiphilins und der 18S rRNA bzw. 60S über die verschiedenen Verdünnungen gleich bleiben sollen. Für die Männchen liegen die Werte der Steigung bei $y=0,025x$ (Depsi/18S) bzw. $y=-0,03x$ (Depsi/60S). Livak et al.

Machen keine genauen Angaben über die mögliche Schwankungsbreite dieses Wertes. In der Arbeit wird ein Wert von $y=0,047x$ als akzeptabel angegeben. Dies bedeutet, dass die Berechnung der Transkriptionsraten des Depsiphilins in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum* unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode hier angewendet werden kann.

4.1.7.2 Relative Transkriptmengen des Depsiphilins von *A. caninum* in verschiedenen Entwicklungsstadien

Um die Vergleichbarkeit der Rohdaten zu gewährleisten, wurden die Schwellenwerte der Proben für jedes einzelne PCR-Experiment ermittelt und daraus der Mittelwert gebildet. Dieser wurde dann manuell als Schwellenwert für alle Proben eingesetzt. Die Berechnung der relativen Transkriptionsrate des Depsiphilins mittels der C_T -Werte und der relativen Kopienzahlen erfolgte jeweils unter Normalisierung auf die Referenzgene 18S rRNA und 60S arp. Die Werte wurden zu denen der Männchen ins Verhältnis gesetzt, die als 100 % festgelegt wurden. Die Ergebnisse sind nach Bezugswert (C_T -Wert oder Kopienzahl) und Referenzgen getrennt in den Abbildungen 20-23 dargestellt. Beide Auswertungsmethoden zeigen eine deutlich erhöhte Transkriptionsrate des Depsiphilins in den Eiern. Die Auswertung nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode ergab eine um 600 % erhöhte Transkriptionsrate des Depsiphilins in der aus Eiern gewonnenen cDNA gegenüber den bei den Männchen ermittelten Werten. Die Daten aus der $\Delta\Delta C_T$ -Wert-gestützten Berechnung weisen im Vergleich zu der Berechnung über die Kopienzahlen eine höhere Depsiphilin-Transkriptionsrate innerhalb der ersten/zweiten Larven auf. Für die dritten Larven wird hingegen eine stärkere Transkription des Depsiphilins über die Auswertung mittels Einbeziehung der relativen Kopienzahlen ermittelt. Außerdem ist der relative Wert der Depsiphilin-Kopienzahlen bei den Eiern im Verhältnis deutlich höher als bei der $\Delta\Delta C_T$ -Wert-gestützten Berechnung, er liegt hier bei etwa 1500 %.

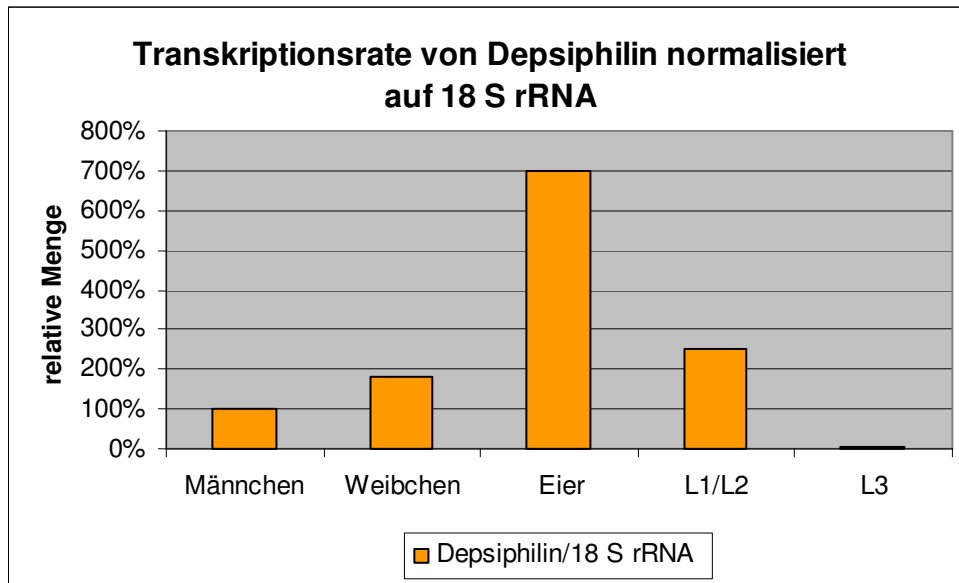


Abb. 20: Relative Menge der Transkripte von Depsiphilin in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum*, berechnet nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode, basierend auf den ΔC_T -Werten. Normalisierung auf das Referenzgen 18S rRNA.

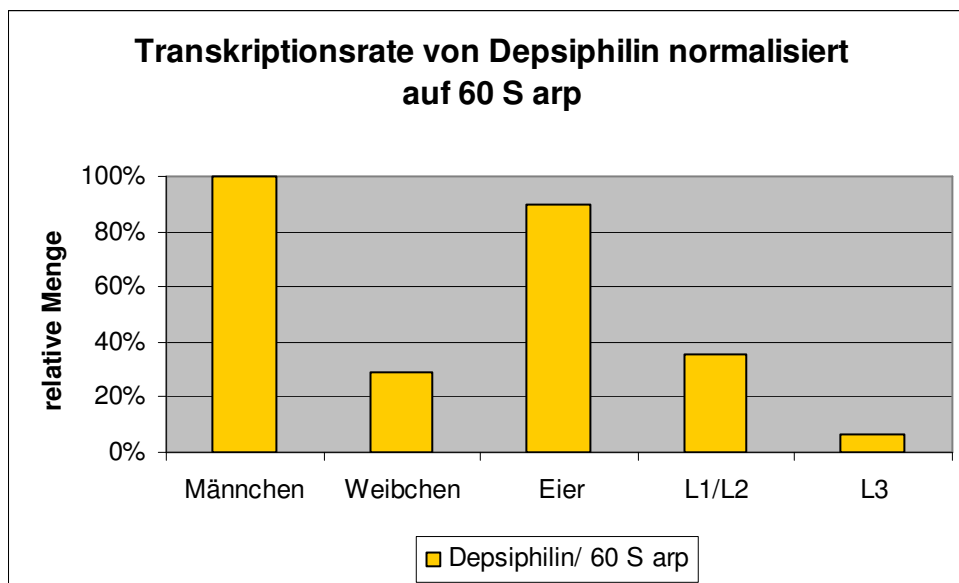


Abb. 21: Relative Menge der Transkripte von Depsiphilin in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum*, berechnet nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode, basierend auf den ΔC_T -Werten. Normalisierung auf das Referenzgen 60S arp.

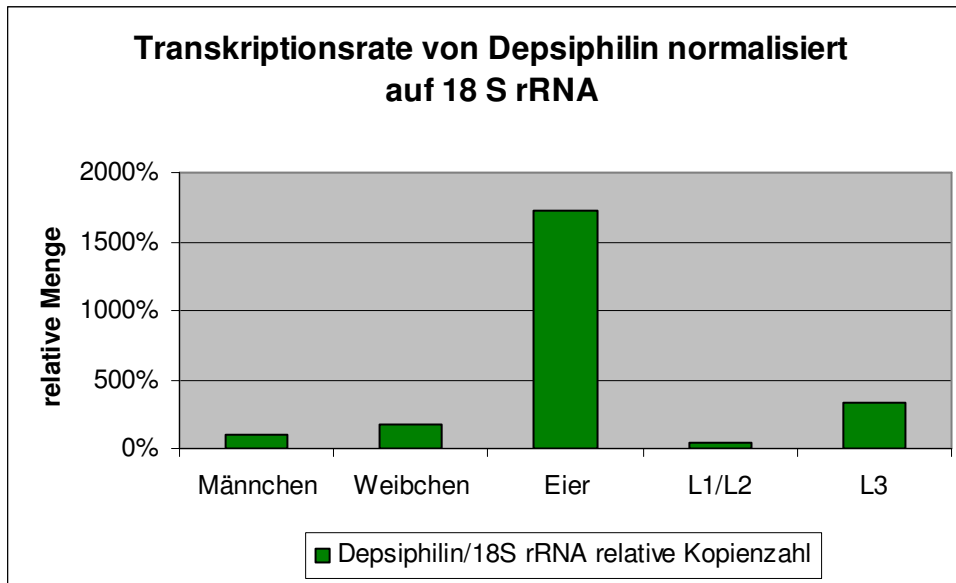


Abb. 22: Relative Menge der Transkripte von Depsiphilin in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum*. Berechnung mittels Bestimmung der absoluten Kopienzahlen, normalisiert auf das Referenzgen 18S rRNA.

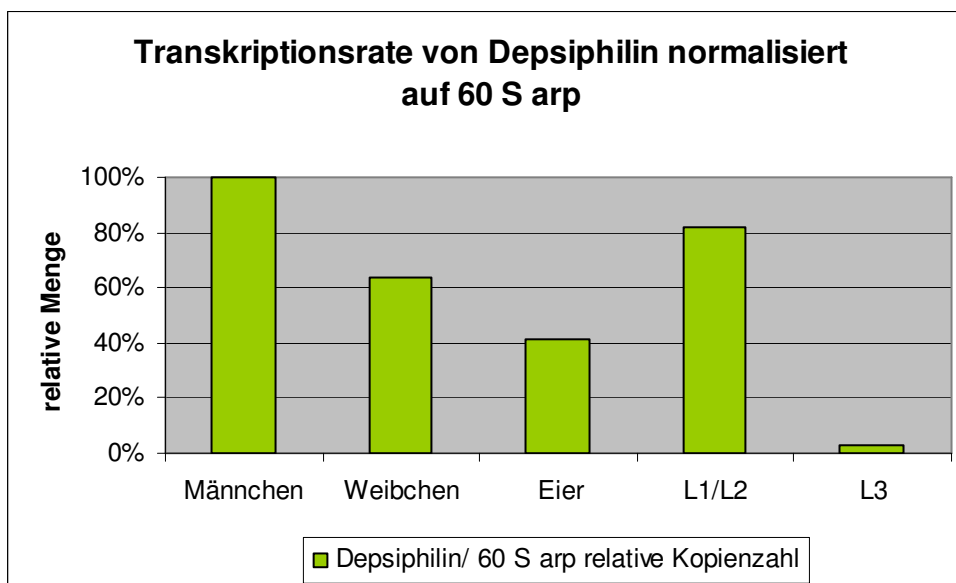


Abb. 23: Relative Menge der Kopienzahlen der Transkripte von Depsiphilin in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum*. Berechnung mittels Bestimmung der absoluten Kopienzahlen, normalisiert auf das Referenzgen 60S arp.

4.1.7.3 Analyse der relativen Kopienzahlen des Depsiphilins und der Referenzgene der verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum*

Um grundsätzliche Unterschiede von Transkriptmengen in den verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum* festzustellen, wurden mittels der mitgeführten

Standardreihe die absoluten Kopienzahlen pro 1 µl eingesetzter cDNA (aus jeweils 1 µg RNA synthetisiert) ermittelt. Diese wurden auf die Männchen relativiert, die als Kalibrator dienten und als 100 % festgelegt wurden. Abbildung 24 zeigt, dass für alle drei Gene, eine Variabilität in den Transkriptmengen der einzelnen Entwicklungsstadien vorhanden ist. Für alle Gene sind jeweils Schwankungen in den relativen Transkriptmengen innerhalb der einzelnen Entwicklungsstadien zu erkennen. Dabei ist die Variabilität für das Zielgen Depsiphilin am geringsten, aber auch hier liegt z. B. der Wert für die Eier ca. 400 % über dem der Männchen. Für das Referenzgen 18S rRNA sind die Kopienzahlen pro 1 µl eingesetzter cDNA (aus jeweils 1 µg RNA synthetisiert) der ersten/zweiten bzw. dritten Larven um gut 500 bzw. 300 % gegenüber den bei den Männchen festgestellten erhöht. Am deutlichsten sind die Schwankungen für das Referenzgen 60S arp. Hier liegt die Transkriptmenge des Depsiphilins in den Eiern etwa 1100 % über der der Männchen, die der dritten Larven noch höher, bei ca. 1450 %. Diese Werte zeigen, dass die verwendeten Referenzgene entgegen der Erwartung nicht stabil über die einzelnen Entwicklungsstadien transkribiert werden und dadurch die durchgeführte Analyse der Ergebnisse vorsichtig zu bewerten ist.

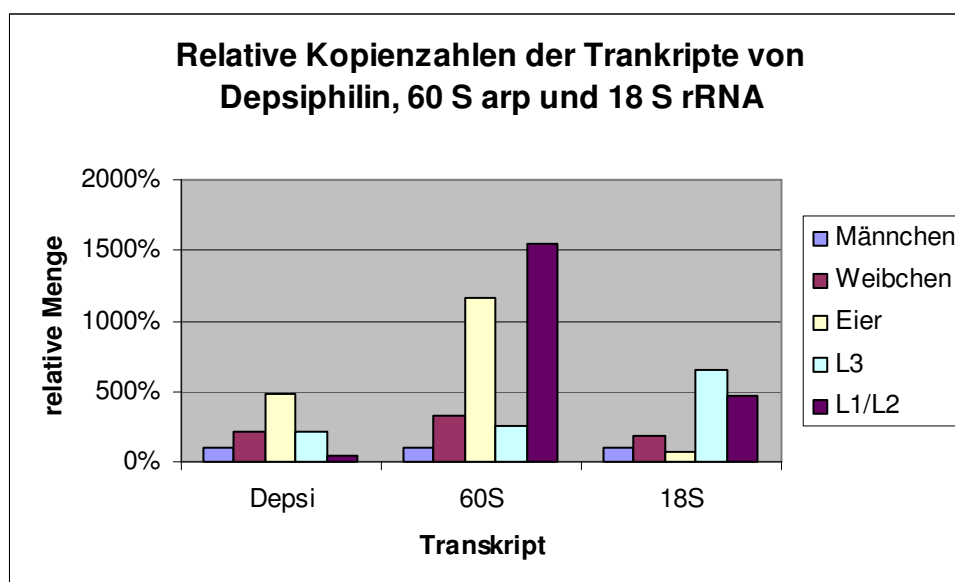


Abb. 24: Relative Kopienzahlen der Transkripte von Depsiphilin (Depsi), 60S und 18S in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum* im Vergleich zu den Kopienzahlen der Transkripte in Männchen (Männchen wurden als Kalibrator auf 100 % festgelegt)

4.1.8 Heterologe Expression von Depsiphilin in *C. elegans*

4.1.8.1 Untersuchungen zur Funktionalität des Depsiphilins von *A. caninum* und *C. oncophora* mittels heterologer Expression in *C. elegans*

Um die Funktionalität der Depsiphiline von *A. caninum* und *C. oncophora* nachzuweisen, sollten diese in *C. elegans lat-1lat-2* Doppelknockout-Mutanten exprimiert werden. Anschließend sollten die transfizierten Würmer Emodepsid ausgesetzt und die Pharynxaktivität über ein Elektropharyngeogramm gemessen werden. Als kotransfizierter Marker diene *rol-6*, dessen Expression eine korkenzieherartige Fortbewegung der Würmer zur Folge hat. Für jedes Depsiphilin-Konstrukt, wurden etwa 50 Würmer transfiziert. In den jeweiligen ersten Nachkommenschaften (F1) befanden sich nur ein bis zwei Würmer, die *rol-6* und somit vermutlich auch das kotransfizierte Depsiphilin exprimierten. Diese Würmer wurden jeweils auf eine frische Agarplatte überführt. Lediglich einer dieser Würmer produzierte Eier. Diese Generation wies keine Expression von *rol-6* auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch Depsiphilin nicht exprimiert wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse und der geringen Anzahl an Würmern, wurden keine weiteren Versuche zur Funktionalität in *C. elegans* durchgeführt.

4.1.8.2 *Cooperia oncophora* Depsiphilin-Promotor gesteuerte GFP-Expression in *C. elegans*

Für *A. caninum* wurde wie unter Abschnitt 4.1.6 beschrieben ein 4450 bp großes Promotorfragment amplifiziert. Da es nicht gelang mittels mehrerer spezifischer Primer ein etwa 3000 bp großes Stück im Ganzen zu amplifizieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit zunächst kein GFP-Reporterkonstrukt hergestellt werden. Daher wurde der Versuch nur mit der möglichen Promotorsequenz von *C. oncophora* durchgeführt. Von etwa 40 transfizierten Würmern zeigte nur ein adulter Wurm GFP-Signale. Eine Larve, die ebenfalls GFP-Signale exprimierte, entwickelte sich etwa im Stadium L2/L3 nicht weiter und wurde daher in diesem Stadium fotografiert. Trotz der einfachen Anatomie von *C. elegans* ist diese dennoch zu komplex, um hier detailliert beschrieben zu werden. Daher erfolgt lediglich eine Darstellung der für diese Untersuchung relevanten Abschnitte. Um die Lage der Signale einordnen zu können, ist in Abbildung 25 eine Übersicht über die Organisation des Nervensystems von *C. elegans* gegeben. In Abbildung 26 ist eine schematische Übersicht über den allgemeinen Aufbau des Pharynx dargestellt. Die GFP-Signale waren in beiden

Individuen hauptsächlich im Pharynx- und Analbereich lokalisiert. Die Abbildungen 28, 28a und 28b zeigen den Pharynxbereich des adulten Tieres. Abbildung 28 zeigt eine Darstellung mit normaler Beleuchtung, ohne GFP-Filter, die Abbildungen 28a und 28b zeigen das deckungsgleiche Bild (jeweils mit unterschiedlichem Fokus) unter Verwendung des GFP-Filters und Anregung bei 488 nm. Diese Form der Darstellung wird für die folgenden Bilder beibehalten.

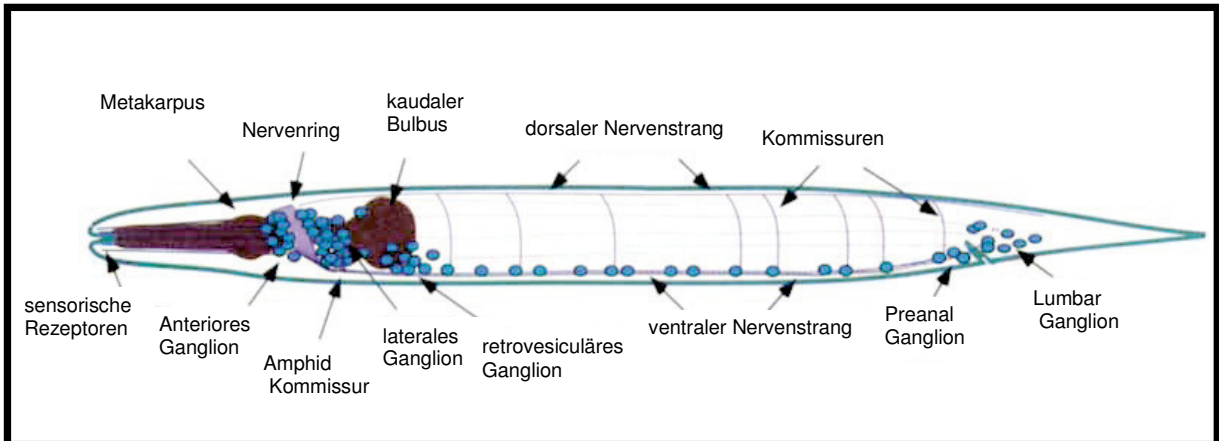


Abb.25: Schematische Darstellung des Nervensystems von *C. elegans*. Punkte in blau signalisieren Nervenzellen (Quelle: modifiziert nach Wadsworth et al., 1996).

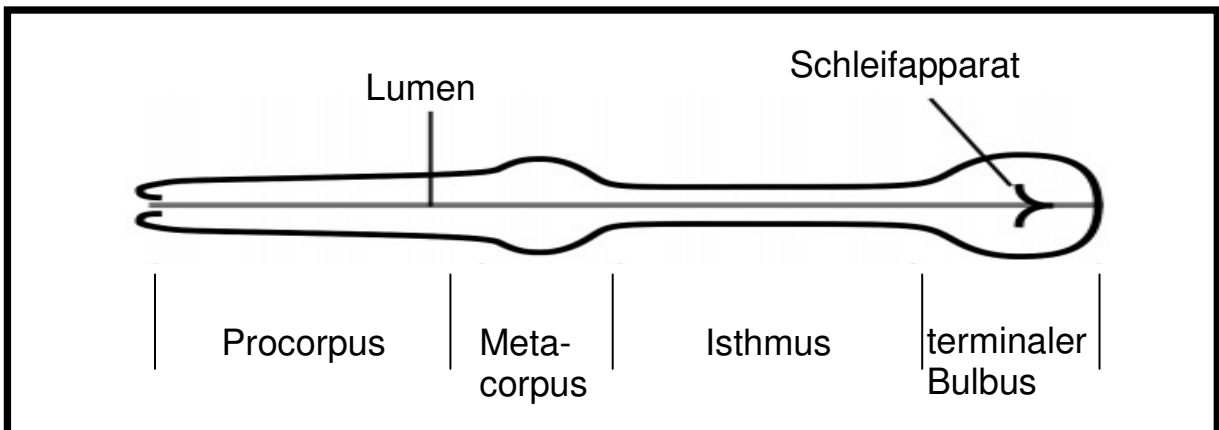


Abb. 26: Schematische Darstellung des Pharynx von *C. elegans* (Quelle: modifiziert nach Avery et al., 2003).

In Abbildung 28a können zwei deutliche einzelne, punktuelle Signale identifiziert werden, von denen jeweils eine schwache Linien fortführt. Außerdem sind noch vier weitere punktartige Signale zu erkennen, die in den folgenden Bildern genauer beschrieben werden. Ein Vergleich mit Abbildung 28 zeigt, dass die Expression im Bereich des Isthmus auftritt. Der punktartige Charakter der Signale deutet auf eine Expression in Neuronen hin, die an dieser Stelle im Bereich des Nervenrings gehäuft

auftreten. In Abbildung 28b ist auf eine andere Ebene des Pharynx fokussiert. Die beiden Signale aus dem vorherigen Bild sind hier etwas schwächer zu erkennen. Des Weiteren ist ein weiteres punktförmiges Signal am vorderen Rand des terminalen Bulbus zu erkennen. Auch bei diesem Signal könnte es sich um eine Expression in einer Nervenzelle handeln. Außerdem ist im unteren, rechten Kopfbereich eine signalgebende Struktur zu erkennen. Diese ist länglich und an dem einen Ende spitz zulaufend. Dies könnte ein Hinweis auf eine Expression in Muskelzellen sein. In Abbildung 27 ist der Pharynx von *C. elegans* mit seinen Muskelzellen dargestellt.

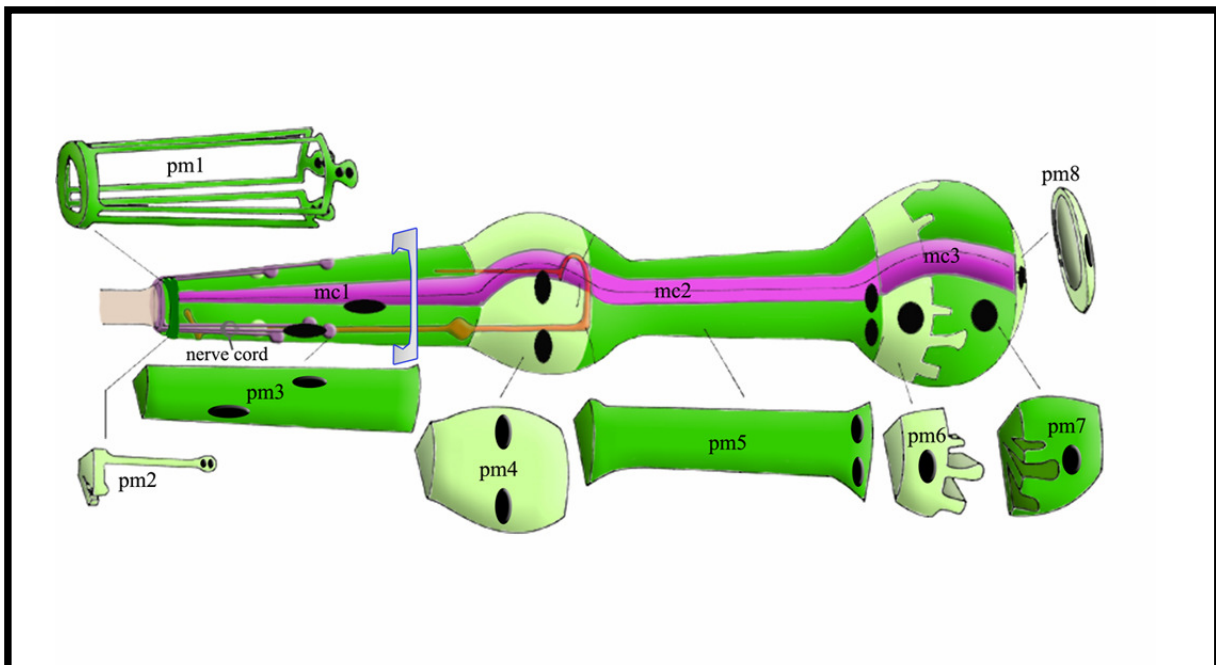


Abb. 27: Schematische Darstellung der Pharynxanatomie von *C. elegans*. Der Pharynx ist aus acht Schichten von Muskelzellen aufgebaut (grün, pm 1-8, pm1 = Synzytium), die durch strukturelle Marginalzellen separiert werden (violett, mc 1-3), schwarze Ellipsen: Zellkerne (Quelle: modifiziert nach Mango 2007).

In Abbildung 29a ist wiederum auf eine weitere Ebene fokussiert, auch hier ist eine punktuelle GFP-Expression im Bereich des Isthmus zu erkennen, die ebenfalls auf ein Neuron hinweist. Bei den kleineren länglichen GFP-Signalen nahe dieses Neurons könnte es sich um Fortsätze der Nervenzelle handeln. Außerdem sind auch hier in Richtung der Pharynxöffnung längliche Strukturen zu erkennen, die der Form und Lage nach auf Muskelzellen hindeuten. In Abbildung 30 ist die Analregion des Wurmes zu erkennen. Abbildung 30a zeigt wieder ein punktuellles GFP-Signal

(Neuron), außerdem sind auch hier zwei längliche Signale zu erkennen. In Abbildung 30b (andere Fokussierung) sind des Weiteren entlang des Hautmuskelschlauchs drei undeutliche Punkte zu erkennen, die miteinander verbunden sind, hierbei könnte es sich ebenfalls um Neuronen und deren Fortsätze handeln.

Die Abbildungen 31 und 31a zeigen den Pharynxbereich der Larve. In Abbildung 38a sind auch hier zwei punktuelle GFP-Signale zu sehen, die auf eine Expression in Neuronen hindeuten. Von einem dieser Punkte führt ein längliches Signal fort, dessen weiterer Verlauf dem Hautmuskelschlauch folgt. Die Abbildungen 32 und 32a zeigen den Analbereich der L2/L3. Bei den beiden punktartigen Signalen in Abbildung 32a handelt es sich vermutlich auch hier um eine Expression in Nervenzellen. Auch hier sind längliche Strukturen zu erkennen, bei denen es sich um Nervenstränge handeln könnte. Das großflächigere, undeutliche Signal in Richtung kaudal resultiert aus fluoreszierenden Darmbakterien.

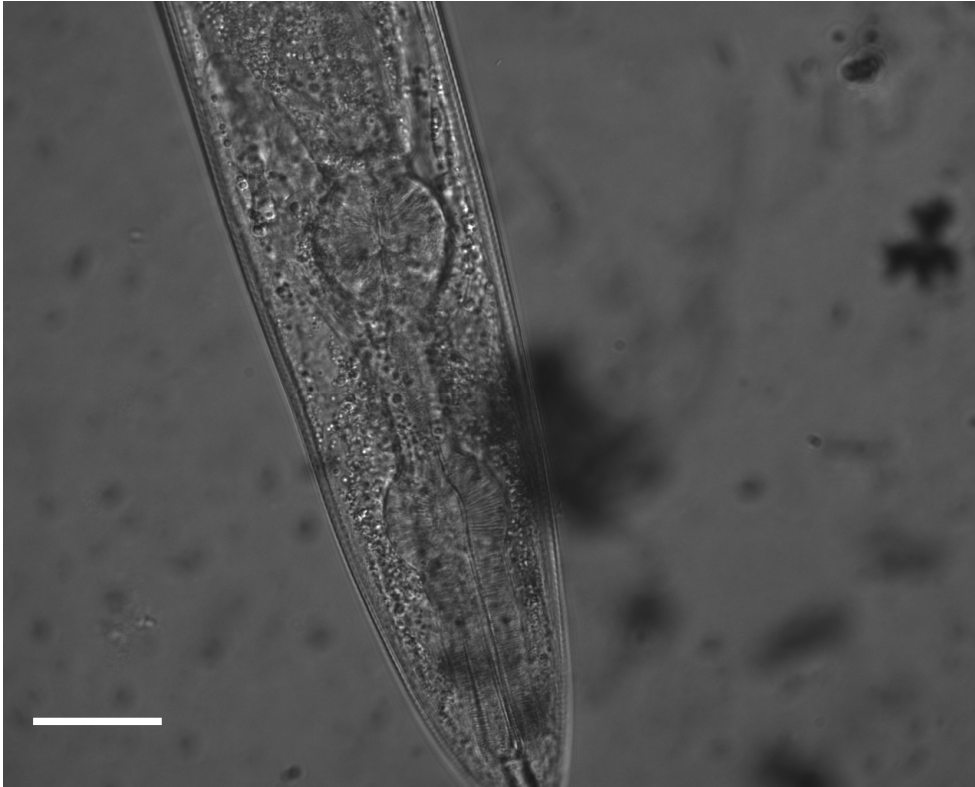


Abb. 28: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncopora* (Vergrößerung: 400 x, DIC, kein Filter, Balken: 40 μ m).

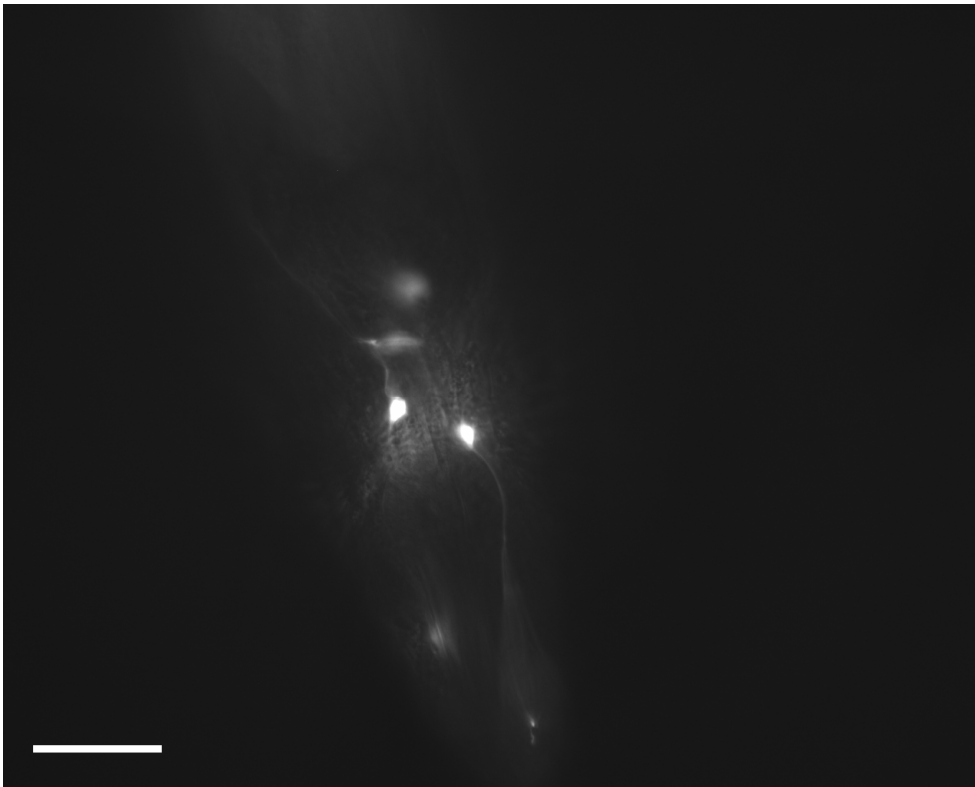


Abb. 28a: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncopora* (Vergrößerung: 400 x, Anregung 488nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m).

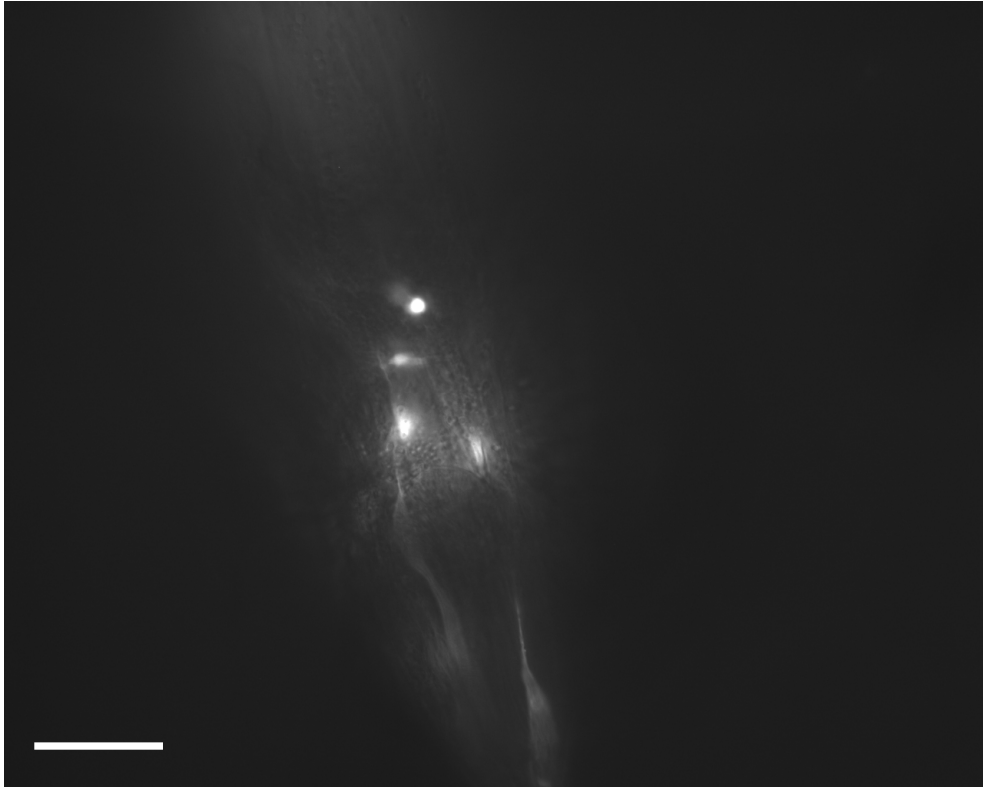


Abb. 28b: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, Anregung 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m).

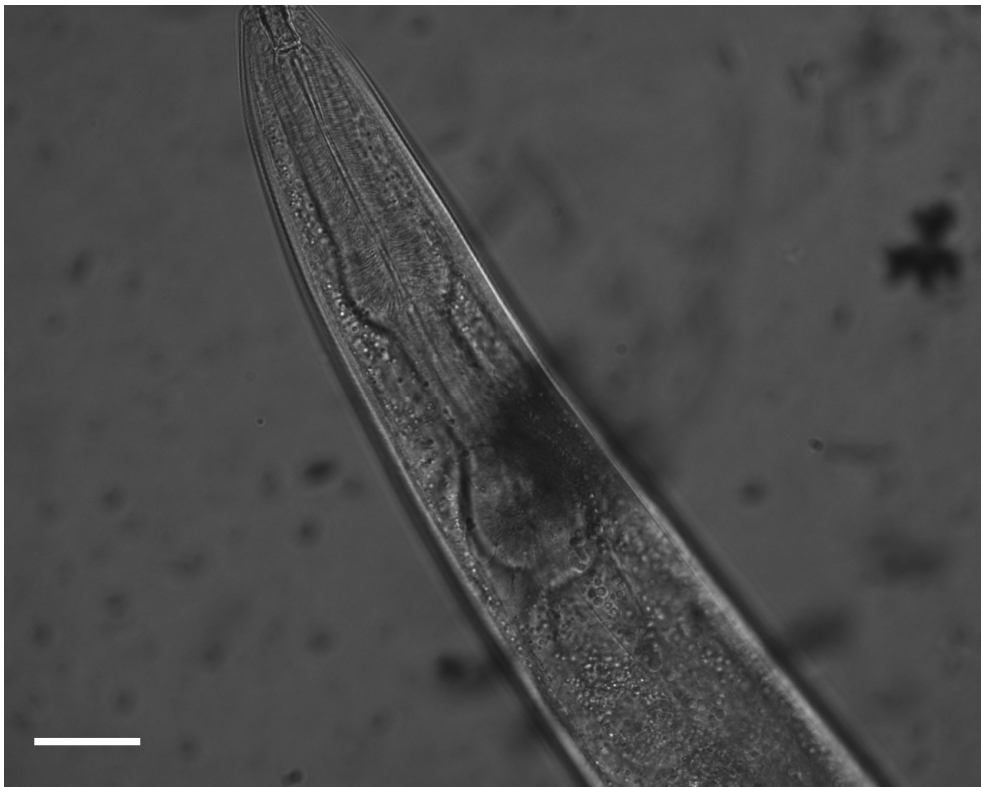


Abb. 29: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 40 μ m)

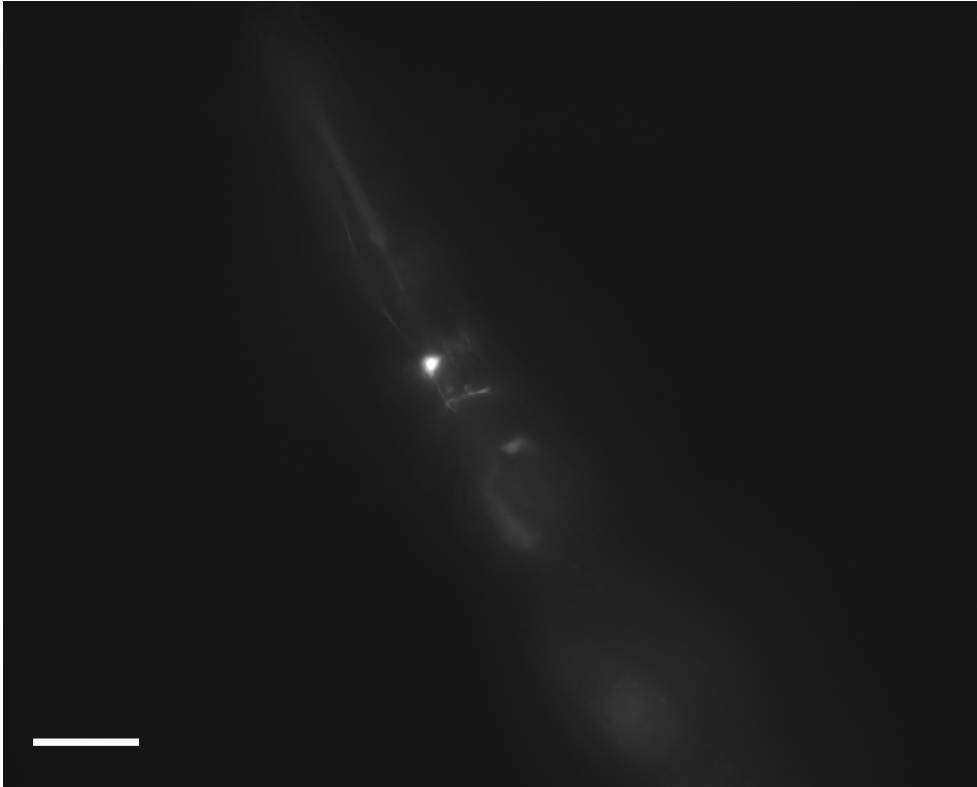


Abb. 29a: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, Anregung 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μm).

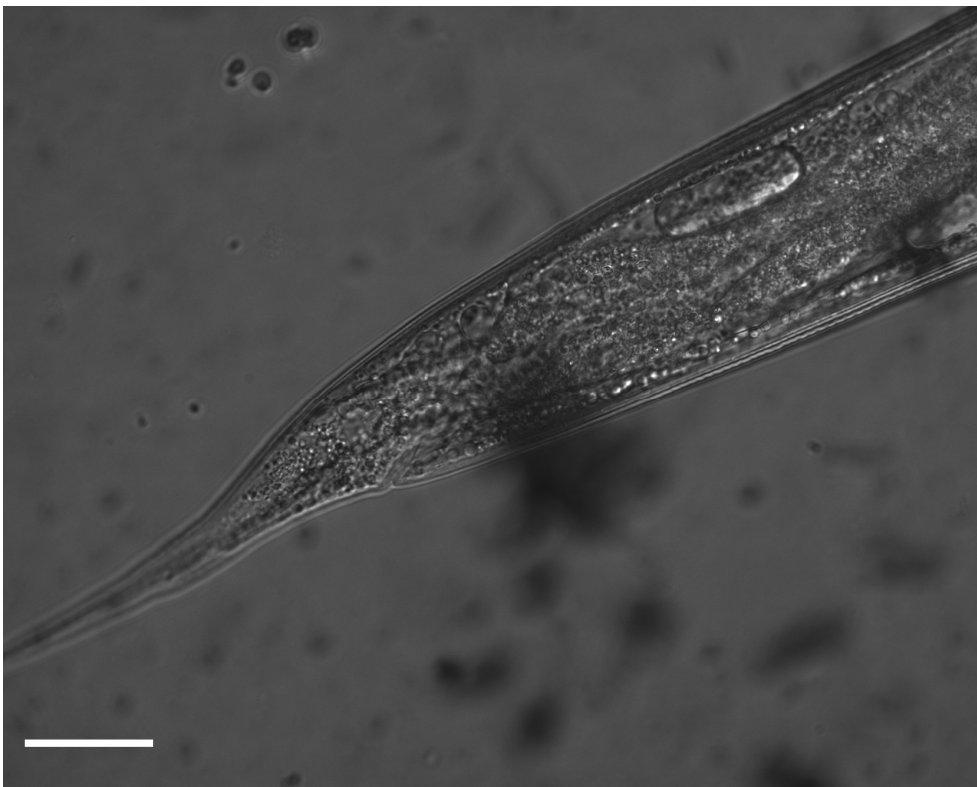


Abb. 30: Analregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 40 μm)

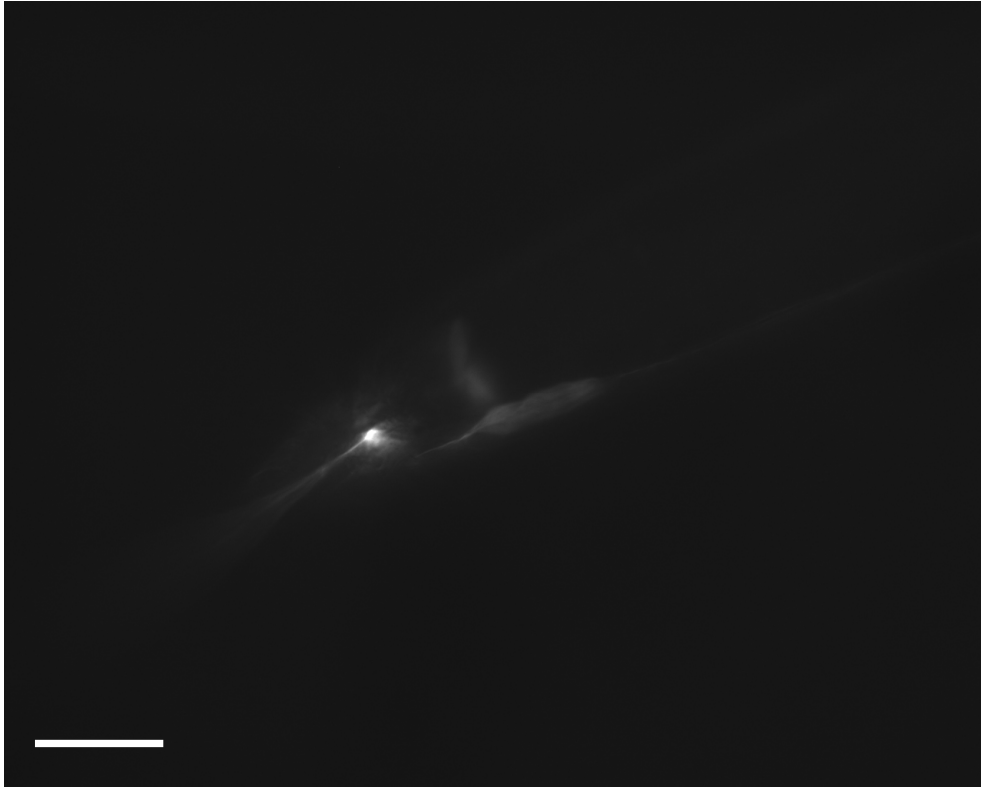


Abb. 30a: Analregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, Anregung 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m).

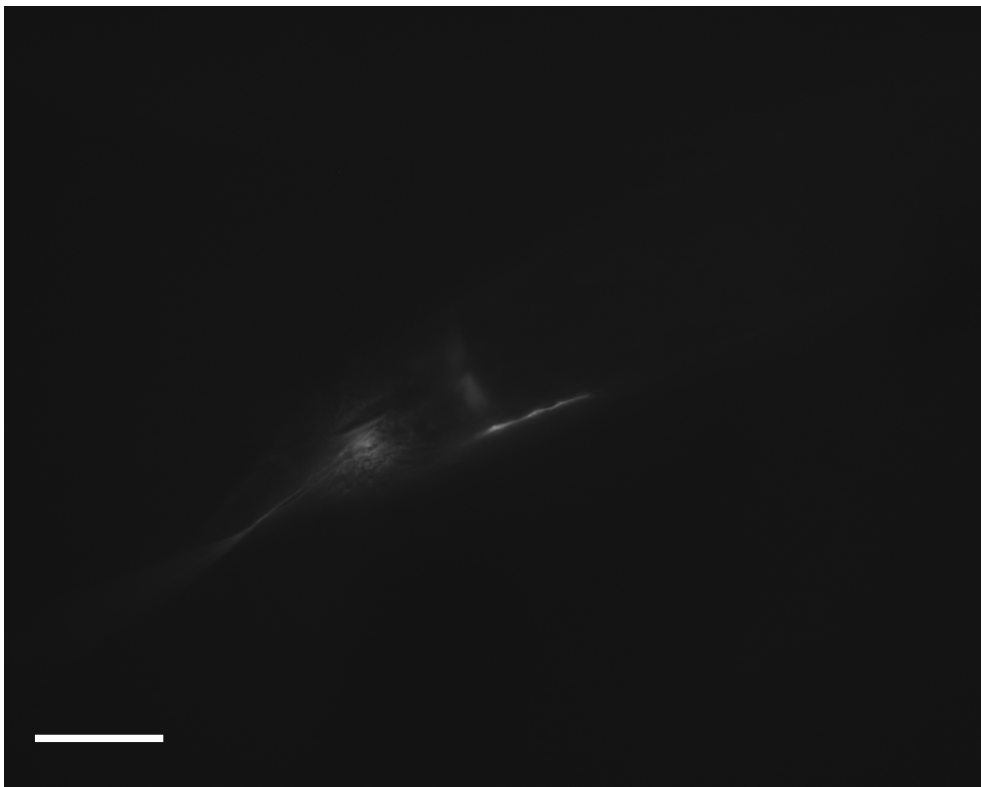


Abb. 30b: Analregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, Anregung 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m).

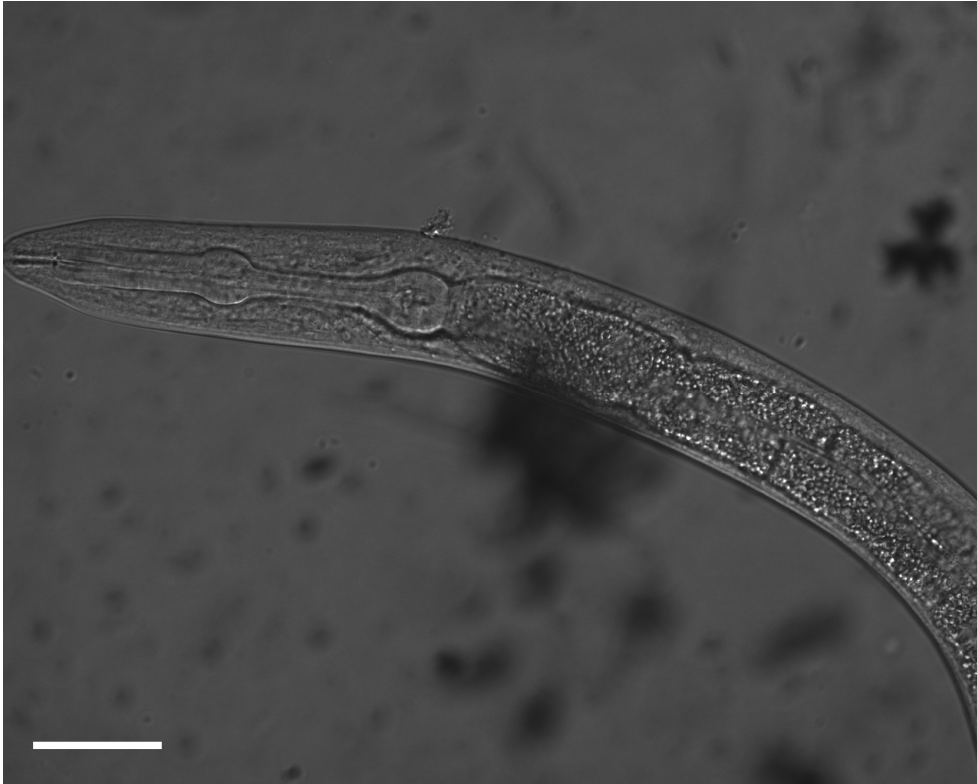


Abb. 31: Pharynxregion und vorderer Teil des Darms einer transgenen L2/L3 von *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 25 μ m)

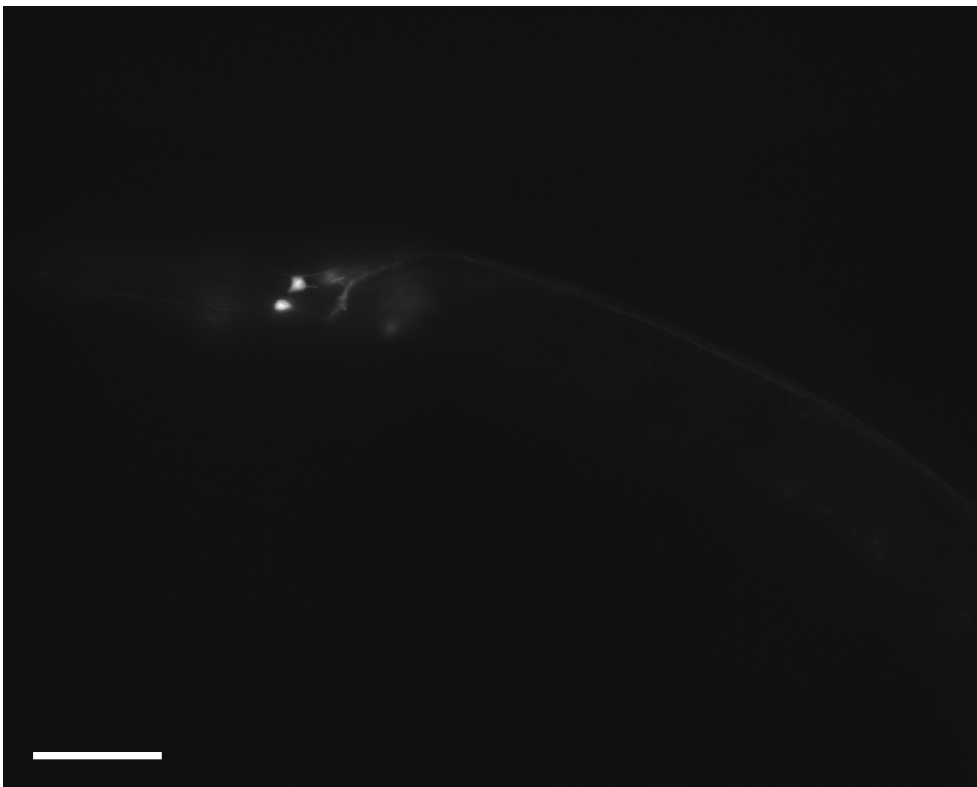


Abb. 31a: Pharynxregion und vorderer Teil des Darms einer transgenen L2/L3 von *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, Anregung 488 nm, GFP-Filter, Balken: 25 μ m).

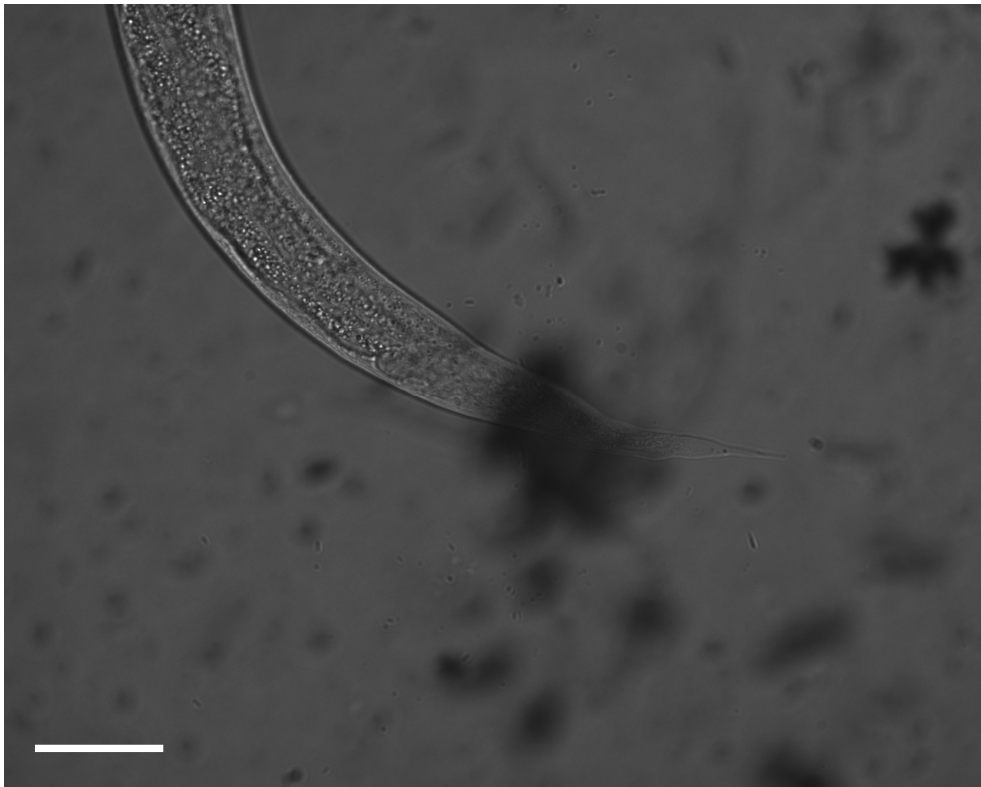


Abb. 32: Analregion einer transgenen L2/L3 von *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 25 μ m)

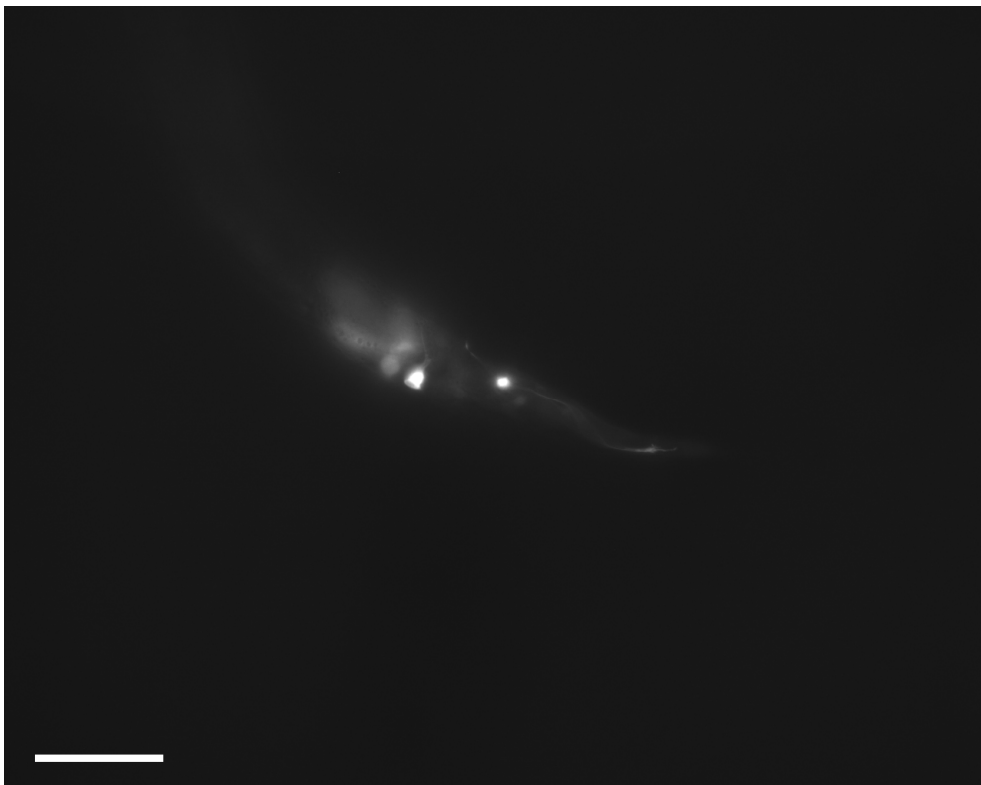


Abb. 32a: Analregion einer transgenen L2/L3 von *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des Depsiphilins von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, Anregung 488 nm, GFP-Filter, Balken: 25 μ m)

4.2 Der Calcium-gesteuerte Kaliumkanal SLO-1 (*slo-1*) von

A. caninum

Für *A. caninum* konnte ein Ortholog des Calcium-gesteuerten Kaliumkanals SLO-1 von *C. elegans* identifiziert werden. Mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) wurde in der Gendatenbank von nematode.net (Wylie et al., 2004) auf Grundlage der Nukleotidsequenz des *slo-1* von *C. elegans* spezifisch für *A. caninum* nach Übereinstimmungen gesucht. Es wurde ein Fragment aus einer *A. caninum* whole genome shot gun library (Acc. No.: CW974961) identifiziert, das signifikante Übereinstimmungen aufwies. Auf Basis dieses Fragments wurden Primer erstellt und mittels RACE die gesamte cDNA amplifiziert. Diese umfasst 4104 bp, inklusive der 5'- und 3'-UTR. Die reine kodierende Sequenz ist 3351 bp lang, die abgeleitete Aminosäuresequenz umfasst 1116 Aminosäuren. In der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ergab die Suche mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) mit der Funktion blastn (Vergleich auf Nukleotidebene) eine signifikante Übereinstimmung mit der SLOWpoke Kaliumkanal-Familie von *C. elegans* und *C. briggsae*. Bei der Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des SLO-1 von *A. caninum* mit der Funktion blastp (Vergleich auf Aminosäureebene) waren ebenfalls die Übereinstimmungen zu *C. elegans* und *C. briggsae* am größten (zwischen 85 und 87 %). Außerdem zeigten sich Übereinstimmungen zu SLOWpoke-Kanälen von Insekten und Kaliumkanälen vom gleichen Typ wie der der Säuger. Die Identitäten zu den entsprechenden Sequenzen der Insekten liegen um 65 %, die zu den Säugern um die 56 %.

4.2.1 Konservierte Domänen

Mittels des Programmes CDART der Datenbank NCBI (Marchler-Bauer und Bryant, 2004) wurden Voraussagen zur Proteinstruktur des SLO-1 von *A. caninum* getroffen. Mit Hilfe der Pfam Datenbank (Finn et al., 2006) wurden konservierte Proteindomänen identifiziert. Hierbei wurde in dem Bereich von Aminosäure (AS) 178 bis 349 eine Ionen-Transporter-Domäne identifiziert, die bei Natrium-, Kalium- und Calciumkanälen vorkommt. Des Weiteren wurde im Bereich der AS 498 bis 638 eine Domäne identifiziert, die einer α -Untereinheit eines Calcium-gesteuerten Kaliumkanals vom BK-Typ ähnlich ist. Auch für *C. elegans* SLO-1 werden diese Voraussagen getroffen. Abbildung 33 zeigt eine schematische Übersicht über die mögliche Proteinstruktur des SLO-1 von *A. caninum*.

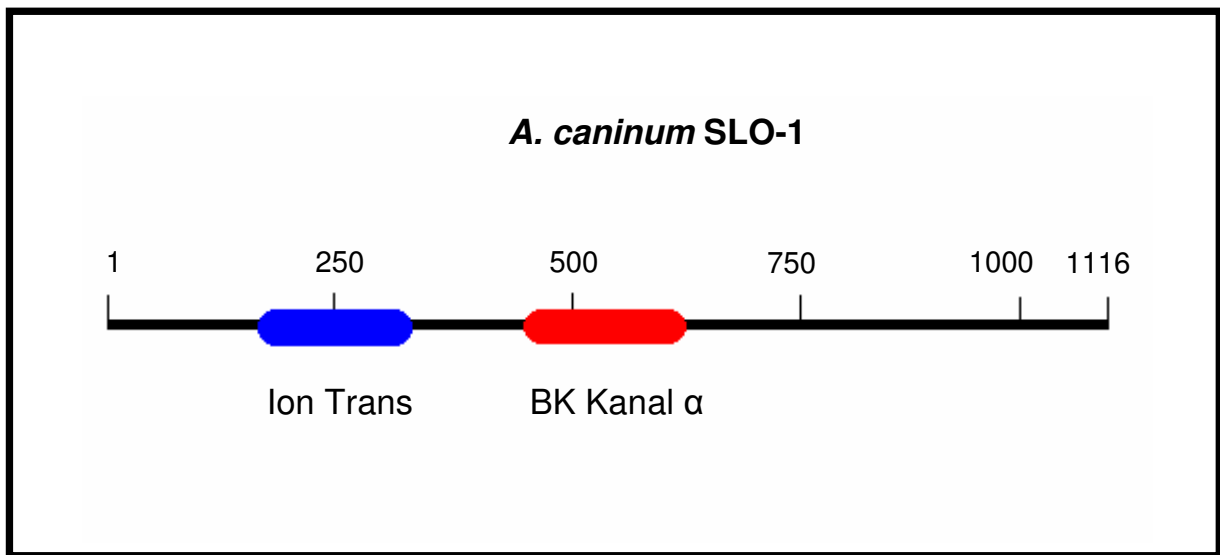


Abb. 33: Schematische Übersicht über die Proteinstruktur des SLO-1 von *A. caninum*. Die Zahlen markieren die Nummern der Aminosäuren. Die farbigen Felder markieren die identifizierten Domänen: **Ionen-Transporter**, **α-Untereinheit eines Calcium-gesteuerten Kaliumkanals vom BK-Typ**.

4.2.2 Untersuchungen zu Transmembranregionen und Signalpeptiden

Mit den verwendeten Programmen zur Vorhersage von Transmembranregionen und Signalpeptiden wurden für SLO-1 von *A. caninum* zwischen sechs und acht Transmembranhelices vorausgesagt, wobei drei Programme sieben TMHs und jeweils ein Programm sechs bzw. acht TMHs voraussagten. Signalpeptide wurden nicht detektiert, der NH₂-Terminus wurde bei drei Programmen als intrazellulär (COOH-Terminus extrazellulär), bei zwei Programmen extrazellulär (COOH-Terminus extrazellulär) vorausgesagt. Eine Übersicht über die Transmembranregionen und Signalpeptide von SLO-1, die von den verschiedenen Programmen vorausgesagt wurden, ist im Anhang im Abschnitt 7.1 Tabelle 8 gegeben.

4.2.3 Phylogenetische Analyse

Mittels der ClustalW Software wurden die Aminosäuresequenzen Calcium-gesteuerter Kaliumkanäle verschiedener Arten bzw. Tierstämme miteinander verglichen. Dabei zeigten die drei Varianten des SLO-1 von *C. elegans* (SLO-1a, b, c) Identitäten von 99 und 98 % zueinander. Zu SLO-1 der parasitischen Nematoden, *H. contortus*, *C. oncophora* und *A. caninum* wurden Identitäten zwischen 87 und

88 % ermittelt. Die Identitäten der Aminosäuresequenzen der Kaliumkanäle der Insekten betragen zu allen Nematoden 62 bis 65 %, die des Seehasen *Aplysia californica* 59 %, des Huhns *Gallus gallus* 54 bis 55 % und der Säuger zwischen 53 und 54 %. Auf Basis eines Alignments mit der Software ClustalX und BioEdit, wurde mit dem Programm Mega4 mittels des Neighbour Joining Verfahrens ein phylogenetischer Baum erstellt. Die statistische Signifikanz wurde durch eine Bootstrap-Analyse mit jeweils 1000 Replikaten durchgeführt. Im Dendrogramm in Abbildung 34 sind an den Verzweigungen der Äste nur die Bootstrap-Werte über 50 % angegeben. Es zeigt sich eine Gruppierung von SLO-1 der Nematoden, die durch Bootstrap-Werte von 99 bzw. 100 % unterstützt werden. Es werden hier jeweils die drei verschiedenen Spleißingvarianten des SLO-1 von *C. elegans* in einer Gruppe zusammengefasst. Von dieser abgeleitet, sind die SLO-1 Sequenzen der parasitischen Nematoden *A. caninum*, *C. oncophora* und *H. contortus* gruppiert. Des Weiteren sind in der nächsten Gruppe die SLO-1-Proteine der Insekten abgeleitet, es folgt der Molluske *Aplysia californica*, allerdings ohne eine gute Bootstrap-Unterstützung (unter 50 %). Am weitesten entfernt von den Nematoden ist der Kaliumkanal des Huhns (*Gallus gallus*) und die Gruppe der Säuger, auch hier ohne eine gute Bootstrap-Unterstützung.

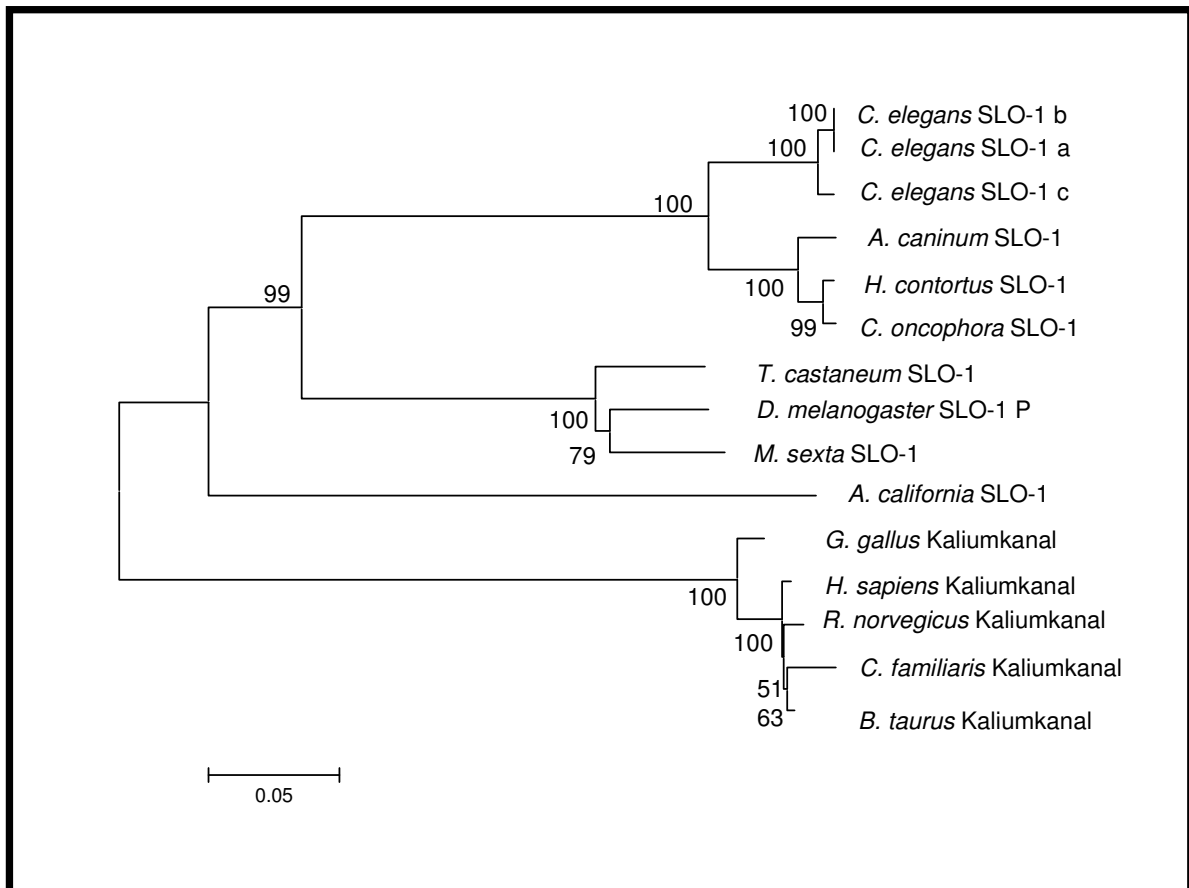


Abb. 34: Phylogenetischer Baum Calcium-gesteuerter Kaliumkanäle vom BK-Typ verschiedener Arten, erstellt mit dem Neighbour Joining Verfahren. Die Zahlen an den Ästen zeigen die Bootstrap-Werte in Prozent an (1000 Replikate). Der Balken zeigt die Anzahl der Substitutionen pro Mutationsort an. Die Accession numbers der verwendeten Sequenzen sind im Anhang unter Abschnitt 7.6 aufgeführt.

4.2.4 Promotorregion von *slo-1* von *A. caninum*

Mittels des Genome Walker™ Kits (BD Clontech) wurde eine mögliche Promotorregion des *A. caninum slo-1* amplifiziert. Diese ist 3677 bp lang und endet mit dem Startcodon. Mittels der Programme Genome2Promoter und MatInspector von Genomatix konnten keine spezifischen Promotorelemente oder Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert werden. Die manuelle Suche nach bekannten eukaryotischen Promotorelementen, wie der TATA-Box und der CAT-Box führte zu keinem Ergebnis. Auch ein Vergleich mit entsprechenden Promotorelementen von *C. elegans* brachte keine Übereinstimmungen. Es wurden zwei Konsensussequenzen mit der Basenfolge 5'-GGGCG-3' gefunden, die eventuell einen Hinweis auf RNA-Polymerase-Bindungsstellen geben. Diese sind an den Positionen -871 und -754 lokalisiert.

4.3 Heterologe Expression von SLO-1 in *C. elegans*

Um die Funktionalität von SLO-1 von *A. caninum* und *C. oncophora* nachzuweisen, wurden diese in *C. elegans slo-1* knockout Mutanten (*js379*) exprimiert. Dies geschah unter Verwendung von zwei verschiedenen Promotoren. Der Promotor *snb-1* führt zu einer Expression in Neuronen. Die eigens für diesen Versuch amplifizierte mögliche Promotorregion des *slo-1* von *C. elegans* ist in Abschnitt 4.3.1 beschrieben. Anschließend erfolgte eine Emodepsidexposition der transgenen Würmer und der jeweiligen Kontrollen sowie die Analyse ihrer jeweiligen Bewegungsaktivität.

4.3.1 *Caenorhabditis elegans slo-1*-Promotorregion

Auf Basis des YAC Klons Y51A2D, der die genomische *slo-1* Sequenz, sowie flankierende Gene beinhaltet, wurden genspezifische Primer für eine 3087 bp große mögliche Promotorregion entworfen. Das entsprechende Produkt wurde mittels der Programme Genome2Promoter und MatInspector von Genomatix auf mögliche spezifische Promotorelemente oder Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Mittels Genome2Promoter wurden 111 mögliche Promotorelemente identifiziert, die alle auf Basis von Vertebratenpromotoren analysiert wurden und die alle unterschiedliche Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Promotoren der Vertebraten aufweisen. Zu bekannten Promotorelementen von *C. elegans* gab es keine Übereinstimmungen. Es wurden keine spezifischen Elemente, wie z.B. eine TATA-Box, identifiziert, sondern lediglich Ähnlichkeiten zu Promotorelementen in Vertebraten festgestellt.

4.3.2 Expression von *slo-1* von *C. oncophora* in *C. elegans slo-1*-knockout-Mutanten unter dem *snb-1*-Promotor, Bewegungsassay nach Exposition mit 10 μ M Emodepsid

Es wurden etwa 40 adulte hermaphrodite *C. elegans* mit den in Abschnitt 3.23.1 (Abbildung10) beschriebenen Konstrukten Ac pBK3.1 und Co pBK3.1 und dem Marker pPD118.33 transfiziert. Es entstanden hieraus 7 stabile Wurmlinien mit Ac pBK3.1 und 12 mit Co pBK3.1. Hieraus wurde für Ac pBK3.1 eine Linie ausgewählt, bei der ein hoher Anteil (geschätzt über 50 %) der Nachkommenschaft transgen war. Die Transgenität wurde anhand des co-exprimierten Marker Gens, hier GFP im Pharynx, festgestellt. Für Co pBK3.1 wurden zwei dieser Linien ausgewählt. Die Würmer dieser Linien wurden anschließend für die Emodepsidexposition und den

folgenden Aktivitätsassay ausgewählt. Kontrollen wurden, wie in Abschnitt 3.23.9 und 3.23.10 beschrieben mitgeführt. Zum Auszählen der *body bends*/min wurde jeweils nacheinander ein Wurm aus jeder Gruppe untersucht, um eventuelle tageszeitlich bedingte Temperaturschwankungen auszugleichen, die die Bewegungsaktivität beeinflussen könnten. Die absoluten Werte der gezählten *body bends*/min sind im Anhang unter Abschnitt 7.3 aufgeführt. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung der *body bends*/min einer jeden Linie berechnet. Signifikanzen der Ergebnisse wurden unter Verwendung der One way Analysis of Variance (ANOVA) mit anschließendem Dunn's Test des Programms SigmaStat (Jandel Scientific) berechnet. Lediglich für die Daten aus dem Assay mit dem Ac pBK3.1 (*A. caninum slo-1*-Expression unter dem *snb-1*-Promotor) wurde an die ANOVA anschließend der Holm-Sidak-Test angewendet. Sämtliche Daten wurden jeweils auf die Kontrollen Wildtyp N2 sowie *slo-1*-knockout *js379* bezogen. Um grundsätzlich die funktionale Expression von *slo-1* von *A. caninum* und *C. oncophora* nachzuweisen wurde zunächst eine Exposition der entsprechenden transfizierten Würmer auf NGM-Platten mit einer Emodepsidkonzentration von 10 μ M durchgeführt. Hierbei konnte nur der Versuch mit Co pBK3.1. Würmern ausgewertet werden, da nachträglich ein Fehler im Plasmid von Ac pBK3.1 festgestellt wurde, der vor den weiteren Versuchen (s. Abschnitt 4.3.3 ff) behoben wurde. In allen folgenden Versuchen wurde das unter Abschnitt 3.23.1 (Abbildung 10) beschriebene Konstrukt verwendet. Es zeigte sich eine signifikante ($p < 0,05$) Verminderung der Bewegungsaktivität der transfizierten Würmer im Vergleich zu den Kontrollen. Die Rohdaten aller Assays sind dem Anhang (Abschnitt 7.3) zu entnehmen.

4.3.3 Expression des *slo-1* von *A. caninum* und *C. oncophora* in *C. elegans slo-1*-knockout-Mutanten unter dem *snb-1*-Promotor, Bewegungsassay nach Exposition mit 1nM-10 μ M Emodepsid

Nachdem mittels des in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Versuchs nachgewiesen worden war, dass eine funktionale Expression von *slo-1* von *C. oncophora* in *C. elegans* möglich ist, sollte festgestellt werden, ob es einen dosisabhängigen Effekt von Emodepsid auf die transfizierten Würmer gibt. Da die ermittelten Werte für die jeweiligen transgenen *js379*-Linien mit *A. caninum slo-1* bzw. *C. oncophora slo-1* sehr ähnlich waren, werden die Ergebnisse in Folgenden zusammengefasst. Es konnte für den emodepsidresistenten *C. elegans slo-1* knockout-Stamm *js 379* für

keine der eingesetzten Dosen eine Änderung der Bewegungsaktivität verzeichnet werden. Die Mittelwerte der *body bends*/min bewegten sich im Allgemeinen zwischen 26 und 27 *body bends*/min. Die Mittelwerte für die *body bends*/min des Wildtyps N2 auf der Kontrollplatte ohne Emodepsid lagen zwischen 26 und 27 *body bends*/min. Ähnliche Werte waren bei 1 nM und 10 nM Emodepsid zu verzeichnen. Es zeigte sich zuerst bei einer Konzentration von 100 nM Emodepsid eine signifikante ($p < 0,05$) Verminderung der Bewegungsaktivität, diese war hier bereits auf 13 bis 14 *body bends*/min reduziert. Bei einer Emodepsidkonzentration von 1 μ M lagen die Werte nur noch bei 6-7 *body bends*/min, bei 10 μ M bei 0-2 *body bends*/min. Die Bewegungsaktivität sinkt also signifikant mit der Zunahme der Emodepsidkonzentration von 100 nM bis 10 μ M. Es kann also ein dosisabhängiger Effekt des Emodepsids auf den Wildtypstamm N2 verzeichnet werden. Die Bewegungsaktivität der transgenen Linien ist, ebenfalls abhängig von der eingesetzten Dosis, im Vergleich zu den Kontrollen vermindert. Für die Emodepsidkonzentrationen 1 nM und 10 nM wurden noch etwa 26-28 *body bends*/min ermittelt. Vergleichbar mit den ermittelten *body bends*/min für den Wildtyp, trat für die transgenen Linien ein erster messbarer Effekt bei einer Konzentration von 100 nM Emodepsid auf. Hier lagen die Werte bei 21-22 *body bends*/min, bei 1 μ M Emodepsidkonzentration um 15-16 *body bends*/min und bei 10 μ M bei 12-13 *body bends*/min. Diese Änderung der Aktivität ist im Vergleich zu dem *C. elegans slo-1* knockout-Stamm *js 379* und den Ethanol-Kontrollen signifikant. Es ist also ein dosisabhängiger Effekt des Emodepsids auf die transgenen *C. elegans slo-1*-knockout-Würmer zu verzeichnen, der zwar nicht die Stärke hat, wie für den Wildtyp, aber dennoch signifikant ist ($p < 0,05$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 und 36 dargestellt.

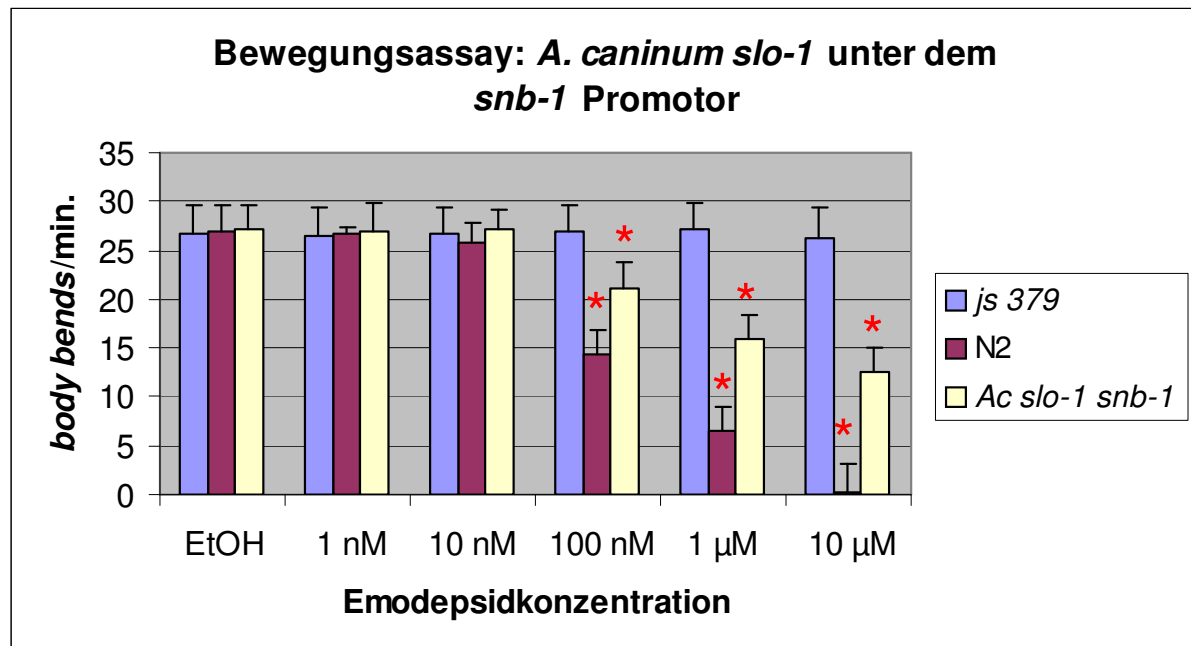


Abb. 35: Ergebnisse des dosisabhängigen Emodepsid-Bewegungsassays mit transgenen *C. elegans js 379 Ac slo-1 snb-1*. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der *body bends/min.* Auf der X-Achse sind die verschiedenen Emodepsidkonzentrationen, sowie die Ethanol (EtOH)-Kontrolle aufgetragen. * kennzeichnet die Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen den Werten für die *body bends/min.* für den jeweiligen Stamm im Vergleich zu *C. elegans slo-1* knockout *js 379*, Wildtyp N2 auf EtOH sowie *Ac slo-1 snb-1* auf EtOH.

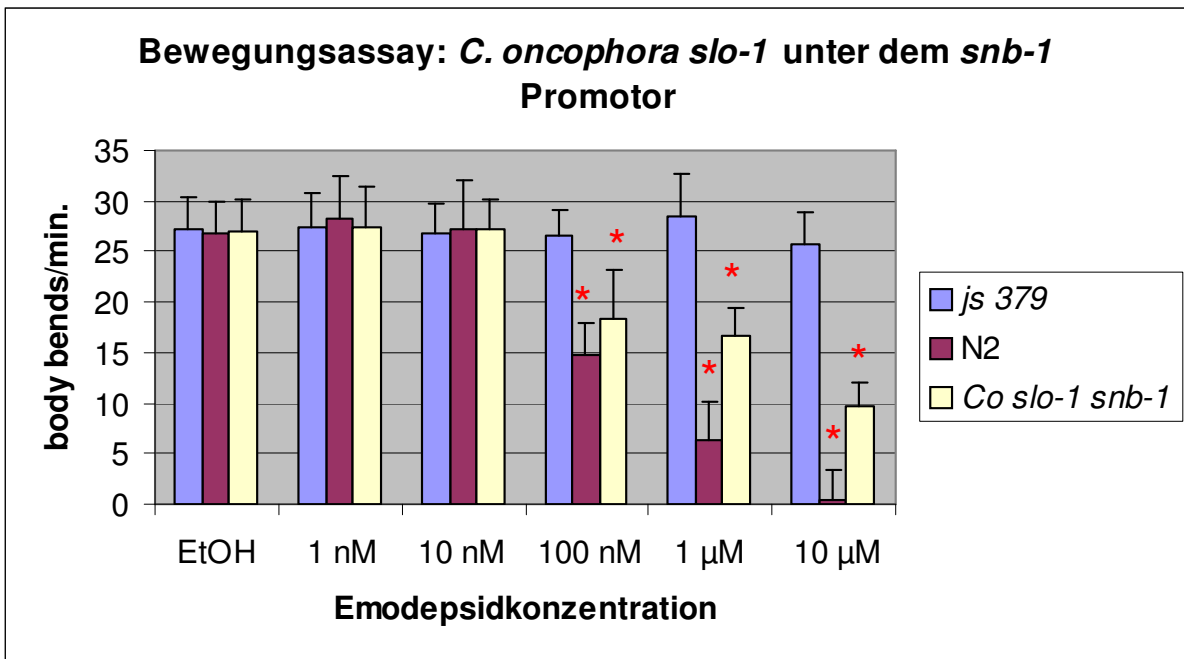


Abb. 36: Ergebnisse des dosisabhängigen Emodepsid-Bewegungsassays mit transgenen *C. elegans js 379 Co slo-1 snb-1*. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der *body bends/min.* Auf der X-Achse sind die verschiedenen Emodepsidkonzentrationen, sowie die Ethanol (EtOH)-Kontrolle aufgetragen. * kennzeichnet die Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen den Werten für die *body bends/min.* für den jeweiligen Stamm im Vergleich zu *C. elegans slo-1* knockout *js 379*, Wildtyp N2 auf EtOH sowie *Co slo-1 snb-1* auf EtOH.

4.3.4 Expression von *slo-1* von *A. caninum* und *C. oncophora* unter dem putativen 3 kb *C. elegans slo-1*-Promotor, dosisabhängiger Effekt

Um ein möglichst natürliches Expressionsmuster von *slo-1* zu erreichen, wurde eine 3 kb große mögliche Promotorregion von *C. elegans slo-1* als Promotor für *slo-1* von *A. caninum* und *C. oncophora* getestet. Da diese bis dahin auch für die Expression von *C. elegans slo-1* in *js379* noch nicht verwendet worden war, wurde dies ebenfalls durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37-39 zusammengefasst. Die Werte der *body bends/min.* für den emodepsidresistenten *C. elegans js 379*-Stamm. lagen in allen Assays bei allen Konzentrationen zwischen 26 und 27. Für den Wildtyp N2 ist analog zu Abschnitt 4.3.3 ab einer Emodepsidkonzentration von 100 nM ein Effekt zu erkennen. Die Bewegungsaktivität liegt hier zwischen 14 und 15 *body bends/min.* Bei 1 µM Emodepsid ist diese bereits auf 6-7 *body bends/min.* verringert und bei 10 µM Emodepsid waren die meisten Würmer komplett bewegungsunfähig bzw. tot (0-1 *body bends/min.*). Für die transgenen Linien von *C. elegans slo-1* knockout *js379* mit

A. caninum slo-1 bzw. *C. oncophora slo-1* unter dem putativen 3 kb *C. elegans slo-1* Promotor, sind die Werte fast analog zu den Werten des Wildtyps N2, sie liegen für 100 nM Emodepsid zwischen 15 und 16, bei 1 μ M Emodepsid zwischen 5 und 7 *body bends*/min und bei 10 μ M Emodepsid ist die Aktivität auf 0-1 *body bends*/min reduziert. Da diese Werte mit denen des Wildtyps N2 fast identisch sind (die Unterschiede zu den Werten des Wildtyps sind nicht signifikant), kann hier phänotypisch von einer kompletten Wiederherstellung des Wildtyps ausgegangen werden.

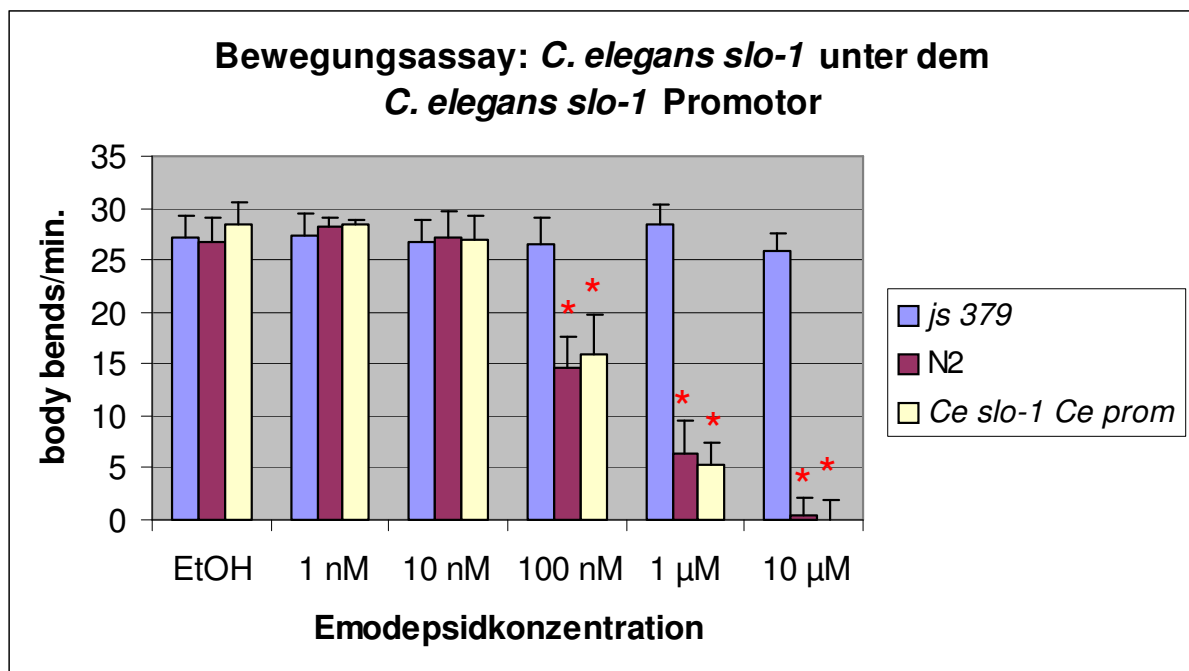


Abb. 37: Ergebnisse des dosisabhängigen Emodepsid-Bewegungsassays mit transgenen *C. elegans js 379 Ce slo-1 Ce prom*. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der *body bends*/min. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Emodepsidkonzentrationen, sowie die Ethanol (EtOH)-Kontrolle aufgetragen. * kennzeichnet die Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen den Werten für die *body bends*/min für den jeweiligen Stamm im Vergleich zu *C. elegans slo-1* knockout *js 379*, Wildtyp N2 auf EtOH sowie *Ce slo-1 Ce prom* auf EtOH.

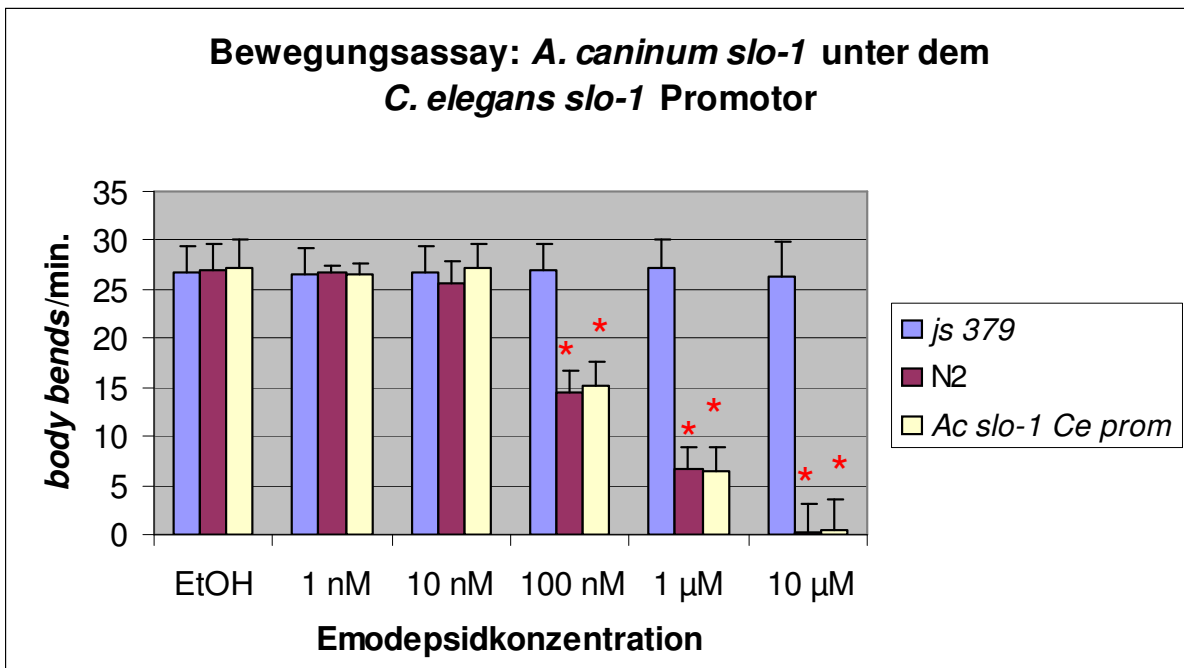


Abb. 38: Ergebnisse des dosisabhängigen Emodepsid-Bewegungsassays mit transgenen *C. elegans js 379 Ac slo-1 Ce prom*. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der *body bends/min.* Auf der X-Achse sind die verschiedenen Emodepsidkonzentrationen, sowie die Ethanol (EtOH)-Kontrolle aufgetragen. * kennzeichnet die Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen den Werten für die *body bends/min.* für den jeweiligen Stamm im Vergleich zu *C. elegans slo-1* knockout *js 379*, Wildtyp N2 auf EtOH sowie *Ac slo-1 Ce prom* auf EtOH.

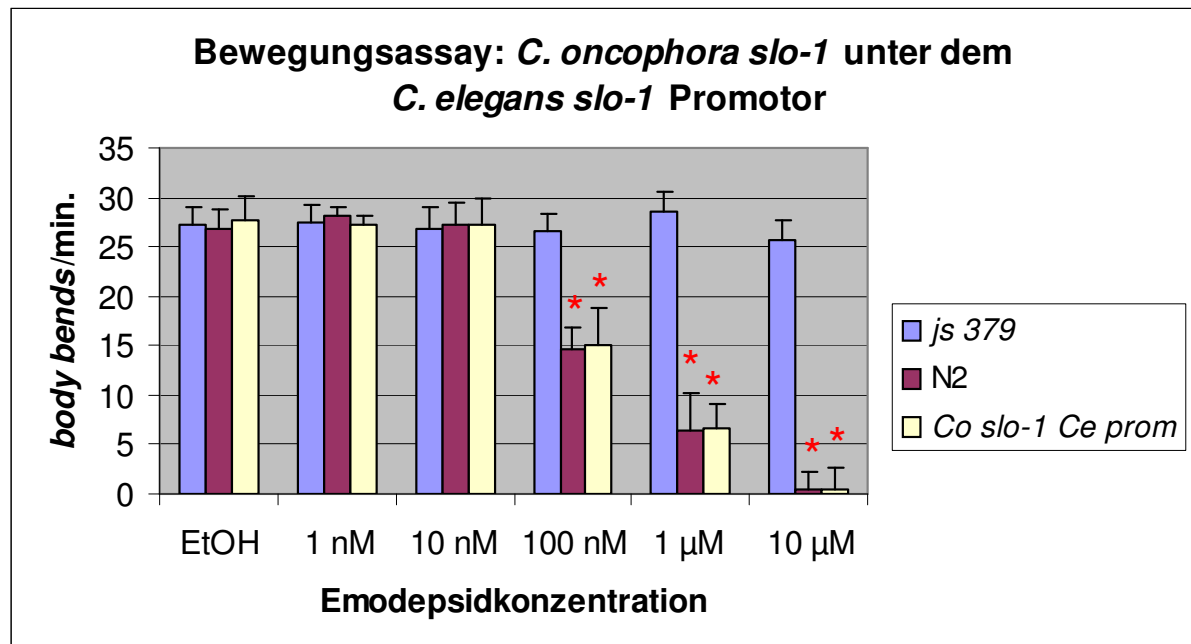


Abb. 39: Ergebnisse des dosisabhängigen Emodepsid-Bewegungsassays mit transgenen *C. elegans js 379 Co slo-1 Ce prom*. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der *body bends/min.* Auf der X-Achse sind die verschiedenen Emodepsidkonzentrationen, sowie die Ethanol (EtOH)-Kontrolle aufgetragen. * kennzeichnet die Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen den Werten für die *body bends/min.* für den jeweiligen Stamm im Vergleich zu *C. elegans slo-1* knockout *js 379*, Wildtyp N2 auf EtOH sowie *Co slo-1 Ce prom* auf EtOH.

4.3.5. *slo-1*-Promotor gesteuerte GFP-Expression in *C. elegans*

Wie für Depsiphilin wurde auch für *slo-1* eine Untersuchung zur Lokalisation der Expression mittels GFP-Reporterkonstrukt durchgeführt. Außerdem wurde die schon für die Emodepsidassays eingesetzte Promotorregion des *slo-1* von *C. elegans* ebenfalls in ein GFP-Reporterkonstrukt ligiert und transfiziert.

4.3.5.1 *C. elegans slo-1*-Promotor gesteuerte GFP-Expression in *C. elegans*

Es wurden etwa 40 hermaphrodite *C. elegans* transfiziert. Ähnlich dem Versuch mit dem Depsiphilin GFP-Reporterkonstrukt, zeigte auch hier nur ein adultes Tier GFP-Expression. In den Abbildungen 40 und 40a ist der Pharynxbereich des transgenen Tieres dargestellt. Es ist eine starke punktuelle GFP-Expression im Bereich des Isthmus zu erkennen, außerdem einige schwächere, undeutliche Signale, bei denen es sich um Muskelzellen handeln könnte. Lage und Art der punktuellen Expression weisen auch hier auf eine Expression in Neuronen hin. Von dem starken Signal führt

auch hier ein fadenförmiges Signal in Richtung der Pharynxöffnung fort. Der hell strahlende Bereich am rechten Rand des Wurmes kann nicht genau zugeordnet werden. Abbildung 41 und 41a stellen den hinteren Teil des Pharynx mit dem terminalen Bulbus und dem Beginn des Darmes dar. Die hier sichtbare Expression ist eindeutig drei Muskelzellen zuzuordnen. Die Form und Lage sprechen für Muskelzellen des Hautmuskelschlauchs. Die Abbildungen 42 und 42a zeigen den Analbereich des Wurms. Auch hier sind punktförmige GFP-Signale zu erkennen, zudem noch ein eher längliches Signal, dass mit den anderen in Verbindung zu stehen scheint. Auch hier ist zu vermuten, dass es sich um eine Expression in Neuronen und deren Ableitungen handelt.

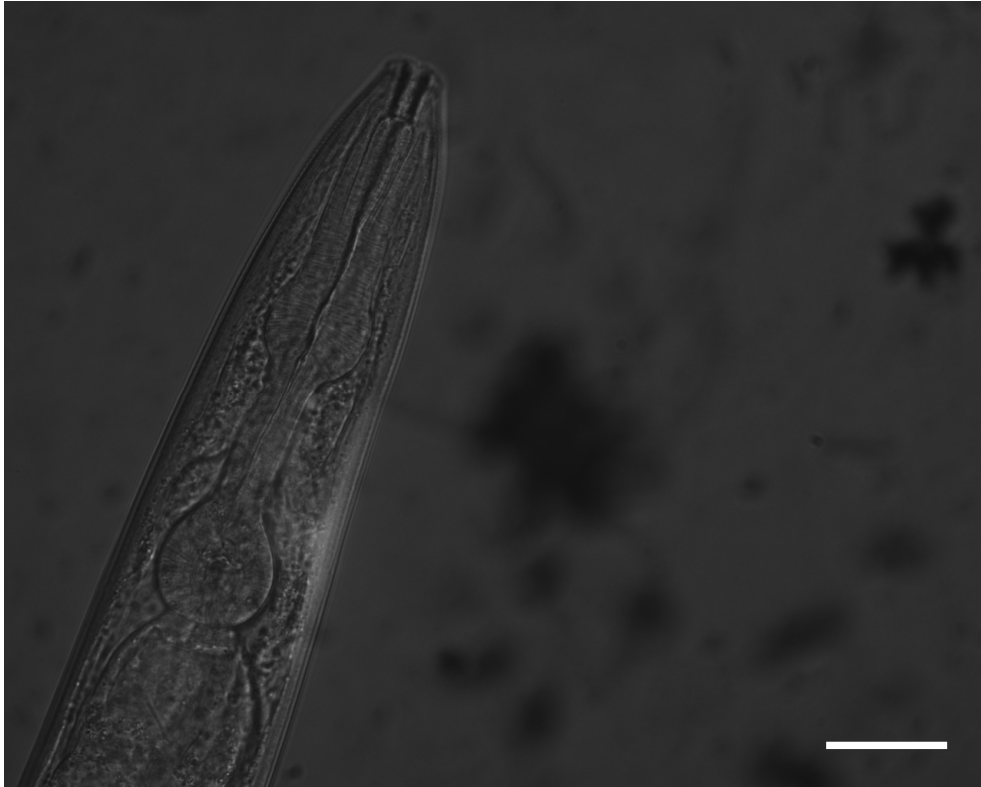


Abb. 40: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. elegans* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 40 μ m)

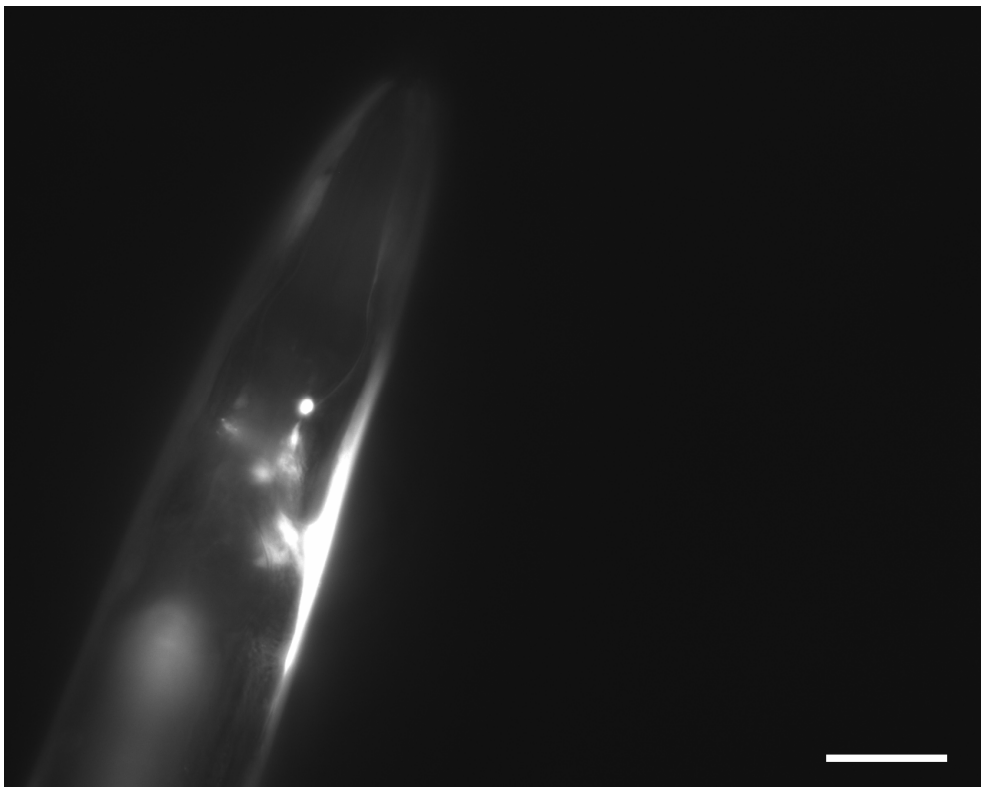


Abb. 40a: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. elegans* (Vergrößerung: 400 x, Anregung 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

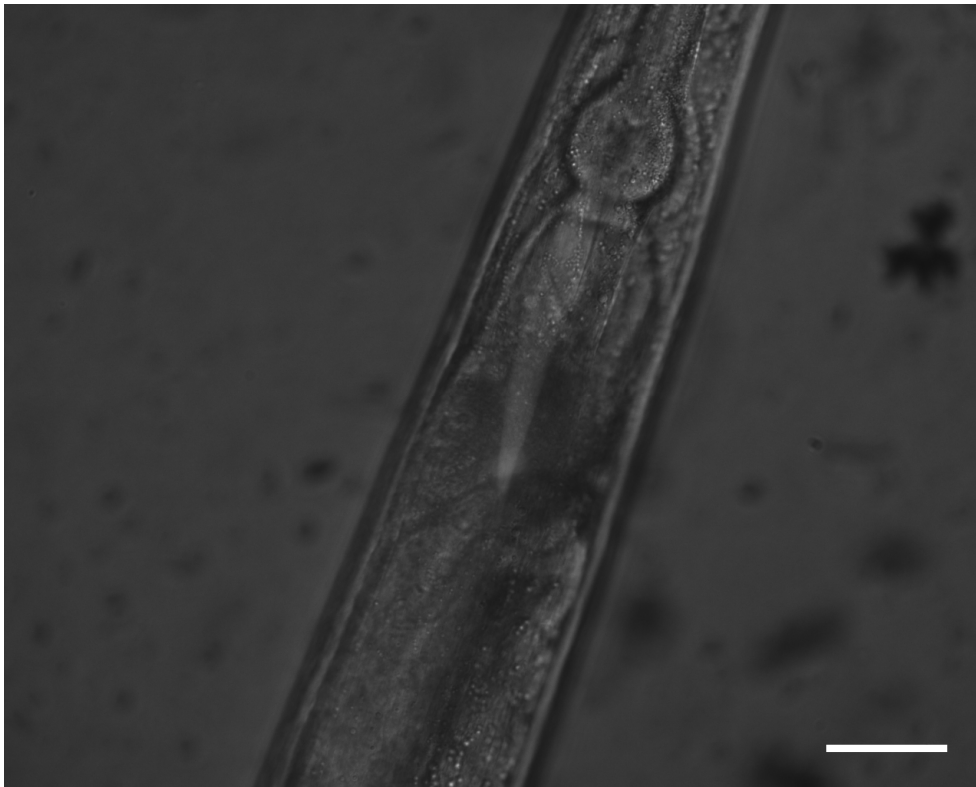


Abb. 41: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. elegans* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 40 μ m)

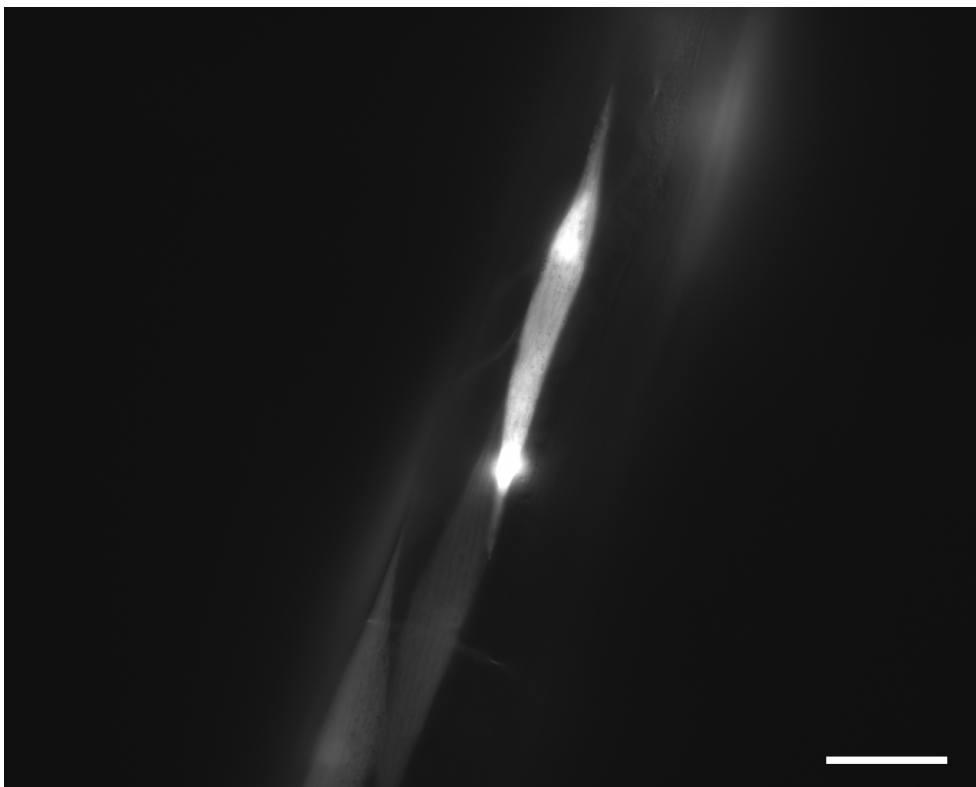


Abb. 41a: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. elegans* (Vergrößerung: 400 x, Anregung 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

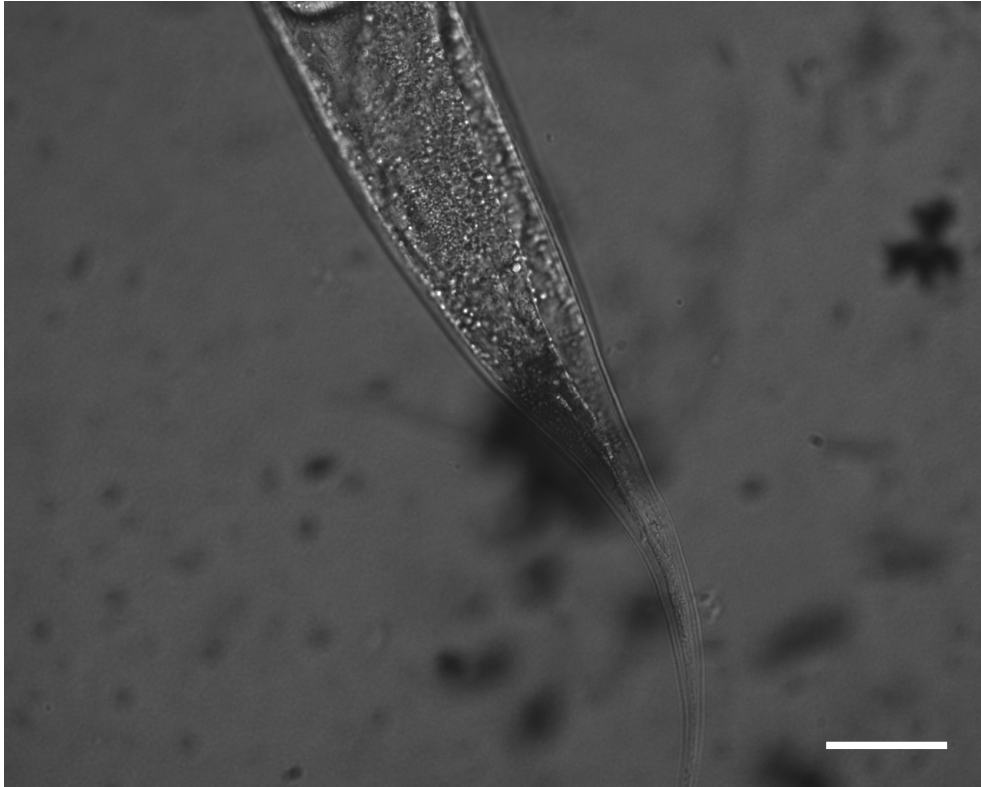


Abb. 42: Analregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. elegans* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 40 μ m)

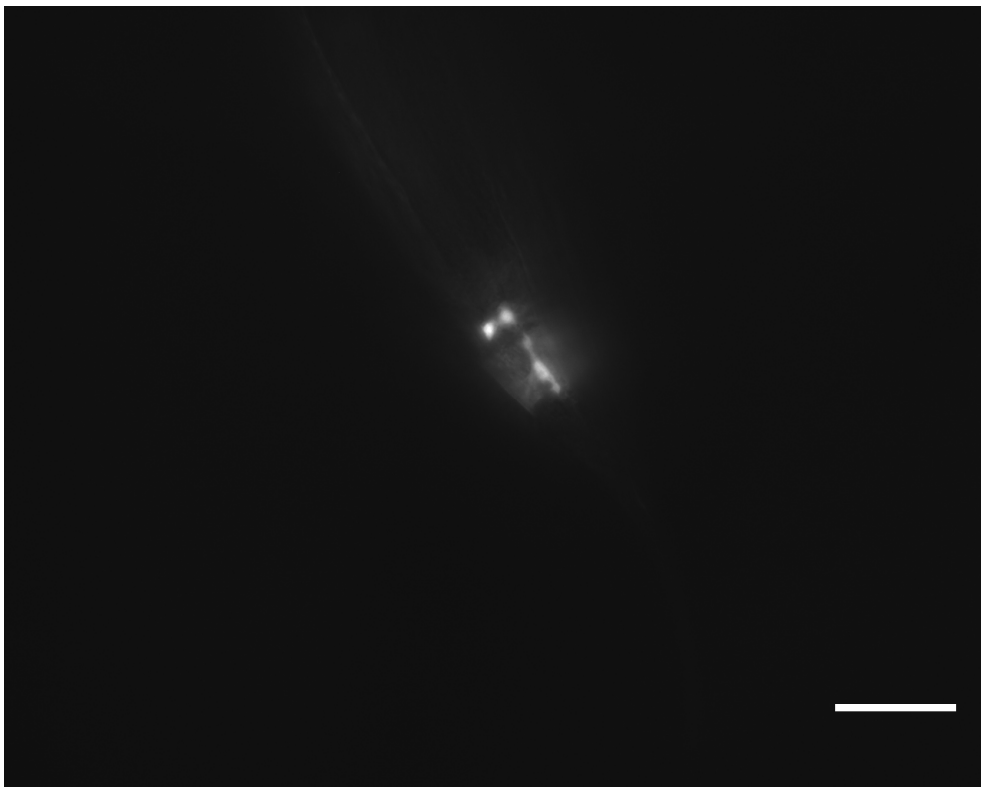


Abb. 42a: Analregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. elegans* (Vergrößerung: 400 x, Anregung 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

4.3.5.2 *Ancylostoma caninum slo-1*-Promotor gesteuerte GFP-Expression in *C. elegans*

Auch bei der Transfektion mit dem *A. caninum slo-1*-Promotor GFP-Reporterkonstrukt, wiesen von etwa 40 transfizierten Tieren nur zwei adulte Tiere eine GFP-Expression auf. In den Abbildungen 43, 43a und 43b ist der Pharynxbereich des ersten Wurmes dargestellt. Im Bereich des Isthmus bzw. am hinteren Rand des Metacorpus ist auch hier eine punktförmige Expression des GFP zu erkennen, von der aus eine kurze, fadenförmige Struktur fortführt. Bei den undeutlichen, großflächigeren, schwach fluoreszierenden Regionen kaudal des Pharynx, handelt es sich um Darminhalt. Die Abbildungen 44 bzw. 44a zeigen den Pharynxbereich des zweiten Tieres mit einer punktuellen Expression an etwa der gleichen Stelle wie im ersten Tier. In beiden Tieren erfolgte die sichtbare Expression nur im Pharynxbereich. Im Analbereich oder anderen Regionen der Tiere war dagegen kein GFP-Signal zu erkennen.

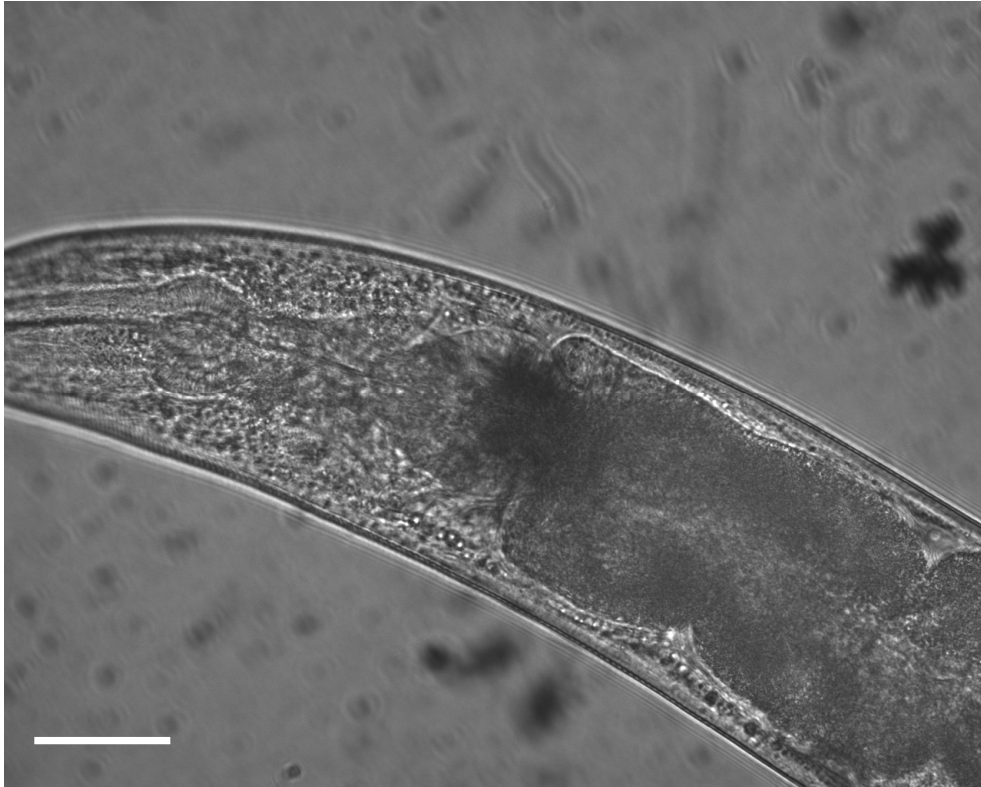


Abb. 43: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* (Tier 1) mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *A. caninum* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 40 μ m)

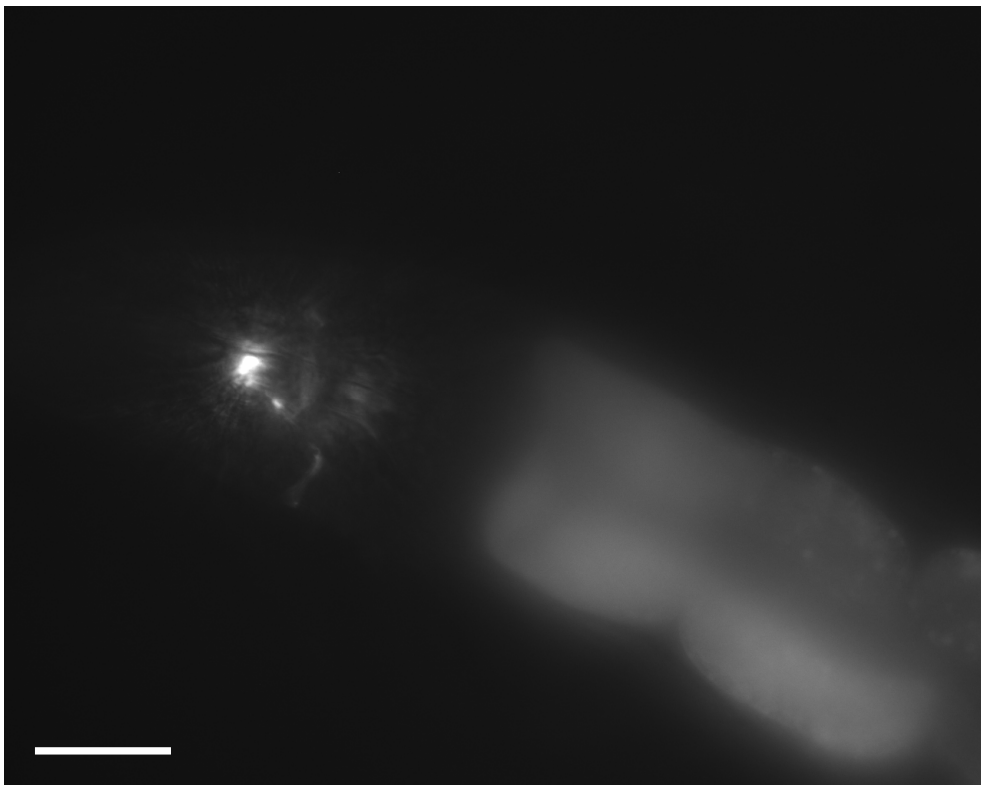


Abb. 43a: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* (Tier 1) mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *A. caninum* (Vergrößerung: 400 x, 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

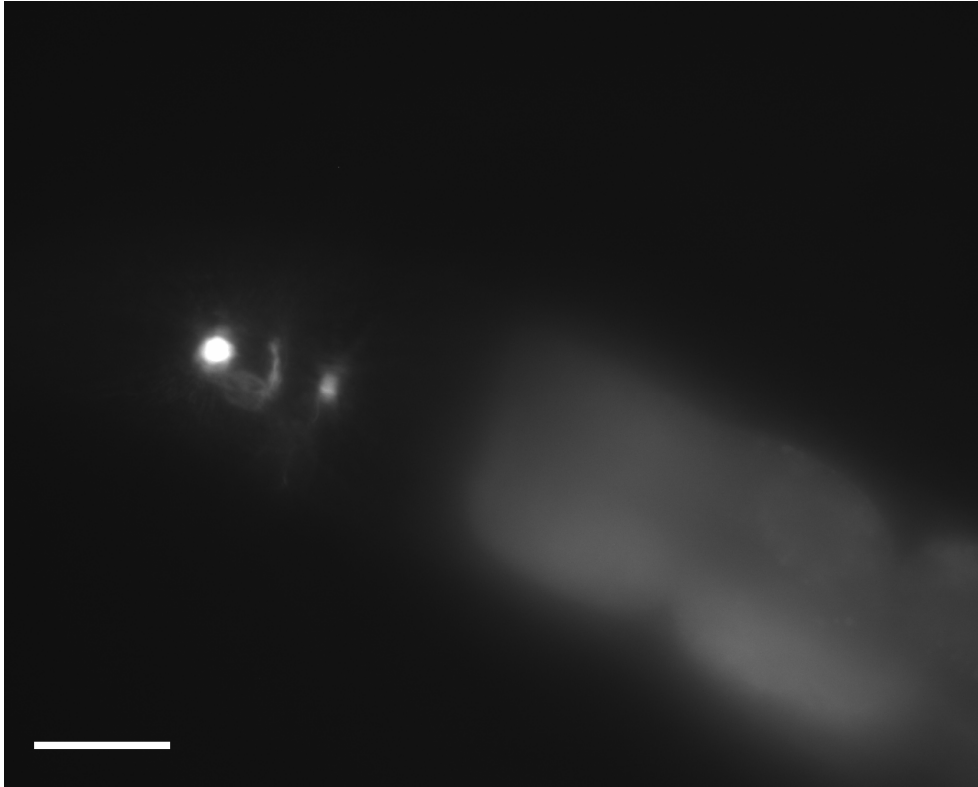


Abb. 43b: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* (Tier 1) mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *A. caninum* (Vergrößerung: 400 x, 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

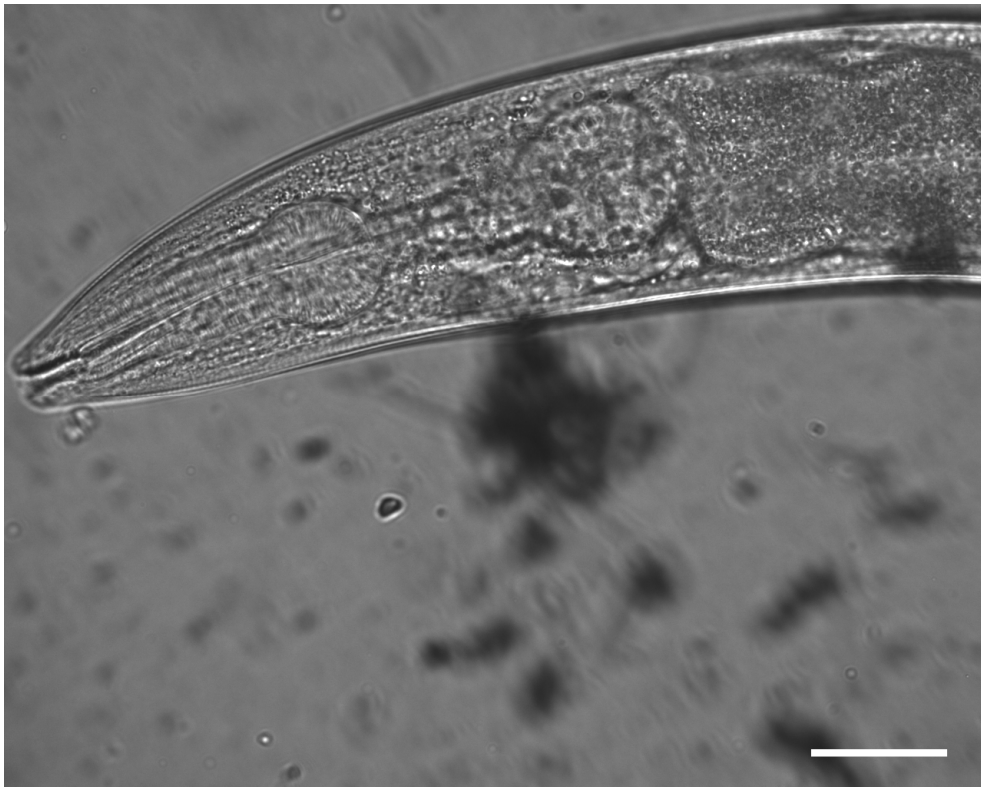


Abb. 44: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* (Tier 2) mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *A. caninum* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 40 μ m)

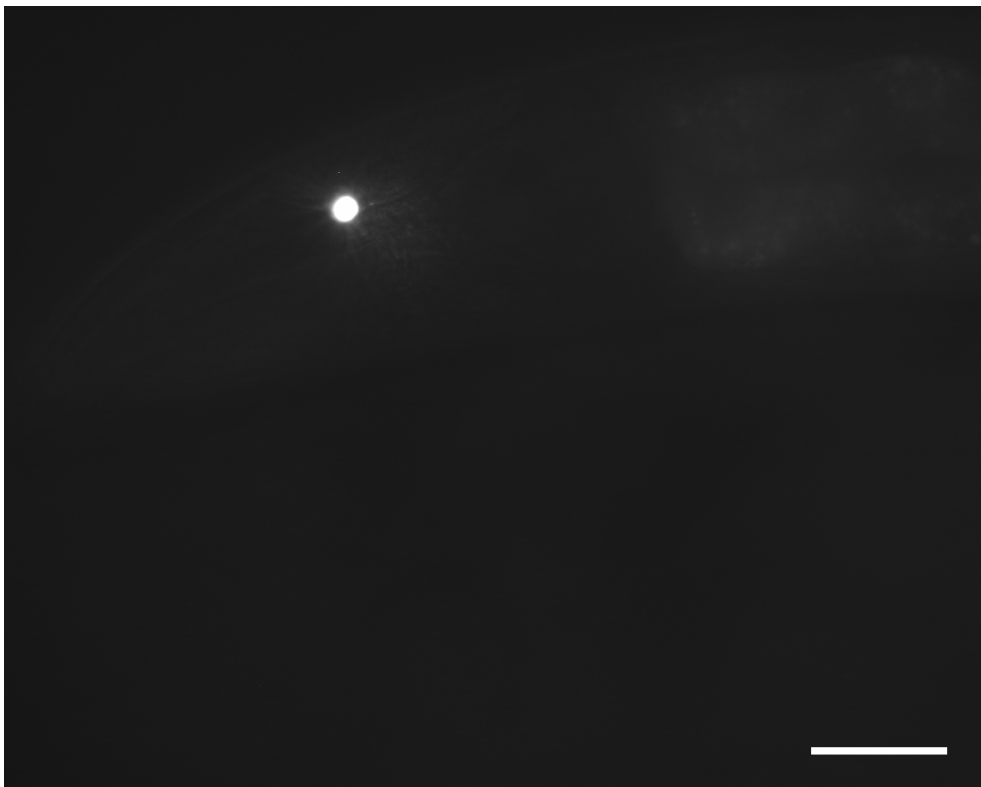


Abb. 44a: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* (Tier 2) mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *A. caninum* (Vergrößerung: 400 x, 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

4.3.5.3 *Cooperia oncophora slo-1*-Promotor-gesteuerte GFP-Expression in *C. elegans*

Von den etwa 50 hermaphroditen *C. elegans*, die mit dem *C. oncophora slo-1* Promotor-Reporterkonstrukt transfiziert worden hat nur ein Tier der F1-Generation eine GFP-Expression gezeigt. Die Abbildungen 45 und 45a-d zeigen den kranialen Bereich des Wurmes mit dem Pharynx. In Abbildung 45a ist nahe des terminalen Bulbus des Pharynx ein punktförmiges GFP-Signal zu erkennen, bei dem es sich um ein Neuron handeln könnte. Auch der gesamte Pharynx zeigt eine leichte, flächendeckende Fluoreszenz, was auf eine Expression in Muskelzellen hindeutet. In Abbildung 45b sind zwei kleine punktförmige Signale direkt an der Mundöffnung zu erkennen, die eine gemeinsame Ableitung entlang des Procorpus aufweisen, hierbei könnte es sich um eine Expression in den sensorischen Rezeptoren der Mundöffnung handeln. Im Bereich des terminalen Bulbus sind ebenfalls mehrere kleine punktförmige GFP-Signale exprimiert, die durch fadenförmige Strukturen miteinander verbunden sind (siehe auch Abbildung 45c). Abbildung 45d zeigt eine weitere punktförmige Expression im Bereich des terminalen Bulbus. In Abbildung 46 und 46a ist ebenfalls die Pharynxregion des Wurmes dargestellt, hier zeigen sich kleine punktuelle Expressionen entlang des Hautmuskelschlauchs, die mit fadenförmigen Strukturen miteinander verbunden sind. Diese nehmen ihren Ursprung im Bereich des terminalen Bulbus. Es könnte sich hier um Neuronen des Hautmuskelschlauchs handeln. Dieses Muster wird in Abbildung 47/47a fortgesetzt. Auch in Abbildung 48/48a sind diese Strukturen zu erkennen, die kurz vor der Analöffnung in deutlichen punktuellen Signalen enden.

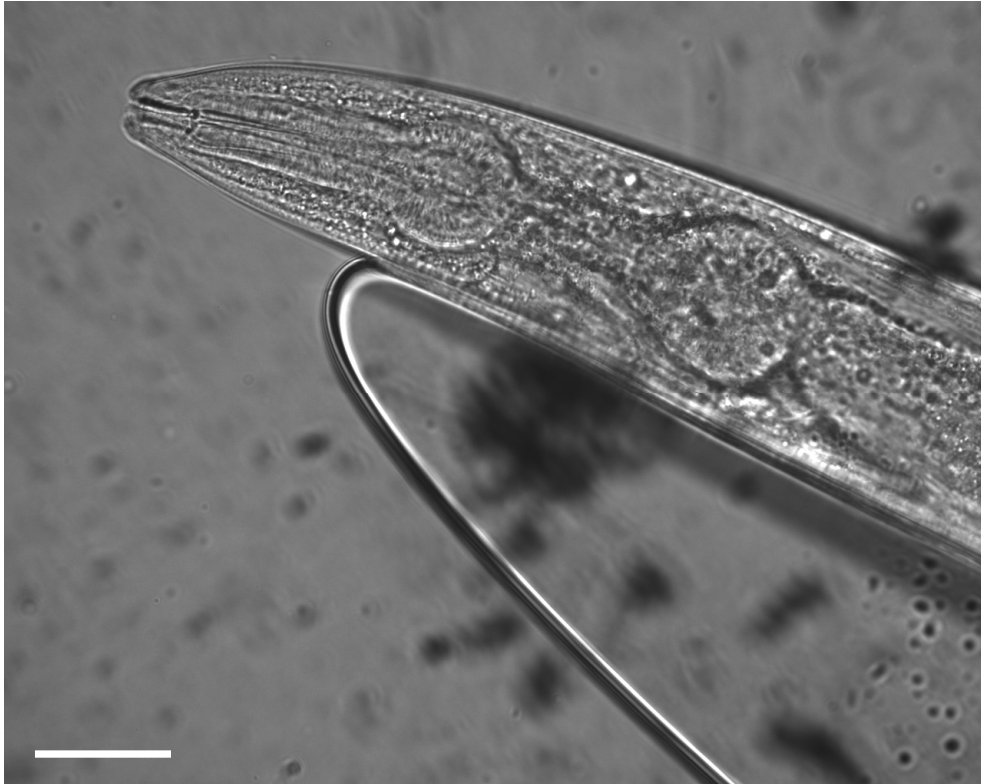


Abb. 45: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 40 μ m)

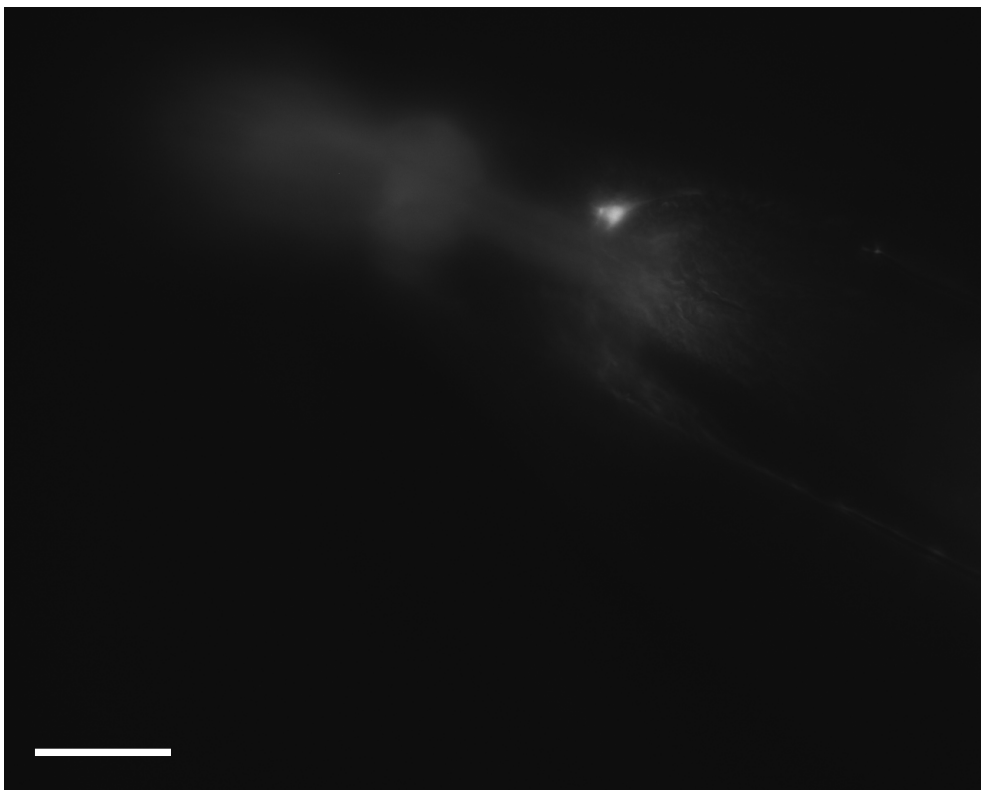


Abb. 45a: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

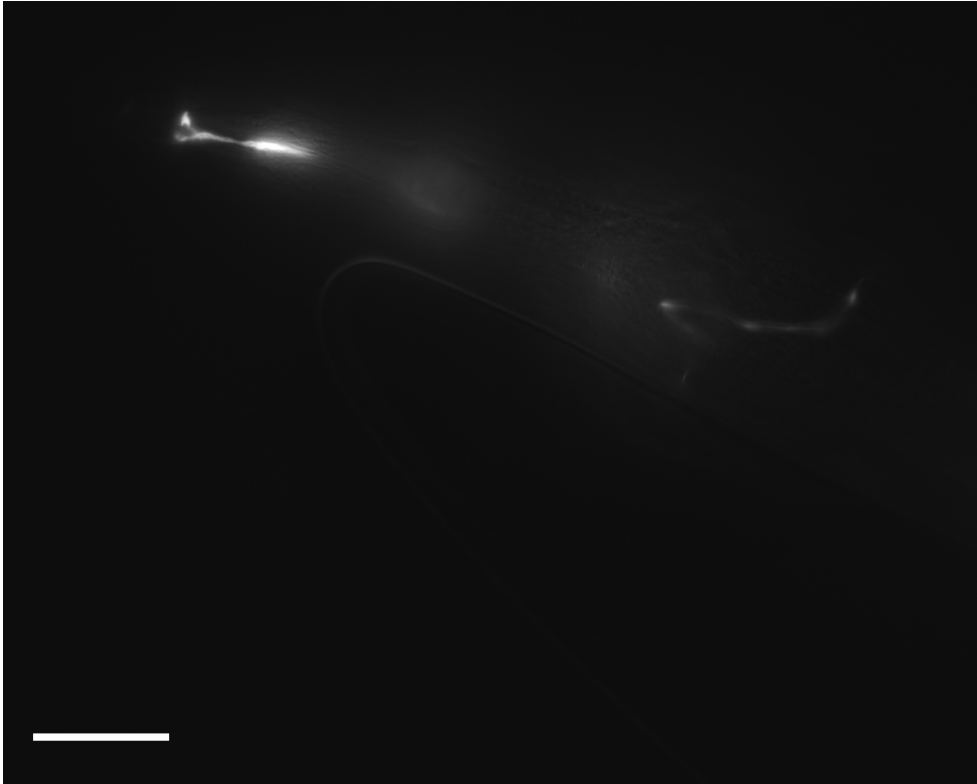


Abb. 45b: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

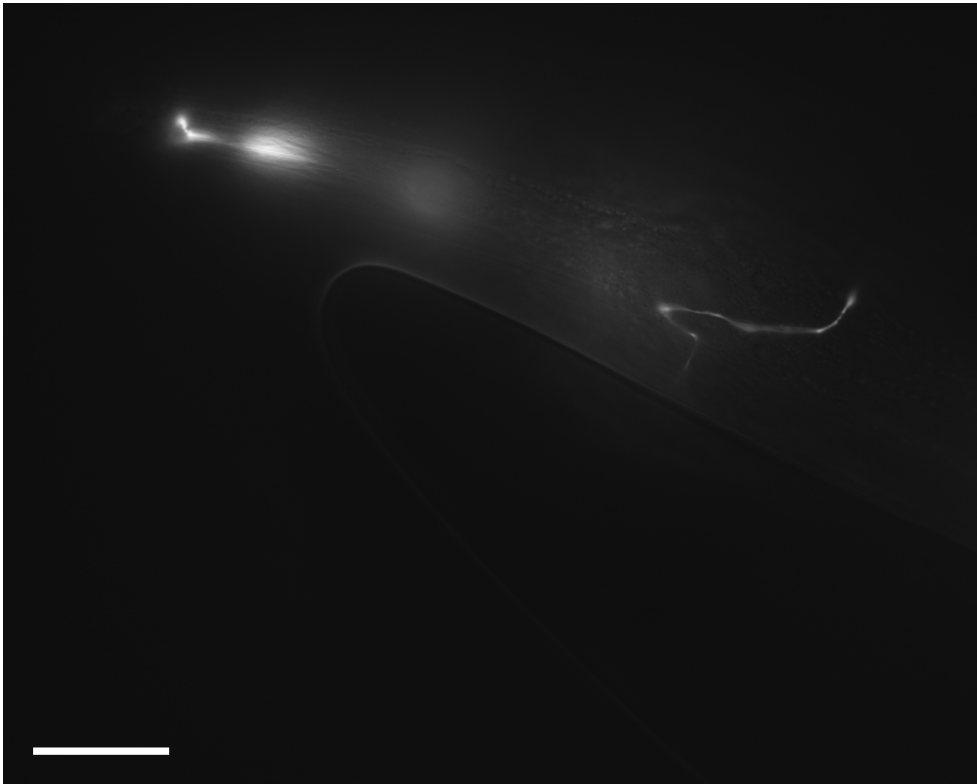


Abb. 45c: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

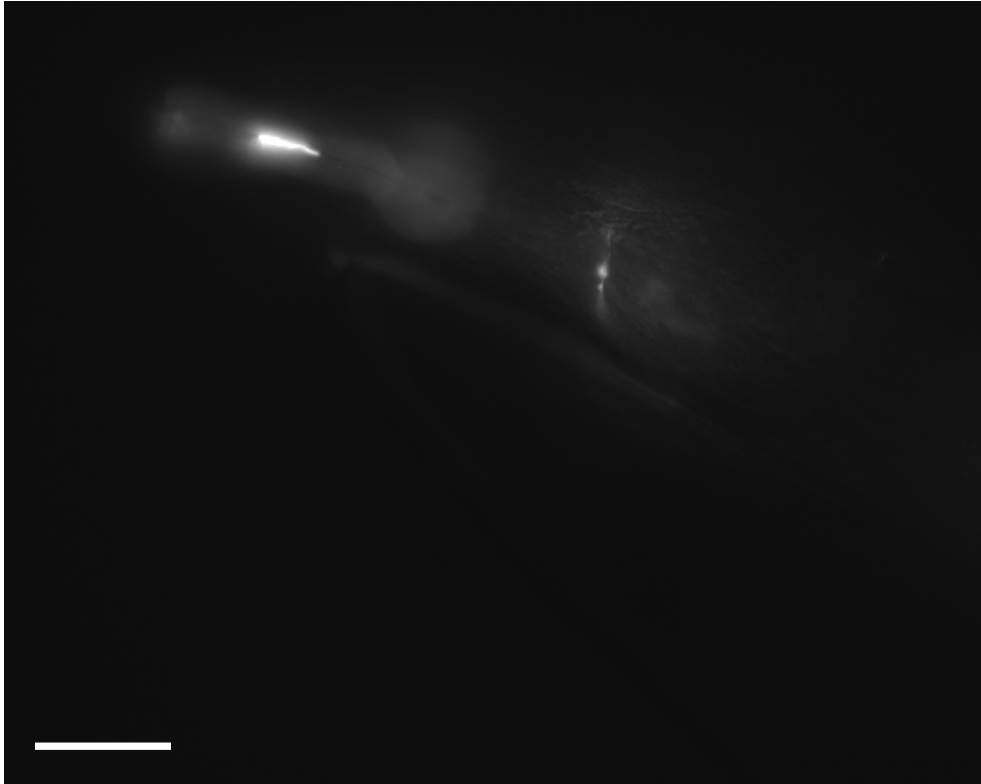


Abb. 45d: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

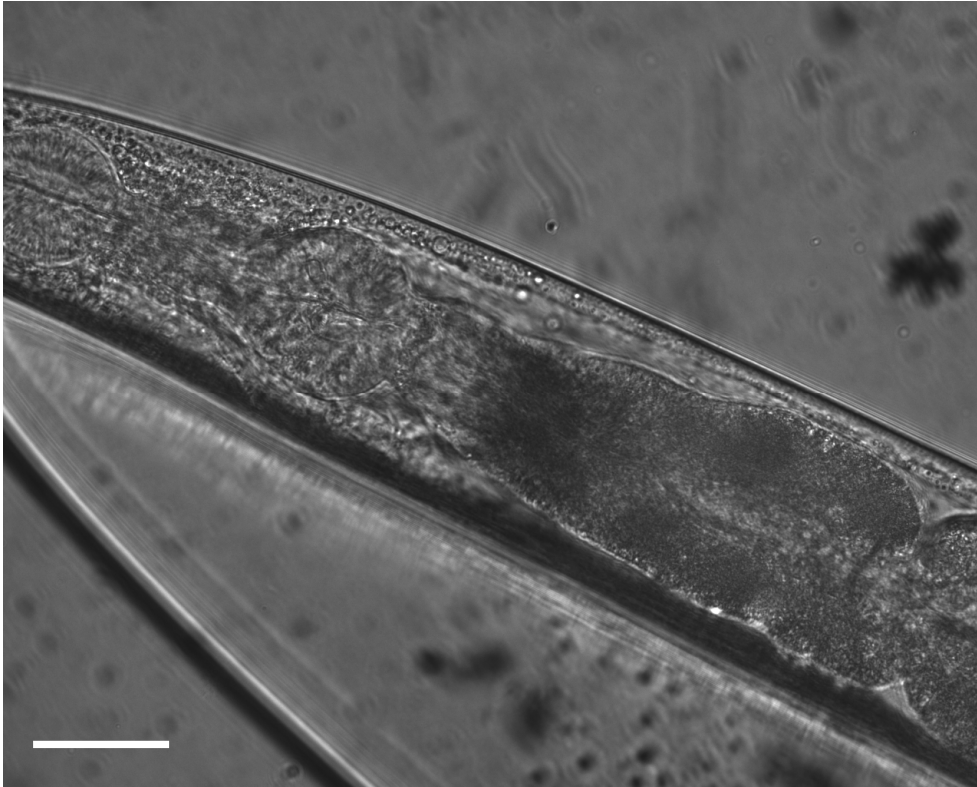


Abb. 46: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 40 μ m)

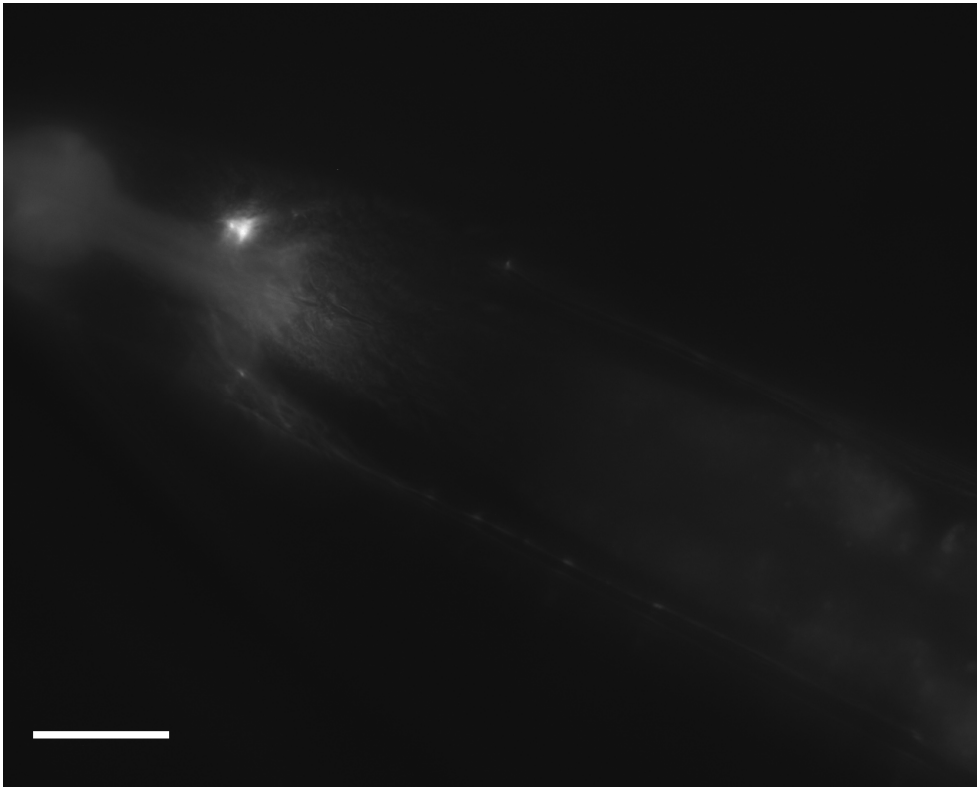


Abb. 46a: Pharynxregion eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

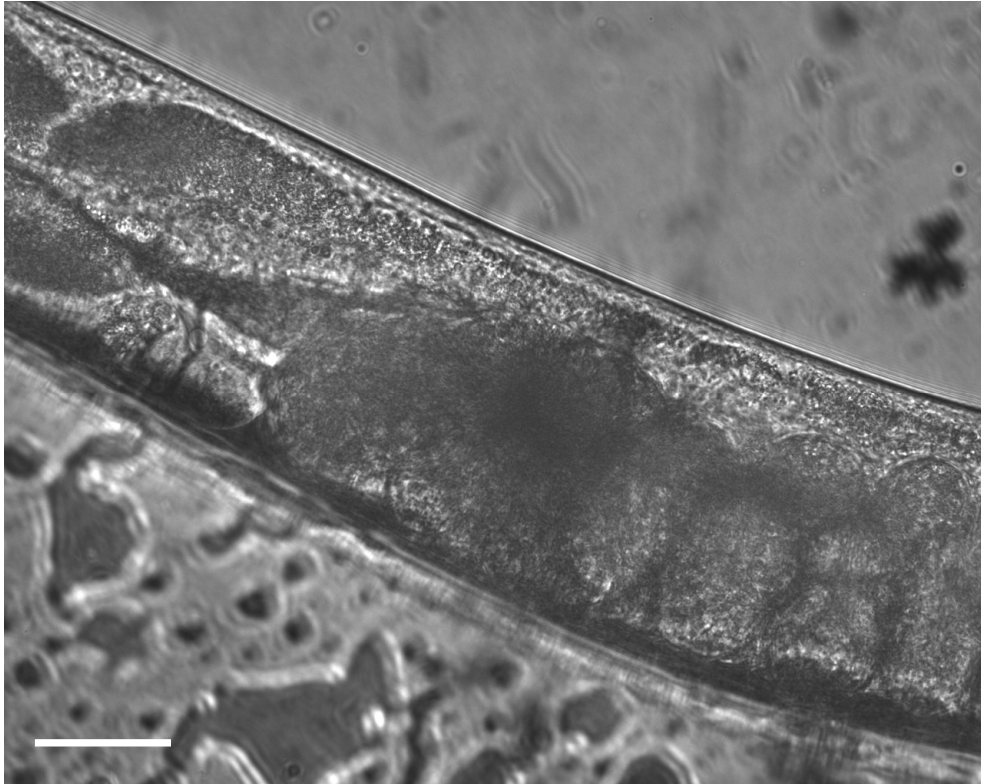


Abb. 47: Teilbereich der Körperwand eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 40 μ m)

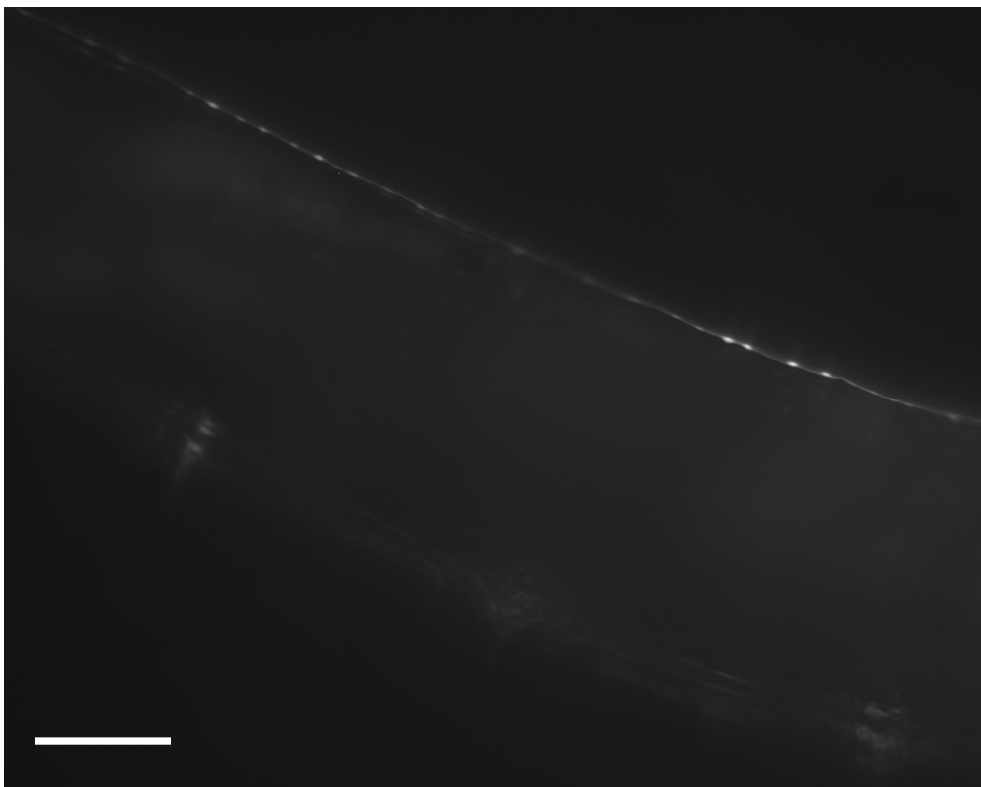


Abb. 47a: Teilbereich der Körperwand eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

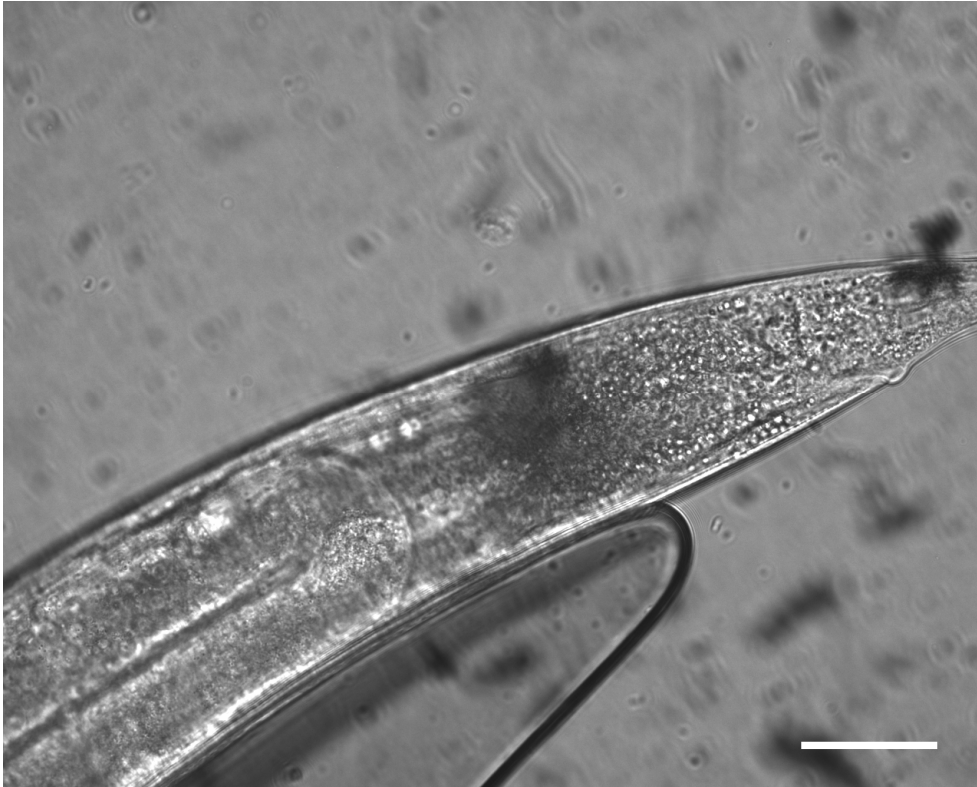


Abb. 48: Analbereich eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, DIC, Balken: 40 μ m)

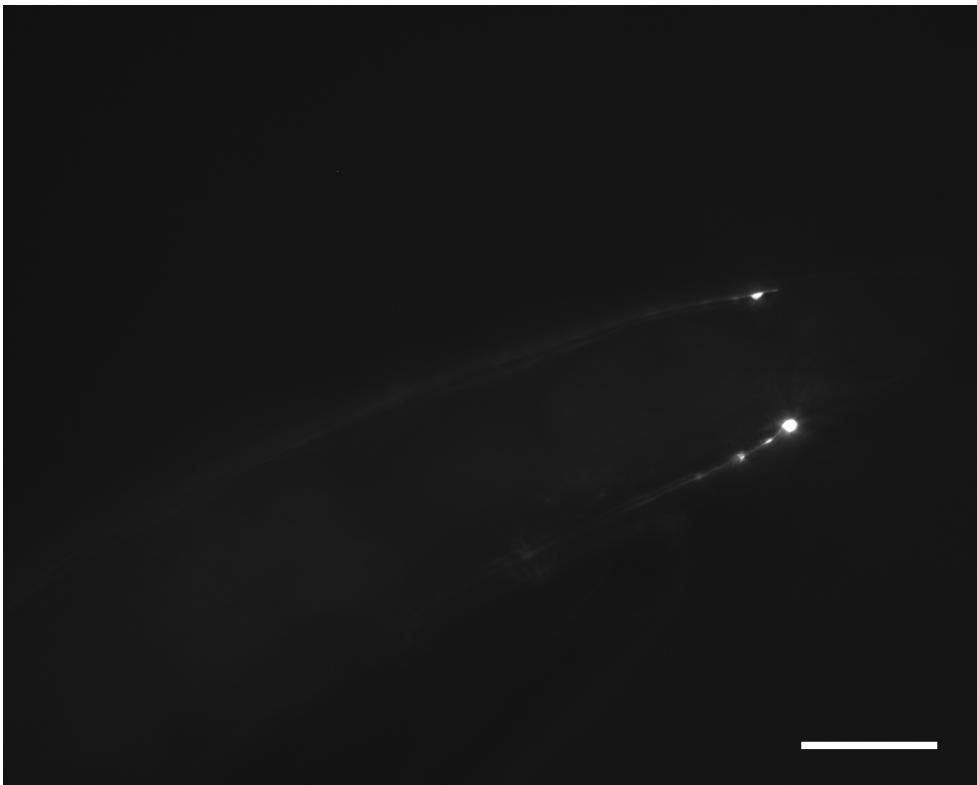


Abb. 48a: Analbereich eines transgenen adulten *C. elegans* mit GFP-Expression unter der Promotorregion des *slo-1* von *C. oncophora* (Vergrößerung: 400 x, 488 nm, GFP-Filter, Balken: 40 μ m)

5 Diskussion

Weltweit verursachen zoo-und phytoparasitische Nematoden sowohl gesundheitliche als auch große wirtschaftliche Schäden (Norton und Niblack, 1991; Viney, 2006). Die Bekämpfung mit anthelminthischen Substanzen ist daher unerlässlich. Der häufige und flächendeckende Einsatz von Anthelminthika im Nutztierbereich hat hier zum Teil zu erheblichen Resistenzproblemen geführt. Dies erfordert die Erforschung neuer Substanzen, welche durch neue Wirkmechanismen die Resistenzproblematik durchbrechen (Kaplan, 2004). Das Cyclooctadepsipeptid Emodepsid weist sowohl ein breites anthelminthisches Wirkspektrum als auch einen neuen Wirkmechanismus auf (Harder und Samson-Himmelstjerna, 2002; Samson-Himmelstjerna et al., 2000). Diesen detailliert aufzuklären, also Zielproteine des Emodepsids zu identifizieren und die anschließende Wirkkaskade zu ermitteln, kann für eine spezifischere Anpassung des Wirkstoffs an das Zielprotein hilfreich sein. Außerdem ist die Erforschung der natürlichen Funktionen der entsprechenden beteiligten Proteine wichtig, um tiefere Einblicke in die Physiologie der Nematoden zu erlangen. Durch die Aufklärung neuer neuronaler Signalwege können gezielt neue Wirkstoffe entwickelt werden, was gezieltes Eingreifen in bestimmte physiologische Abläufe ermöglicht. Zudem kann dies auch helfen, mögliche Resistenzmechanismen vorauszusagen. Es konnten bereits zwei Proteine identifiziert werden, die in den Wirkmechanismus des Emodepsids involviert sind. Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor Hc110-R des Schafnematoden *H. contortus* bzw. sein Ortholog LAT-1 von *C. elegans* (Willson et al., 2004), sowie der Calcium-gesteuerte Kaliumkanal SLO-1 von *C. elegans* (Guest et al., 2007; Holden-Dye et al., 2007). Es wurden außerdem jeweils die Orthologe beider Proteine in zwei Nematodenarten des Rindes (*C. oncophora* und *O. ostertagi*) nachgewiesen (Welz et al., 2005). Der orthologe Rezeptor zu Hc110-R wurde für beide Arten als Depsiphilin benannt, der Name SLO-1 wurde beibehalten. In der vorliegenden Arbeit wurden die kodierenden cDNA-Sequenzen des Depsiphilins und SLO-1 des Hakenwurmes des Hundes *A. caninum* identifiziert, charakterisiert und deren Funktion, ebenso wie die des Depsiphilins und des SLO-1 von *C. oncophora*, näher untersucht.

5.1 Identifizierung, Charakterisierung, Organisation und Untersuchung zur Transkription und Expression des Depsiphilins von *A. caninum* und *C. oncophora*

In der vorliegenden Arbeit wurde die orthologe kodierende Sequenz zu dem Emodepsid-Rezeptor Hc110-R von *H. contortus* und LAT-1 von *C. elegans* in *A. caninum* identifiziert. Von LAT-1 existieren drei Spleißingvarianten, LAT-1a, LAT-1b und LAT-1c, von denen LAT-1a den orthologen Rezeptor zu Hc110-R darstellt. Im Folgenden erfolgt die allgemeine Bezeichnung LAT-1 für LAT-1a.

5.1.1 Identifikation und Charakterisierung des Depsiphilins von *A. caninum*

5.1.1.1 Analyse der kodierenden Sequenz des Depsiphilins von *A. caninum*

Für *A. caninum* konnte die kodierende Sequenz des orthologen Gens zu Hc110-R von *H. contortus*, den Depsiphilinen von *C. oncophora* und *O. ostertagia*, sowie LAT-1 von *C. elegans* identifiziert werden. Die Identitäten der Aminosäuresequenzen zu den entsprechenden Rezeptoren der parasitischen Nematoden liegen zwischen 80 und 81 %. Aufgrund dieser hohen Übereinstimmung wurde der orthologe Rezeptor von *A. caninum* analog zu den Rezeptoren von *C. oncophora* und *O. ostertagi* als Depsiphilin benannt. Die Identität zu LAT-1 von *C. elegans* beträgt 46 %. Diese Gruppe von Rezeptoren weisen weiterhin lediglich Ähnlichkeiten von 22-26 % zu den Latrophilinen der Säuger auf. Strukturelle Merkmale weisen jedoch darauf hin, dass beide Gruppen von Rezeptoren der gleichen Proteinfamilie zuzuordnen sind. So wurde mittels verschiedener Programme zur Voraussage konservierter Domänen, bei dem Depsiphilin von *A. caninum* eine Transmembrandomäne mit sieben Transmembranhelices detektiert, eine NH₂-terminal gelegene Galaktose-bindende Lektindomäne, eine Hormonrezeptordomäne, sowie eine GPCR-Proteolyseregion. Diese Strukturen wurden bereits für *C. elegans* LAT-1, für die Depsiphiline von *C. oncophora* und *O. ostertagi*, für Hc110-R, sowie für die Latrophiline der Säuger beschrieben (Welz et al., 2005; Willson et al., 2004; Saeger et al., 2001; Matsushita et al., 1999). Bei allen oben aufgeführten Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) der Sekretinfamilie (Davletov et al., 1998; Willson et al., 2004; Saeger et al., 2001). GPCRs stellen heute einen großen Teil der Zielrezeptoren für Pharmazeutika dar (Filmore, 2004). Für Hc110-R wurde eine Bindung des anthelminthisch wirksamen Cyclooctadepsipeptids PF1022A, einem Vorläufer des Emodepsids, nachgewiesen (Saeger et al., 2001;

Harder und Samson-Himmelstjerna, 2002). Emodepsid hat unter anderem eine paralyisierende Wirkung auf den Pharynx von *C. elegans*. Dieser Effekt konnte bei *C. elegans lat-1* knockout-Mutanten unterdrückt werden (Willson et al., 2004). Aufgrund der identifizierten konservierten Domänen des Depsiphilins von *A. caninum*, lässt sich dieses eindeutig den bereits genannten Orthologen zuordnen, was durch die phylogenetische Analyse bestätigt wird. Zur Untermauerung dieses Ergebnisses sollte eine funktionelle Analyse des Depsiphilins erfolgen. Dazu wurden in dieser Arbeit Untersuchungen durchgeführt, die in Abschnitt 5.1.4 diskutiert werden.

5.1.1.2 Genomische Organisation des Depsiphilins von *A. caninum*

Für *A. caninum* wurde eine Gesamtsequenz des Depsiphilins von rund 24 kb (bzw. 28 kb inklusive einer möglichen Promotorregion) amplifiziert. Durch den Vergleich mit der cDNA-Sequenz des *A. caninum* Depsiphilins wurden 20 Introns (entsprechend 21 Exons) identifiziert. Es gibt bislang nicht sehr viele Informationen über die Intron-/Exonorganisation bei parasitischen Nematoden. Erste Untersuchungen weisen darauf hin, dass parasitische Nematoden mehr und deutlich größere Introns aufweisen, als *C. elegans* (Liu et al., 2004; Pratt et al., 1990; Guiliano et al., 2002). Diese Beobachtungen können ebenfalls für das Depsiphilin von *A. caninum* und dessen Ortholog *lat-1* von *C. elegans* gemacht werden. Das *lat-1*-Gen von *C. elegans* weist nur eine Gesamtsequenz von 12 kb auf und enthält mit 7 Introns und 8 Exons nur etwa ein Drittel der Introns des Depsiphilins von *A. caninum*. Zudem sind innerhalb der genomischen Sequenz des Depsiphilins von *A. caninum* zwei Introns vorhanden, die mit einer Länge um jeweils ca. 9500 bzw. 11000 bp sehr groß sind. Die größten Introns der genomischen Depsiphilin-Sequenz von *C. elegans* haben dagegen nur eine Größe von ca. 3600 bzw. 2800 bp. Die anderen Introns sind deutlich kleiner. Von der genomischen Sequenz des Hc110-R von *H. contortus* wurden bislang 10 Introns und 11 Exons amplifiziert, es ist aber noch nicht die gesamte genomische Sequenz abgedeckt worden, daher ist es wahrscheinlich, dass sich diese Zahlen, bei vollständiger Bestimmung der Sequenz noch erhöhen. Die bisher ermittelte Gesamtlänge beträgt 4575 bp (Währing, 2002). Alle identifizierten Introns von *A. caninum*, *H. contortus* und *C. elegans* liegen an genau korrespondierenden Stellen im Gen. Dies deutet darauf hin, dass die Gene den selben Ursprung haben.

Es ist bislang nicht viel über die genomische Organisation anderer *A. caninum*-Genen bekannt. Für das Paramyosin wurde die genomische Sequenz analysiert (Hüsken, 2007), die Länge der kodierenden Sequenz beträgt 2631 bp, die bisher bestimmte Länge der genomischen Sequenz 10927 bp. Die Sequenz enthält 21 Exons und 20 Introns, von denen eins (V, 2341 bp) noch nicht vollständig sequenziert ist. Vier Introns sind mit über 1400 bp recht groß, drei weisen eine Länge von 266, 529 bzw. 808 bp auf. Die restlichen sechs Introns sind unter 100 bp groß. Das orthologe *C. elegans*-Paramyosin-Gen (F07A5.7) ist dagegen nur 6576 bp lang, die kodierende Sequenz 2619 bp. Das Gen setzt sich aus 11 Exons und 10 Introns zusammen, wobei die zwei größten Introns etwa 300-400 bp lang sind. Die Größenverteilung der Introns der genomischen Sequenz des *A. caninum* Depsiphilin und Paramyosins sind also recht ähnlich. Die großen Introns beim Depsiphilin sind jedoch deutlich größer. Außerdem zeigt sich, wie für das Depsiphilin, auch für das Paramyosin im Vergleich zu dem orthologen Gen von *C. elegans*, dass es mehr und größere Introns enthält.

Die Unterschiede in der Anzahl und Größe der Introns belegen, dass eine Fluktuation von Introns bei Nematoden weitaus ausgeprägter ist als bei anderen Tieren (Coghlan und Wolfe, 2004; Guiliano et al., 2002). Die Analyse der genomischen Sequenz des Depsiphilins von *A. caninum* unterstützt die bisher bekannten Erkenntnisse über die Intron-/Exonorganisation bei parasitischen Nematoden. Sofern die Größe des Depsiphilins repräsentativ für die Größe anderer Gene von *A. caninum* ist, ist zu erwarten, dass die Gesamtgröße des Genoms deutlich größer ist, als die von *C. elegans*. Abubucker und Mitarbeiter (2008) haben mittels Durchflußzytometrie isolierter Zellkerne eine Größe von $347 \pm 1,2$ Mb für das Genom von *A. caninum* ermittelt, das Genom von *C. elegans* ist damit mehr als zwei Drittel kleiner (100,2 Mb). Ein Vergleich von Genen von *A. caninum* und den orthologen *C. elegans* Genen, zeigte, dass die durchschnittliche Introngröße jeweils relativ ähnlich war. Die durchschnittliche Größe der Exons dagegen war bei *A. caninum* kleiner (Abubucker et al., 2008). Letzteres trifft auf das Depsiphilin von *A. caninum* ebenfalls zu, der Grund hierfür liegt in der größeren Anzahl der vorhandenen Introns. Das bedeutet, bei einer hohen Anzahl von Introns verteilt sich die kodierende Sequenz auf mehr Exons, die damit kleiner werden.

Es wurde für *C. elegans* eine positive Korrelation zwischen der Größe der Introns und einer erhöhten Rekombinationsrate nachgewiesen (Prachumwat et al., 2004).

Für eine parasitisch lebende Nematodenpopulation, wäre eine erhöhte Rekombinationsfähigkeit insofern sinnvoll, als dass diese Nematoden sich schnell an sich ändernde Bedingungen anpassen müssen. So erfordert besonders die Immunabwehr des Wirtes die Fähigkeit der schnellen Anpassung. Außerdem verlangt die Übertragung der Parasiten auf eine neue Wirtspopulation oder gar Tierarten evolutionäre Veränderungen, die eine erhöhte Rekombinationsrate erfordern. Eine mit hohem Rekombinationsgrad einhergehende hohe populationsgenetische Diversität erleichtert unter Umständen die Bildung von Resistenzen bei der Verwendung von Anthelminthika. Es gibt einige Studien zur genetischen Diversität in Bezug auf Anthelminthikaresistenzgene in Nematodenpopulationen (Roos et al., 1990; Kwa et al., 1993; Beech et al., 1994; Otsen et al., 2001; Eng et al., 2006), aber die Frage, wo die Resistenzallele ihren Ursprung haben, ist bislang noch nicht geklärt. Es ist für Trichostrongyliden, zu denen auch *C. oncophora* zählt, festgestellt worden, dass sie grundsätzlich einen hohen Grad an genetischer Diversität aufweisen (Anderson et al., 1998). Zudem gibt es bei Trichostrongyliden eine deutlich höhere genetische Diversität innerhalb von Populationen, als zwischen verschiedenen Populationen (Blouin et al., 1995). Es wurde dagegen für andere parasitische Nematodenarten eine niedrige genetische Diversität, sowohl innerhalb als auch zwischen Populationen, ermittelt (Hu und Gasser, 2006). Für *C. elegans* gibt es diesbezüglich unterschiedliche Berichte. Einer geringen genetischen Diversität zwischen Populationen weltweit, steht eine erhöhte genetische Diversität lokal benachbarter Populationen gegenüber (Fitch, 2005a). Es können also weder generelle Aussagen über das Maß an genetischer Diversität bei parasitischen Nematoden und *C. elegans* getroffen werden noch über Unterschiede in der genetischen Diversität zwischen den beiden Gruppen. In Bezug auf das *A. caninum*-Genom lässt sich daher bislang nur spekulieren, ob die große Anzahl an Introns die Rekombinationsrate und damit die genetische Diversität begünstigt.

Das mögliche Vorkommen einer erhöhten Rekombinationsrate bei parasitischen Nematoden wird außerdem unterstützt durch das Vorhandensein der geschlechtlichen Vermehrung. Die Reproduktion des freilebenden Nematoden *C. elegans* dagegen, erfolgt zum größten Teil durch Selbstbefruchtung der hermaphroditen Tiere, nur etwa 0,05 % einer Population sind Männchen (Brenner, 1974).

Innerhalb des zweiten Introns des Depsiphilins von *A. caninum* wurde ein 930 bp großes Fragment kodierender Sequenz der Galactose-bindenden Lektin-Domäne identifiziert, welches zu dem entsprechenden Fragment im Exon nur eine Ähnlichkeit von 43 % aufweist. Der Vergleich mit dem korrespondierenden Fragment in LAT-1a zeigt eine Übereinstimmung von 43 %, zu LAT-1b dagegen 51 %. Dies untermauert die Vermutung, dass es sich hier um einen Teil eines alternativen Exons des Depsiphilins handelt, das ortholog zu der Variante LAT-1b ist. Bei den Latrophilinen der Säuger sind insgesamt sieben verschiedene Spleißingstellen bekannt. In allen drei Säuger-Latrophilinen kommen auch Spleißingstellen an der Grenze zur Galactose-bindenden Lektin-Domäne vor. Diese Domäne liegt vermutlich extrazellulär und weist innerhalb der Latrophiline die höchste Konserviertheit auf (Matsushita et al., 1999). Es wird vermutet, dass dies ein Hinweis auf eine entscheidende Rolle bei der Funktionalität des Rezeptors sein könnte. Je nach Struktur, könnte die Lektin-Domäne verschiedene Liganden binden (Matsushita et al., 1999). Da in keiner PCR zur Erlangung der Gesamtsequenz des Depsiphilins von *A. caninum* die dem LAT-1b entsprechende Variante amplifiziert wurde, ist zu vermuten, dass hauptsächlich der Depsiphilin-Isotyp, welcher hier beschrieben wurde, transkribiert und translatiert wird. Dies spricht weiterhin dafür, dass dieses Depsiphilin die für den Organismus wichtigere Funktion erfüllt. Für Hc110-R wurde eine Bindung des PF1022A am extrazellulären NH₂-Terminus nachgewiesen, die genaue Bindungsstelle konnte aber nicht spezifiziert werden (Saeger et al., 2001). Für den Fall, dass die Lektin-Domäne diese Bindungsstelle darstellt, sollte die entsprechende Spleißingvariante im Hinblick auf eventuelle, die Bindungsstelle beeinflussende, Sequenzunterschiede näher untersucht werden.

5.1.2 Quantitative Untersuchung der Transkription des *A. caninum*

Depsiphilins mittels real-time PCR

Die quantitative real-time PCR wurde verwendet, um die Transkriptionsrate von Depsiphilin in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum* zu untersuchen. Es werden zur Quantifizierung der real-time PCR-Daten grundsätzlich zwei verschiedene Berechnungsmethoden unterschieden. Bei der absoluten Quantifizierung wird die Kopienzahl des Zielgens anhand des Vergleichs der C_T-Werte der untersuchten Probe mit denen einer mitgeführten Standardkurve, bestehend aus Proben mit definierten Kopienzahlen, berechnet. Die relative

Quantifizierung verwendet eine Kalibratorprobe, auf die die C_T -Werte des Zielgens relativiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden der relativen Quantifizierung angewendet: die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) und die Relativierung von absoluten Kopienzahlen, die mittels Standardkurve bestimmt wurden, auf die Referenzgene und die Kalibratorprobe. Für die Normalisierung der Daten wurden als Referenzgene die 18S ribosomale RNA (18S rRNA) und das 60 S acidic ribosomal protein (60S arp) verwendet. Beide Gene wurden bereits auf ihre Eignung als Referenzgen für *A. caninum* untersucht (Trivedi und Arasu, 2005). Hier wurde als am besten geeignetes Referenzgen 60S arp bewertet, da es im Vergleich zu fünf weiteren möglichen Referenzgenen am stabilsten in verschiedenen Stadien und unterschiedlichen Stämmen von *A. caninum* transkribiert wurde. Für den Vergleich verschiedener Entwicklungsstadien konnte 18S rRNA aufgrund zu großer Unterschiede in der Transkription für *A. caninum* nicht als geeignet bewertet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde für jedes Entwicklungsstadium und jedes untersuchte Gen eine Verdünnungsreihe mitgeführt, die zuvor aus Plasmid-DNA, die das entsprechende Genfragment enthielt, angefertigt wurde. Diese umfasste Kopienzahlen von 10^1 bis 10^7 Kopien/ μ l cDNA. Außerdem wurde eine Verdünnungsreihe der direkt synthetisierten cDNA einer Probe der Männchen für jedes Gen angefertigt. Diese cDNA wurde jeweils in einer Verdünnung von 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:50 eingesetzt. Diese dienten dazu, zu überprüfen, in welchem Maße der $\Delta C_T = C_{T(\text{Zielgen})} - C_{T(\text{Referenzgen})}$ bei Vorliegen unterschiedlicher Ausgangsmengen der Ziel-DNA variiert. Bei einer Steigung nahe Null, ist die Amplifikationseffizienz von Ziel- und Referenzgen in Proben mit unterschiedlicher Matrizenmenge gleich bleibend. Dies gilt als Voraussetzung für die Anwendung der relativen Quantifizierung mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Die Proben der Männchen wurden für alle Berechnungen als Kalibrator ausgewählt und daher auch für diese Analyse als Berechnungsgrundlage herangezogen.

5.1.2.1 Analyse der relativen Kopienzahlen des Depsiphilins, 18S rRNA und 60S arp der verschiedenen Entwicklungsstadien

Um grundsätzliche Unterschiede von Transkriptmengen des Depsiphilins in den verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. caninum* festzustellen, wurden mittels der mitgeführten Standardreihe die absoluten Kopienzahlen/ μ l cDNA ermittelt. Die

eingesetzte cDNA wurde jeweils aus 1 µg total RNA synthetisiert. Die errechneten absoluten Kopienzahlen wurden auf die Männchen relativiert, die mit 100 % als Kalibrator dienten. Die errechneten relativen Kopienzahlen zeigten für alle drei untersuchten Gene eine große Schwankungsbreite zwischen den Stadien (vgl. Abb. 27). Für das Zielgen Dapsiphilin fiel diese noch am geringsten aus, aber auch hier lagen z.B. die Kopienzahlen/µl cDNA für die Eier mehr als 300 % über denen der Männchen. Bei dem Referenzgen 18S rRNA waren die Unterschiede in den Kopienzahlen/µl cDNA der Weibchen und Eier im Vergleich zu denen der Männchen relativ gering, die Kopienzahlen/µl cDNA der ersten/zweiten und dritten Larven dagegen lagen über 500 bzw. 400 % über denen der 18S rRNA bei Männchen. Die auffälligsten Unterschiede fanden sich bei dem Referenzgen 60S arp. Hier waren die Kopienzahlen/µl cDNA der Eier und dritten Larven über 1100 bzw. 1450 % höher. Bei der Analyse der Amplifikationseffizienzen der real-time PCR unter Verwendung der jeweiligen Standardkurven (siehe Anhang Abschnitt 7.2.2 Tabelle 26) fiel auf, dass diese durchgehend nicht den Werten entsprachen, die zur aussagekräftigen Analyse notwendig gewesen wären. Die Effizienzen für die Standardkurven sollten zwischen 90 und 100 % liegen (Bustin und Nolan, 2004; Wong und Medrano, 2005; Yuan et al., 2006). Für das Zielgen Dapsiphilin lagen die Effizienzen im Mittel bei 80,64 %, für 60S arp bei 119,92 % und für 18S rRNA bei 189,78 %. Ein Grund für diese relativ schlechten PCR-Effizienzwerte könnte in der Verwendung von nicht-linearisierter Plasmid-DNA liegen, da diese in verschiedenen Konformationen vorliegen kann, die die Effizienz der PCR beeinflussen können (Bustin, 2004). Dies hatte zur Folge, dass eine verlässliche Berechnung der Kopienzahlen nicht durchgeführt werden konnte und somit die errechneten Kopienzahlen maximal eine Tendenz anzeigen konnten. Tendenziell zeigen sich Unterschiede in den Transkriptmengen von 18S rRNA und 60S arp zu den Ergebnissen von Trivedi und Mitarbeitern (2005). Dies deutet darauf hin, dass sowohl eine Optimierung der PCR für die Standardreihen notwendig ist, als auch eine erneute Evaluierung der Referenzgene.

5.1.2.2 Quantifizierung über die Bestimmung der relativen Kopienzahlen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Quantifizierung mittels der Bestimmung der relativen Kopienzahlen/µl cDNA und Normalisierung auf zwei Referenzgene über eine Standardkurve diskutiert. Hierfür wurden mit Hilfe der mitgeführten Standardkurven die absoluten Kopienzahlen ermittelt, anschließend

wurden die Werte des Zielgens mittels der Referenzgene relativiert und anschließend mit den Werten der Männchen in Relation gesetzt. Bei der Berechnung, der das Referenzgen 18S rRNA zu Grunde liegt, ist eine Erhöhung der Transkriptionsrate des Depsiphilins der Eier im Vergleich zu der der Männchen um etwa 1600 % zu erkennen. Die Unterschiede in den Kopienzahlen/ μl cDNA der anderen untersuchten Stadien waren nicht derartig groß. Die Transkriptionsrate des Depsiphilins lag bei den L3 im Vergleich zu den Männchen um etwa 280 % höher. Bei der gleichen Analyse mit 60S arp als Referenzgen zeigte sich ein völlig anderes Bild. Hier lagen alle Werte unter dem der Männchen, die Eier wiesen hiernach z.B. eine um ca. 60 % geringere Anzahl Kopien/ μl cDNA des Depsiphilins auf als die Männchen. Die Transkriptionsrate des Depsiphilins der L3 war hier mit ca. 80 % der maximale Wert. Aufgrund der in Abschnitt 5.1.2.1 angesprochenen, ungünstigen Werte für die Amplifikationseffizienzen der real-time PCR der Verdünnungsreihe, vor allem für die Referenzgene, stellen die errechneten Werte sicherlich nicht die reale Situation dar. Die Amplifikationseffizienz der real-time PCR der Verdünnungsreihe kann durch zahlreiche Parameter beeinflusst werden. Neben grundsätzlichen Einflüssen von möglichen Inhibitoren der PCR-Reaktion, spielt die Qualität der eingesetzten Plasmid-DNA eine große Rolle. Häufiges Auftauen und Einfrieren der Proben und Sonden führt zu schlechteren Amplifikationseffizienzen (Bustin et al. 2004; Wong et al. 2005). Um dieses Risiko von vornherein so gering wie möglich zu halten, wurden Aliquots jeder Probe der Standardreihen eingefroren, so dass jede Probe nur zweimal aufgetaut wurde. Auch die Kombination der Primer und damit die Wahl des zu amplifizierenden Produktes können die Ursache für schlechte Amplifikationseffizienzen sein. Um die Verwendung der Standardreihe zu umgehen, wurde noch eine weitere Methode der Quantifizierung angewendet. Die entsprechenden Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.1.2.3 Quantifizierung mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode

Bei der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode handelt es sich um eine reine relative Quantifizierung. Die hierfür notwendigen möglichst gleichen Werte für die Amplifikationseffizienzen der real-time PCR für den Nachweis von Ziel- und Referenzgen ist im Anhang unter Abschnitt 7.2.1 aufgeführt. Die ΔC_T -Werte der verschiedenen Verdünnungsreihen wurden grafisch in einer Kurve dargestellt. Die Steigung der entsprechenden Kurve sollte hier laut Livak und Schmittgen (2001), die diese Methode vorgestellt haben,

nahe Null sein. In welchem Rahmen sich dieser Wert bewegen sollte, wird nicht näher beschrieben. In einem dort aufgeführten Beispiel wird eine Steigung von $y=0,047x$ als positiv bewertet. Die Steigung der Verdünnungsreihe lag für die Werte der Männchen bei $y=-0,025x$ (Depsiphilin/ 18S rRNA) bzw. $y=0,003x$ (Depsiphilin/ 60S arp) und erfüllt damit die geforderten Parameter. Wie mit der Berechnung über die relativen Kopienzahlen beobachtet, ist hier die mittels der C_T -Werte des 18S rRNA Referenzgens errechnete Transkriptionsrate des Depsiphilins in den Eiern am höchsten, sie liegt ca. 600 % über der der Männchen. Die Transkriptionsraten des Depsiphilins in den Weibchen und ersten/zweiten Larven liegen ca. doppelt so hoch wie die der Männchen. Ein Nachweis der Transkription von Depsiphilin in den Eiern ist insofern interessant, als dass in *in vitro* Versuchen mit *A. caninum* Eiern das Emodepsid den Schlupf der Larven aus den Eiern nicht beeinflusst hat (Schürmann et al., 2007). Auch bei *C. elegans* zeigten sich nach Emodepsidexposition der Würmer keine signifikanten Unterschiede im Schlupfverhalten der Larven im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe (Bull et al., 2007). In Versuchen mit Antikörpern gegen verschiedene Domänen des Hc110-R von *H. contortus*, diese in *C. elegans*-Eiern bzw. den darin enthaltenen Embryonen nachzuweisen, gelang eine Lokalisation dieser Regionen im Pharynx der Larven (Saeger, 2000). Daher unterstützen die in der vorliegenden Arbeit erlangten Daten über die Transkription des Depsiphilins in Eiern von *A. caninum* die bisher gewonnenen Erkenntnisse. Es stellt sich die Frage, warum trotz des Vorkommens von Depsiphilin in den Eiern, der Embryo nicht messbar durch das Emodepsid beeinflusst wird. Möglicherweise kommt es in diesem Entwicklungsstadium noch nicht zu einer funktionsfähigen Translation des Rezeptors, sondern es findet eine „Vorproduktion“ an mRNA statt, um bei der Weiterentwicklung schnell ausreichend Protein translatieren zu können. Um diese Vermutung zu untermauern, könnte die Untersuchung der Transkriptionsrate anderer Gene in Eiern hilfreich sein. Ein weiterer Grund für die Unwirksamkeit des Emodepsids auf Eier von *A. caninum* könnte einfach in der Impermeabilität der Eischale für den Wirkstoff liegen.

5.1.3 Depsiphilinpromotor-gesteuerte GFP-Expression in *C. elegans*

Mittels der Genome Walker™ Methode wurden jeweils etwa 3 kb große Sequenzabschnitte stromaufwärts des Startcodons des Depsiphilins von *A. caninum* und *C. onchophora* amplifiziert. Es konnten mit Hilfe der Programme

Genome2Promoter und MatInspector von Genomatix keine spezifischen Promotorelemente identifiziert werden. Mögliche Ursachen hierfür werden in Abschnitt 5.2.1.1 diskutiert. Um Hinweise auf den Ort der Expression des Depsiphilins im Tier zu erhalten, wurde von *C. oncophora* ein Depsiphilin-Promotor-GFP-Reporterkonstrukt erstellt und mit diesem hermaphrodite *C. elegans* transfiziert. Trotz mehrfacher Versuche konnte das entsprechende Konstrukt von *A. caninum* im Rahmen dieser Arbeit aufgrund von Amplifikationsschwierigkeiten in der PCR nicht hergestellt werden. Trotz etwa 40, mit dem *C. oncophora* Depsiphilinpromotor-GFP-Konstrukt transfizierter Tiere, konnte nur ein Tier in der F1-Nachkommenschaft mit GFP-Signalen identifiziert werden. Diese Problematik erschien auch bei weiteren Experimenten und wird in Abschnitt 5.2.1.1 näher diskutiert. Die Expression des GFP unter dem *C. oncophora* Depsiphilinpromotor erfolgte sowohl in punktueller Form im Pharynx- und Analbereich, als auch in eher flächigeren Strukturen im Pharynxbereich. Die Lage der punktuellen Signale im Pharynxbereich deutet auf eine Expression in Nervenzellen des Isthmus hin, die hier sehr dicht vorhanden sind (Mango, 2007). Für diese Vermutung sprechen ebenfalls die länglichen Fortsätze, bei denen es sich um Nervenbahnen handeln könnte. Die genaue Zuordnung zu einzelnen Neuronen ist nicht möglich, da hierfür die genaue Lage im Wurm bestimmt werden müsste, was mit dem, in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden, Mikroskop nicht möglich war. Um hier ein genaueres Bild des Expressionsortes zum erhalten, wäre die Analyse mit einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop notwendig gewesen. In der Analregion von *C. elegans* befinden sich vier Ganglien, das Pre-Anal-Ganglion, das Dorso-Rectal-Ganglion und ein Lumbar-Ganglion auf jeder Seite. Da das punktförmige Signal in der Region kaudal der Analöffnung liegt, ist es entweder dem Dorso-Rectal-Ganglion oder dem Lumbar-Ganglion zuzuordnen. Weiterhin finden sich einzelne kleine Signale an der dorsalen Nervenbahn, kranial der Analöffnung. Bei der eher bandartigen Struktur im Pharynx könnte es sich um eine Muskelzelle handeln. Die genaue Zuordnung ist aufgrund fehlender genauer Informationen über die Fokussierung, also über die Ebene im Wurm, schwierig. Es könnte sich sowohl um Muskelzellen im Pharynx als auch solche im Hautmuskelschlauch handeln. Expressionsstudien von Willson und Mitarbeitern (2004) mit einem *lat-1*-dsRed-Fusionsprotein, zeigten ebenfalls punktuelle Signale in Neuronen des Isthmus, sowie einige wenige Signale am Bulbus. Außerdem waren bei Larven Expressionsmuster großflächig in Muskelzellen des Pharynx zu erkennen,

die allerdings bei adulten Tieren nicht mehr vorhanden waren (Willson et al., 2004; Harder et al., 2003). Es wurde in weiteren Studien auch über Expressionen des *lat-1* unter anderem in Kopfneuronen, Neuronen der dorsalen und ventralen Nervenbahnen und Neuronen des Schwanzbereiches berichtet (Hunt-Newbury et al., 2007). Außerdem wurde mittels Antikörpern gegen verschiedene Domänen von Hc110-R von *H. contortus* in *C. elegans*-Embryos eine Bindung im Pharynxbereich nachgewiesen (Saeger, 2000). Das Expressionsmuster des Depsiphilin von *C. oncophora*, welches in dieser Arbeit dokumentiert wurde, ist sehr wahrscheinlich nur unvollständig, da lediglich ein transkriptionales Promotor-Reporterkonstrukt verwendet wurde, welches meist kein vollständiges Bild der Expression eines Gens liefert (Boulin et al., 2006). Trotzdem decken sich die Ergebnisse zum Teil mit denen von Willson et al. (2004). Eine Expression von *lat-1* in Neuronen und Muskeln im Pharynx stimmt mit der Beobachtung überein, dass Emodepsid eine Paralyse des Pharynx auslöst (Willson et al., 2004; Guest et al., 2007). Dies wiederum unterstützt die Vermutung, dass das Depsiphilin, neben der Sequenzidentität und der Lokalisation, auch eine funktionale Übereinstimmung mit dem LAT-1 aufweist. Um diese These weiter zu festigen, sollte das Depsiphilin von *A. caninum* und *C. oncophora* in *lat-1lat-2* Doppelknockout-Mutanten von *C. elegans* exprimiert werden und anschließend die Reaktion der Pharynxaktivität auf eine Emodepsidexposition überprüft werden. Dieser Versuch wird in Abschnitt 5.1.4 diskutiert. Da ein Zusammenspiel von LAT-1 und dem Calcium-gesteuerten Kaliumkanal SLO-1 bei der Wirkweise von Emodepsid vermutet wird, ist der Expressionsort von SLO-1 ebenfalls interessant. Dieser Aspekt wird in Abschnitt 5.2.1.1 näher diskutiert.

5.1.4 Heterologe Expression des Depsiphilins von *A. caninum* und *C. oncophora* in *C. elegans lat-1lat-2*-knockout-Mutanten

Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor Depsiphilin von *A. caninum* und *C. oncophora* stellt, nach Sequenzidentitätsvergleich und Untersuchung der Lokalisation im Wurm, ein Ortholog zu LAT-1 von *C. elegans* dar. Da für LAT-1 eine Beteiligung am Wirkmechanismus von Emodepsid nachgewiesen wurde, sollte dieser Aspekt auch für das Depsiphilin von *A. caninum* und *C. oncophora* untersucht werden. Hierfür wurden die entsprechenden kodierenden Sequenzen in den modifizierten Vektor pPD30.69 kloniert, der, anstelle des *myo-2*-Promotors, eine etwa 3kb große

Promotorregion des *lat-1* von *C. elegans* als Promotor enthielt. Es wurden *lat-1/lat-2* Doppelknockout-Mutanten von *C. elegans* für die Transfektion verwendet, da bei diesen der Effekt von Emodepsid auf den Pharynx vermindert war (Guest et al., 2007; Willson et al., 2004). Um den Nachweis der Funktionalität des Depsiphilins von *A. caninum* und *C. oncophora* zu erbringen, hätte dieser Effekt durch ihre Expression aufgehoben werden sollen. Als Marker zur Selektion Depsiphilin-exprimierender Würmer diente *rol-6*, dessen Expression zu einer korkenzieherartigen Bewegungsweise der Tiere führt (Evans, 2006). Es konnten in der F1-Generation nur jeweils ein bis zwei Tiere mit dem *rol-6*-Phänotyp identifiziert werden. Die restliche Nachkommenschaft entwickelte sich zwar normal, zeigte aber keine Expression des Markergens. Der Grund hierfür könnte unter anderem darin liegen, dass nicht ausreichend Plasmid-DNA injiziert wurde, oder dass das Verhältnis von Marker- zu Ziel-Plasmid nicht optimal war. Bei Mello und Mitarbeitern (1991) wurden sowohl die Auswirkungen unterschiedlicher injizierter Plasmidmengen auf die Transformationsrate als auch die Effektivität der Co-Transfektion von *rol-6* mit einem anderen Marker-Plasmid (*sup-7(st5)*) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an *rol-6* exprimierenden F1-Transformanden mit erhöhter injizierter Plasmidmenge (12,5–200 µg/ml) ansteigt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass das Verhältnis der Mengen der beiden co-transfizierten Plasmide zueinander Auswirkungen auf die Transformationseffektivität beider Plasmide hat. Um eine bessere Transformationsrate zu erreichen, sollten bei einer Wiederholung des Versuchs daher sowohl die Ausgangsmenge der Plasmid-DNA erhöht werden, als auch verschiedene Mengenverhältnisse der beiden co-transfizierten Plasmide getestet werden.

5.2 Der Calcium-gesteuerte Kaliumkanal SLO-1

Die orthologe Sequenz zu dem Calcium-gesteuerten Kaliumkanal SLO-1 von *C. elegans*, für den kürzlich eine Beteiligung an der Wirkungsweise von Emodepsid nachgewiesen werden konnte (Guest et al., 2007; Holden-Dye et al., 2007), wurde in *A. caninum* identifiziert. Die Identität der Aminosäuresequenz zu SLO-1 von *C. elegans* liegt bei 87 %. Mit weiteren Calcium-gesteuerten Kaliumkanälen vom BK-Typ von Insekten, Mollusken, Vögeln und Säugern bewegen sich die Ähnlichkeiten in Bereichen zwischen 53 und 65 %. Dies zeigt, dass die Calcium-gesteuerten Kaliumkanäle über verschiedene Tierstämme hoch konserviert sind. Es wurden mit

einer Ionen-Transporter-Domäne und einer α -Untereinheit eines Calcium-gesteuerten Kaliumkanals vom BK-Typ konservierte Domänen detektiert. Diese Merkmale wurden bereits für SLO-1 von *C. elegans* von Wei (1996) beschrieben. Aufgrund der Sequenz- und Strukturähnlichkeiten wurde das identifizierte Gen analog zu *C. elegans* als SLO-1 benannt. Die α -Untereinheit besteht aus sieben Transmembrandomänen, die zusammen als selektiver Ionen-Kanal fungieren (Schreiber und Salkoff, 1997). Die fünf verwendeten Programme zur Voraussage von Transmembranregionen und Signalpeptiden erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. TMMOD sagte sechs Transmembranhelices voraus, HMMTOP acht, alle anderen sieben. Für SLO-1 von *C. elegans* sind sieben Transmembranhelices auch von Meera und Mitarbeitern (1997) bestimmt worden. Die Vorhersage der Anzahl der Transmembranhelices hängt von der jeweils vorausgesagten Position des NH_2 - und COOH -Terminus ab. Hier sagen TMMOD und HMMTOP jeweils einen extrazellulär gelegenen NH_2 - und COOH -Terminus voraus, die anderen Programme gehen von einem intrazellulären NH_2 -Terminus und einem extrazellulären COOH -Terminus aus. Diese Ergebnisse sind konträr zu den Ergebnissen anderer Untersuchungen. So wurde experimentell ein extrazellulärer NH_2 -Terminus und ein intrazellulär gelegener COOH -Terminus von SLO-1 von *C. elegans* nachgewiesen (Meera et al., 1997; Jiang et al., 2001; Magleby, 2003). Der Vergleich der Vorhersagen der unterschiedlichen Programme sowie der zu den experimentell nachgewiesenen konservierten Regionen zeigen, dass die Verwendung entsprechender Programme zur Vorhersage von Transmembrandomänen lediglich Hinweise auf die Struktur eines Proteins geben kann, weiterführende Untersuchungen zum detaillierten Aufbau jedoch unerlässlich sind.

5.2.1 *slo-1*-Promotor-gesteuerte GFP-Expression in *C. elegans*

Um die Lokalisation von SLO-1 der parasitischen Nematoden *A. caninum* und *C. oncophora* im Tier zu untersuchen, sollte durch Transfektion des Modellorganismus *C. elegans* eine *slo-1*-Promotor-gesteuerte GFP-Expression erreicht werden. Weiterhin sollte die Funktionalität der 3 kb großen Promotorregion von *slo-1*, die für die *rescue*-Experimente verwendet wurde, ebenfalls über eine GFP-Expression überprüft werden. Hierfür wurde von *A. caninum* und *C. oncophora* mittels der Genome Walker™ Methode (Clontech) jeweils ein 3677 bzw. 3424 bp großes Fragment stromaufwärts des Startcodons amplifiziert. Die Promotorsequenz

von *C. elegans slo-1* wurde mittels spezifischer Primer amplifiziert und hatte eine Länge von 3084 bp.

5.2.1.1 *A. caninum* und *C. oncophora slo-1*-Promotorgesteuerte GFP-Expression

Mittels der Programme Genome2Promoter und MatInspector von Genomatix konnten für die Promotorregion von *slo-1* *A. caninum* und *C. oncophora* keine spezifischen Promotorelemente oder Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert werden. Da diese Programme auf Grundlage von eukaryotischen Elementen nach Ähnlichkeiten suchen, können nematodenspezifische Promotorelemente nicht detektiert werden (Genomatix, GmbH). Es wurden lediglich zwei Konsensussequenzen identifiziert, die eventuell einen Hinweis auf eine RNA-Polymerase Bindungsstelle geben könnten. Es wurden keine TATA- und CAAT-Elemente identifiziert. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien zu Promotoren bei Nematoden (Culetto et al., 1999; Dibb et al., 1989; Okkema et al., 1993; Tawe et al., 2000; Krause et al., 2001; Gomez-Escobar et al., 2002). Obwohl in einigen wenigen Untersuchungen CAAT- und TATA-Elemente in Promotoren von Nematoden gefunden wurden (Hu et al., 2007), liegt die Vermutung nahe, dass das Fehlen von CAAT- und TATA-Box bei diesen eine häufig auftretende Eigenschaft ist (Higazi et al., 2005). Die genaue Identifizierung von Promotorelementen und deren Bedeutung für die Funktionalität des Promotors, kann letztlich nur über Reporterexpression durch gezielt verkürzte Promotorelemente erfolgen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, stand neben der grundsätzlichen Funktionalität von Promotoren parasitischer Nematoden in *C. elegans*, die Lokalisation des exprimierten GFPs im Vordergrund.

Die *slo-1*-Promotoren von *A. caninum*, *C. oncophora* und *C. elegans* führten erfolgreich zur GFP-Expression in hermaphroditen *C. elegans*. Es konnten jedoch bei etwa 50 je Promotorkonstrukt transfizierten Tieren, nur bei ein bzw. zwei Tieren ein GFP-Signal detektiert werden.

Die *slo-1*-Promotor-gesteuerte Expression des GFPs erfolgte bei allen drei Konstrukten häufig in punktförmigen Strukturen im Bereich des Pharynx. Dabei handelt es sich vermutlich um Expressionen in Neuronen, die im Bereich des Nervenrings um den Pharynx sehr dicht liegen. Dafür spricht ebenfalls, dass von manchen dieser Punkte fadenförmige Strukturen wegführen, die Nervenleitungen darstellen könnten. Bei der *C. elegans slo-1*-Promotor-gesteuerten Expression des

GFP sind in Abb. 44a eindeutig drei fluoreszierende Muskelzellen zu erkennen. Diese Muskelzellen sind aufgrund Form, Größe und Lage vermutlich Bestandteil des Hautmuskelschlauchs. Das Expressionsmuster in der Larve in Abb. 46a ist nicht so eindeutig. Hier könnte es sich sowohl um neuronale Signale handeln, als auch um eine Expression in Muskelzellen. Die *C. oncophora slo-1*-Promotor gesteuerte Expression des GFP führt unter anderem noch zu punktuellen Signalen entlang der Körperwand, die durch fluoreszierende Ableitungen miteinander verbunden sind. Hierbei handelt es sich vermutlich um Neuronen entlang des dorsalen bzw. ventralen Nervenstrangs (vgl. Abbildung 32). Bei den Tieren mit der *C. elegans* und *C. oncophora slo-1*-Promotor gesteuerten GFP-Expression, sind im Schwanzbereich der Tiere, nahe der Analöffnung, punktförmige GFP-Signale zu erkennen. In diesem Bereich befindet sich eine größere Anzahl an Neuronen (siehe Abbildung 32). Die GFP-Signale zeigen also auch hier eine *slo-1* Expression in Nervenzellen an. Zusammenfassend lässt sich für alle drei Konstrukte eine vermehrte Expression in Neuronen des Pharynxbereich feststellen. Außerdem finden sich für einzelne Konstrukte, Expressionssignale in Muskelzellen. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Wang und Mitarbeitern (2001). Hier wurde die Lokalisation des *C. elegans* SLO-1 im Wurm mittels Antikörperfärbung und Expression eines GFP-gekoppelten *slo-1*-Fusionsproteins durchgeführt. Die Expression des Fusionsproteins erfolgte mittels einer 5,2 kb großen Promotorregion von *slo-1*. Diese wurde nicht näher auf bestimmte Promotorelemente untersucht. Die Funktionalität des Promotors konnte aber durch die Expression im Nervenring und in der Körperwandmuskulatur nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deckten sich mit denen der Antikörperfärbung. In den Untersuchungen von Wang et al. (2001) sind die Signale im Nervenring großflächiger und nicht auf punktförmige Expressionen beschränkt, wie in dieser Arbeit. Die eher punktuellen GFP-Signale dieser Arbeit finden sich sowohl bei der *C. elegans slo-1* Promotor-gesteuerten GFP-Expression (abgesehen von den Muskelzellen) als auch bei Verwendung der Promotoren aus den parasitischen Nematoden. Daher ist es nicht wahrscheinlich, dass dieses eher schwache Expressionsmuster durch die nicht artspezifischen Promotoren begründet ist. Im Gegenteil untermauert das ähnliche Expressionsmuster die Funktionalität der Promotoren der parasitischen Nematoden. Bei Britton und Murray (2006) wird vermutet, dass ein schwaches Expressionsmuster auf eine generell schwache Expression zurückzuführen ist, d.h. es werden eventuell sehr schwache

Expressionen gar nicht mehr detektiert. SLO-1 wird also eventuell nicht in einer großen Dichte oder Häufigkeit exprimiert und ist daher nicht deutlich zu detektieren. Der Grund für die Unterschiede in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Expressionsmustern von SLO-1 könnte vielmehr in dem Aufbau des Expressionskonstrukts liegen. In dieser Arbeit wurde der *slo-1* Promotor vor die GFP-kodierende Sequenz kloniert, was zu einem transkriptionalen Reporterkonstrukt führt, welches eine Expression im Zytoplasma, Kern oder anderen Zellkompartimenten in der exprimierenden Zelle herbeiführt (Okkema und Krause, 2005; Boulin et al., 2006). Wang et al. (2001) verwendeten ein Fusionskonstrukt, bei dem der *slo-1*-Promotor vor der kodierenden Sequenz von *slo-1* lokalisiert ist, das GFP wurde im Bereich der Calcium-bindenden Region integriert. Hierdurch entsteht ein translationales Reporterkonstrukt, welches die subzelluläre Lokalisation des endogenen Proteins nachbildet. Außerdem ist in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukten das dazugehörige Startcodon ATG nicht mit in die mögliche Promotorregion integriert worden, so dass erst das etwa 100 bp entfernte Startcodon der GFP-Sequenz verwendet wurde. Bei vielen Promotoren verschiedenster Tierarten und -stämme liegen wichtige regulatorische Elemente nur wenige dutzend Basen entfernt vom Startcodon. Fehlt dieses bzw. ist dieses durch den Eingriff weiter entfernt, kann sich unter Umständen die Transkription verändern (Okkema und Krause, 2005). Zudem ist zu bemerken, dass der tatsächliche Promotor eine weit größere Region einnehmen kann, z. B. finden sich regulatorische Elemente häufig sogar in Introns. Hierbei sind besonders große Introns von Bedeutung, die sich am Anfang der entsprechenden kodierenden Sequenz befinden (Okkema et al., 1993; Nam et al., 2002). Das *C. elegans slo-1* weist am Anfang der genomischen Sequenz ein 672 bp großes Intron auf, Analysen der genomischen Struktur von *slo-1* von Ascariden im Institut für Parasitologie weisen ebenfalls darauf hin, dass Introns häufig eine Größe von 100 bp überschreiten (Miltsch, 2008). Hier könnten sich also weitere Elemente befinden, die für die Transkription bedeutend sind. Sofern diese Daten auch auf die hier untersuchten parasitischen Nematoden übertragbar sein sollten, fände sich hier eine weitere Erklärung für das vermutlich lückenhafte Expressionsmuster. Es gibt Berichte über die Verwendung von Promotor-Reporterkonstrukten, die nur nach Einbeziehung sehr großer genomischer Regionen erfolgreich zu einer Expression führten. So wird das Gen *lin-39* in *C. elegans* nur in vollem Umfang exprimiert, wenn eine Promotorregion von etwa 30

kb verwendet wird (Okkema und Krause, 2005). Dies zeigt, dass weitere Untersuchungen nötig sind, um die tatsächliche Bandbreite der Expression von *slo-1*, sowohl unter dem *C. elegans slo-1*-Promotor als auch unter dem der parasitischen Nematoden, aufzudecken. Neben der Erstellung von Fusionsproteinen, wäre es sinnvoll, vergleichend ebenfalls Antikörperfärbungen und *in situ* Hybridisierungen vorzunehmen, um die Ergebnisse zu bestätigen. Für diese Studie war es jedoch zunächst wichtig, generell die Funktionalität der Promotoren über ein GFP-Reporterkonstrukt zu bestätigen, da dies mit den *rescue*-Versuchen allein unter Umständen nicht möglich gewesen wäre. Unter der Annahme, dass die erzielten Expressionsmuster ein Teilbild der Lokalisation von *slo-1* in *C. elegans* darstellen, stellt sich die Frage nach der Funktion von *slo-1* in diesen Gewebetypen.

5.2.2 Funktionale Expression von *slo-1* von *C. elegans*, *A. caninum* und *C. oncophora* in *C. elegans slo-1*-knockout-Mutanten (*js 379*)

Um die Funktionsfähigkeit des SLO-1 von *A. caninum* und *C. oncophora* zu überprüfen und damit den Nachweis der Beteiligung am Wirkmechanismus des Emodepsids zu erbringen, wurde das Protein der jeweiligen parasitischen Nematoden in *C. elegans* exprimiert. Hierfür wurden drei verschiedene Expressionskonstrukte erstellt (siehe 3.23.2), die sich jeweils in der eingesetzten Promotorregion unterschieden. Der *myo-3*-Promotor von *C. elegans* führt zu einer Expression in Muskelzellen, der *snb-1*-Promotor zu einer Expression in Nervenzellen. Die 3 kb große, putative Promotorregion des *slo-1* von *C. elegans* sollte ein möglichst natürliches Expressionsmuster gewährleisten. Neben dem *slo-1* der parasitischen Nematoden wurde auch für die kodierende Sequenz des *slo-1* von *C. elegans* ein Expressionskonstrukt erstellt, welches die 3 kb große native Promotorregion von *C. elegans slo-1* enthielt. Die Konstrukte mit dem *myo-3*-Promotor wurden im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen zunächst nicht weiter verwendet.

Es wurden hermaphrodite *slo-1*-knockout-Mutanten von *C. elegans* mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert, deren F1-Nachkommenschaft verschiedenen Emodepsid-Konzentrationen ausgesetzt und nach 24 Stunden die Bewegungsaktivität der Würmer ermittelt (siehe Abschnitt 4.3 und 6.3). Es sollte anfangs überprüft werden, ob die emodepsidresistenten *slo-1*-knockout-Mutanten *js 379* die Sensitivität gegenüber Emodepsid durch die Transfektion mit *slo-1* von

parasitischen Nematoden wiedererlangen. Hierzu wurde zunächst nur eine hohe Konzentration (10 μ M) getestet. Diese Versuche wurden nur mit dem mit den *snb-1*-Promotor-gesteuerten *C. oncophora slo-1* exprimierenden *C. elegans js379* (Konstrukt Co pBK3.1 *Co slo-1 snb-1*) durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Bewegungsaktivität im Vergleich zu den Kontrollen. Dies belegte, dass *slo-1* von *C. oncophora* unter dem *snb-1*-Promotor funktional in *C. elegans* exprimiert werden konnte. Daraufhin wurden Versuche zum dosisabhängigen Effekt von Emodepsid durchgeführt (siehe 4.3.3). Für die Konstrukte Ac pBK3.1 *Ac slo-1 snb-1* und Co pBK3.1 *Co slo-1 snb-1* fallen die Ergebnisse des Assays sehr ähnlich aus. Bei beiden ist ein signifikanter ($p < 0,05$) Effekt des Emodepsids erst ab einer Konzentration von 100 nM zu verzeichnen; das gleiche gilt für den Wildtyp Bristol N2. Die Bewegungsfähigkeit des *slo-1*-knockout-Stammes *js379* bleibt auch bei hohen Konzentrationen unbeeinflusst. Der Effekt auf den Wildtyp ist deutlicher als auf die rescue-Stämme, trotzdem ist die Reduktion der *body bends*/min im Vergleich zu den Kontrollen (*js 379*, Wildtyp N2 auf EtOH, EtOH-Kontrollen der transgenen Würmer) signifikant ($p < 0,05$). Die Anzahl der *body bends*/min verringert sich mit den beiden folgenden Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M) weiter und sinkt bei 10 μ M auf beinahe Null ab. Dies ist für die transgenen Linien nicht der Fall, diese zeigen bei 10 μ M noch eine Bewegungsaktivität von ca. 6-7 *body bends*/min. Es handelt sich hier demnach nur um eine unvollständige Wiederherstellung der Sensitivität auf Emodepsid. Das bedeutet, dass der Effekt des Emodepsids, der über SLO-1 vermittelt wird, nicht nur über den neuronalen Weg gesteuert wird. Es wurde bereits die Expression des *slo-1* in Neuronen und Muskelzellen in *C. elegans* nachgewiesen (Wang et al., 2001). Außerdem wurde in Untersuchungen mittels Expression des *C. elegans slo-1* unter dem neuronalen *snb-1*-Promotor und dem muskulären *myo-3*-Promotor, bzw. einer Kombination aus beiden, bereits nachgewiesen, dass lediglich die Kombination beider Promotoren zur Wiederherstellung des Wildtyps führte (Guest et al., 2007).

Die Ergebnisse der *body bend*-Assays bei Expression der *slo-1*-Gene von *A. caninum*, *C. oncophora* und *C. elegans* unter dem 3 kb *slo-1*-Promotor von *C. elegans* sind ebenfalls für alle drei untersuchten Konstrukte (Ac pBK3.1 *Ce prom*, Co pBK3.1 *Ce prom* und Ce pBK3.1 *Ce prom*) sehr ähnlich. Auch hier ist ab einer Emodepsidkonzentration von 100 nM ein Effekt auf die Bewegungsaktivität der transgenen Würmer und den Wildtyp zu erkennen. Hier ist, im Unterschied zu den

Versuchen mit dem *snb-1*-Promotor, der Effekt auf den Wildtyp und die transgenen Tiere nahezu identisch. Außerdem ist der Unterschied zwischen den Konstrukten der drei Arten sehr gering. Da auch der Phänotyp der entsprechenden transgenen Tiere dem des Wildtyps entspricht (die Art der Paralyse nach Emodepsidexposition ist gleich), kann hier von einer kompletten Wiederherstellung des Wildtyps in Bezug auf den Effekt von Emodepsid auf die Bewegungsfähigkeit ausgegangen werden (total rescue). Außerdem konnte auf diese Art nachgewiesen werden, dass, nach heterologer Transfektion, das SLO-1 parasitischer Nematoden nicht nur durch Sequenzidentitätsvergleiche als Orthologe zu *C. elegans* SLO-1 eingeordnet werden können, sondern auch ihre Funktionalität bei der Wirkung von Emodepsid diese Einordnung unterstützt. Guest und Mitarbeiter (2007) konnten mit rescue-Experimenten mit *slo-1* von *C. elegans* unter zwei verschiedenen Promotoren nachweisen, dass sowohl unter dem *myo-3*-Promotor (Expression in Muskelzellen) als auch unter dem *snb-1*-Promotor (Expression in Neuronen) die Sensitivität des Effekts von Emodepsid auf die Lokomotion in *js379* wiederhergestellt werden konnte. Die Sensitivität war allerdings ab einer Konzentration von 100 nM bei den transgenen Tieren nicht so stark ausgeprägt wie beim Wildtyp. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen der Versuche mit dem *snb-1*-Promotor aus den Untersuchungen der eigenen Arbeit. Rescue-Versuche mit dem natürlichen *slo-1*-Promotor von *C. elegans* wurden bislang nicht durchgeführt. Allerdings kam es in den Untersuchungen von Guest et al., wie oben erwähnt, bei einer Kombination von beiden Promotoren zur kompletten Wiederherstellung des Wildtyps. Die hier durchgeführten Versuche mit dem natürlichen *slo-1* Promotor führten ebenfalls dazu, dass der Phänotyp des Wildtyps wieder komplett wiederhergestellt wurde. Dies wiederum untermauert die These von Guest et al. (2007), dass die SLO-1 Funktionalität in Bezug auf den Emodepsideffekt sowohl über SLO-1 im Nervensystem als auch in Muskelzellen gesteuert wird. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass in den Versuchen der vorliegenden Arbeit, der Phänotyp der *snb-1*-gesteuerten *slo-1*-Expression nicht dem in den Untersuchungen bei Guest et al. (2007) entsprach. Dort zeigten die *snb-1-slo-1* transfizierten Tiere nach Emodepsidexposition eine Paralyse, bei der sie sich aufrollten. Das *myo-3-slo-1*-Konstrukt, resultierte dagegen in einem Wildtyp-ähnlichen Phänotyp, d.h. der Wurm konnte je nach Emodepsidkonzentration keine vollständige Schlängelbewegung mehr ausführen, sondern schob das paralyisierte Kopfende mit dem noch leicht

beweglichen Hinterende vorwärts. Bei einer Emodepsidkonzentration von 10 μ M war der Körper der meisten Würmer nur noch lang ausgestreckt und bewegungsunfähig bzw. tot.

Die Cotransfektion beider Konstrukte führte ebenfalls zu dem aufgerollten Phänotyp, allerdings in einem geringeren Ausmaß. In den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten alle transgenen Tiere die Art von Paralyse, wie sie für den Wildtyp beschrieben wurde. Sie unterschieden sich jeweils nur, abhängig vom verwendeten Promotor, in der Intensität der Reaktion auf die Emodepsidexposition. Zur Kontrolle wäre eine Wiederholung der rescue-Experimente mit dem natürlichen *C. elegans slo-1* unter dem *snb-1*-Promotor hilfreich. Es wurde diskutiert, dass das Aufrollen der transgenen Tiere mit der *snb-1*-gesteuerten *slo-1*-Expression aus einem Ungleichgewicht von exzitatorischer und inhibitorischer Signaltransduktion resultiert (Walthall et al., 1993; Alfonso et al., 1993). Hier könnte eine Überexpression von *slo-1* in Neuronen diesen Effekt auslösen (Guest et al., 2007). Die Sequenzunterschiede von *slo-1* der parasitischen Nematoden zu *slo-1* von *C. elegans* könnten wiederum dazu führen, dass der Effekt der Überexpression nicht zum Tragen kommt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *slo-1* der parasitischen Nematoden *A. caninum* und *C. oncophora* sowohl unter dem neuronalen Promotor *snb-1* als auch unter einem 3 kb großen möglichen *slo-1*-Promotor von *C. elegans* funktional in *C. elegans* exprimiert wurde und ebenso ein dosisabhängiger Effekt auf Emodepsid nachgewiesen werden konnte. Durch den *C. elegans slo-1*-Promotor konnte der Wildtyp in Bezug auf den Emodepsideffekt auf die Bewegungsaktivität wieder hergestellt werden. In weiterführenden Studien sollte die Expression des *slo-1* von *A. caninum* und *C. oncophora* unter deren eigenen *slo-1*-Promotoren erfolgen, um zu ermitteln, ob diese Expression ebenfalls zu einer Wiederherstellung der Funktionalität führt. Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zur heterologen Expression von *slo-1* parasitischer Nematoden konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur die Sequenzidentitäten von *slo-1* von *A. caninum* und *C. oncophora* zu *slo-1* von *C. elegans* dafür sprechen, diese als Orthologe zu bezeichnen, sondern auch die Analyse der Funktionalität diese Einordnung untermauert. Diese Versuche unterstützen die These von Guest und Mitarbeitern (2007), dass *slo-1* eine entscheidende Rolle in der Wirksamkeit von Emodepsid spielt.

Die hier durchgeführten Versuche sind die ersten, in denen eine funktionale heterologe Expression von Genen parasitischer Nematoden in *C. elegans*-Mutanten durchgeführt wurde und für die dabei die komplette Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps in adulten Würmern gelang. Es sind bislang nur zwei Studien bekannt, in denen die funktionale Expression von Genen parasitischer Nematoden, in beiden Fällen putative Rezeptoren für Anthelminthika, durchgeführt wurde. Kwa et al. (1995) haben β -Tubulin (Isotyp 1) von *H. contortus* in benzimidazolresistenten Mutanten von *C. elegans* (*ben-1* TU1054) exprimiert. Bei dem verwendeten *H. contortus* β -tubulin Isotyp handelt es sich um das mit Benzimidazolempfindlichkeit assoziierte Allel. Den benzimidazolresistenten *C. elegans* Mutanten fehlt das *ben-1*-Gen, das für ein β -Tubulin kodiert. Sie zeigen eine signifikant erhöhte ED₅₀ in Bezug auf Thiabendazol, einem Benzimidazol. Dies bedeutet, die Dosis, bei der sich 50 % der Eier der F1-Generation nicht mehr entwickeln ist höher als bei dem Wildtyp N2. Die *H. contortus* β -Tubulin exprimierenden *ben-1* TU1054 zeigten dagegen eine, im Vergleich zu den resistenten Würmern, niedrigere ED₅₀, die allerdings nicht den für den Wildtyp ermittelten Wert der ED₅₀ erreichte. Allerdings konnte auch durch eine Transfektion mit dem *ben-1*-Gen von *C. elegans* nicht eine komplette Wiederherstellung des Wildtyps, in Bezug auf den Effekt von Thiabendazol auf die Entwicklung der Eier, erreicht werden. Cook et al. (2006) haben ein weiteres Gen von *H. contortus* in *C. elegans* exprimiert. Die α -Untereinheit eines Glutamat-gesteuerten Chloridkanals (GluCl α) bindet das Anthelminthikum Ivermectin und vermittelt seine paralyisierende Wirkung. GluCl α von *H. contortus* wurde in GluCl α -Mutanten von *C. elegans* (*avr-14(ad1032)*) exprimiert, die eine verringerte Sensitivität gegenüber Ivermectin aufweisen (keine Resistenz). Es wurden in dieser Studie aber lediglich Unterschiede im grundsätzlichen Bewegungsverhalten von Wildtyp, GluCl α -Mutante und transgener GluCl α -Mutante untersucht und keine Effekte des Ivermectins analysiert. In Bezug auf die Änderung der Fortbewegungsmuster konnte jedoch für die *H. contortus* GluCl α -exprimierenden *C. elegans* GluCl α -Mutanten eine nahezu komplette Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps erreicht werden.

Die Schwierigkeiten der Haltung und Vermehrung von parasitischen Nematoden *in vitro* erfordern alternative Methoden zur Untersuchung der Funktionalität ihrer Gene. Die in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführten Versuche, zeigen deutlich, dass diese Methode ein geeignetes Werkzeug zur funktionellen Analyse von Genen parasitischer Nematoden darstellt. Sie kann in der Zukunft hilfreich sein, z.B. direkte

Effekte von Anthelminthika auf bestimmte Gene zu untersuchen, Signalwege zu analysieren und damit Möglichkeiten zur spezifischen Entwicklung neuer Wirkstoffe zu eröffnen.

5.3 Zusammenfassende Bewertung und Ausblick

Die in dieser Arbeit identifizierten kodierenden Sequenzen des Depsiphilins und *slo-1* von *A. caninum* stellen jeweils Orthologe zu Proteinen dar, für die eine Beteiligung am Wirkmechanismus des Anthelminthikums Emodepsid nachgewiesen wurde. Es konnte für das Depsiphilin mittels quantitativer real-time PCR eine deutlich erhöhte Transkriptionsrate in Eiern im Vergleich zu anderen Entwicklungsstadien von *A. caninum* bestimmt werden. Die *C. oncophora* Depsiphilin-Promotor-gesteuerte GFP-Expression in *C. elegans* führte zu einer Expression des GFP in Neuronen des Pharynx und des Analbereichs, sowie in Muskelzellen des Hautmuskelschlauchs. Die *A. caninum*, *C. oncophora* und *C. elegans slo-1*-Promotor-gesteuerte GFP-Expression in *C. elegans* lieferte ein ähnliches Expressionsmuster. Dies unterstützt die These eines möglichen Zusammenspiels der beiden Proteine in der Wirkkaskade des Emodepsids.

Es gelang weiterhin die funktionale Expression von *slo-1* von *A. caninum* und *C. oncophora* in *C. elegans*. Die Nachkommenschaft Emodepsid-resistenter *slo-1*-knockout-Mutanten von *C. elegans* (*js379*) erlangte nach Transfektion mit *slo-1* von *A. caninum* und *C. oncophora* vollständig ihre Sensitivität gegenüber dem Emodepsid, hinsichtlich der Hemmung der Bewegungsaktivität, zurück. Dieser Versuch stellt die erste Untersuchung dieser Art dar, mittels derer die Funktionalität von Genen parasitischer Nematoden durch heterologe Expression in *C. elegans* nachgewiesen wurde. Er lieferte den Nachweis, dass SLO-1 von *A. caninum* und *C. oncophora* in den Wirkmechanismus von Emodepsid eingebunden sind. Die funktionale Expression des Depsiphilins von *A. caninum* und *C. oncophora* gelang dagegen nicht. In weiterführenden Studien, z.B. zunächst unter Verwendung anderer *lat-1*-Mutanten, sollte versucht werden, die Funktionalität des Depsiphilins von *A. caninum* und *C. oncophora* nachzuweisen. Durch Veränderungen im Aufbau der Promotor-Reporterkonstrukte sollten zukünftig versucht werden, die Intensität und Breite der GFP-Reporterexpression zu erhöhen. Hierfür sollten translationale Promotor-Reporterkonstrukte verwendet werden, um ein möglichst natürliches Bild des Expressionsortes der entsprechenden Proteine zu gewährleisten.

Das Zusammenspiel der bisher analysierten möglichen Partner in der Wirkkaskade von Emodepsid (SLO-1, LAT-1, LAT-2) muss in Zukunft näher untersucht werden. Lajus et al. (2005) konnten zeigen, dass in Toxin-sensitiven MIN6 β -Zellen, das α -Latrotoxin (α -LTX) über das Latrophilin und die Phospholipase C einen Signalweg induziert, über den physiologisch wichtige Kalium- und Calciumkanäle reguliert werden. Ob, wie bei Holden-Dye et al. (2007) vermutet, SLO-1 als Rezeptor fungiert und LAT-1 einen mediatorischen Effekt hat, oder die Latrophiline zusammen mit anderen Komponenten die Emodepsidrezeptoren darstellen, sollte in weiteren Untersuchungen, z. B. unter Verwendung des hier erfolgreich angewendeten *C. elegans*-functional-rescue-Verfahrens nachgegangen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aboobaker, A. A. & Blaxter, M. L. (2003) Use of RNA interference to investigate gene function in the human filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **129**, 41-51.
- Abubucker, S., Martin, J., Yin, Y., Fulton, L., Yang, S. P., Hallsworth-Pepin, K., Johnston, J. S., Hawdon, J., McCarter, J. P., Wilson, R. K. & Mitreva, M. (2008) The canine hookworm genome: analysis and classification of *Ancylostoma caninum* survey sequences. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **157**, 187-192.
- Alfonso, A., Grundahl, K., Duerr, J. S., Han, H. P. & Rand, J. B. (1993) The *Caenorhabditis elegans unc-17* gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science*, **261**, 617-619.
- Altreuther, G., Borgsteede, F. H., Buch, J., Charles, S. D., Cruthers, L., Epe, C., Young, D. R. & Krieger, K. J. (2005a) Efficacy of a topically administered combination of emodepside and praziquantel against mature and immature *Ancylostoma tubaeforme* in domestic cats. *Parasitol.Res.*, **97**, S51-S57.
- Altreuther, G., Buch, J., Charles, S. D., Davis, W. L., Krieger, K. J. & Radeloff, I. (2005b) Field evaluation of the efficacy and safety of emodepside/praziquantel spot-on solution against naturally acquired nematode and cestode infections in domestic cats. *Parasitol.Res.*, **97**, S58-S64.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
- Anderson, T. J., Blouin, M. S. & Beech, R. N. (1998) Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Adv.Parasitol.*, **41**, 219-283.
- Anziani, O. S., Suarez, V., Guglielmone, A. A., Warnke, O., Grande, H. & Coles, G. C. (2004) Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. *Vet Parasitol*, **122**, 303-306.
- Ardelli, B. F. & Prichard, R. K. (2004) Identification of variant ABC-transporter genes among *Onchocerca volvulus* collected from ivermectin-treated and untreated patients in Ghana, West Africa. *Ann.Trop.Med.Parasitol*, **98**, 371-384.
- Attwood, T. K. & Findlay, J. B. (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng*, **7**, 195-203.
- Avery, L. & Shtonda, B. B. (2003) Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J.Exp.Biol.*, **206**, 2441-2457.
- Barr, M. M. & Garcia, L. R. (2006) Male mating behavior. *WormBook.*, 1-11.

- Bartley, D. J., Jackson, F., Jackson, E. & Sargison, N. (2004) Characterisation of two triple resistant field isolates of *Teladorsagia* from Scottish lowland sheep farms. *Vet Parasitol.*, **123**, 189-199.
- Beech, R. N., Prichard, J. C. & Scott, M. E. (1994) Genetic Variability of the β -Tubulin Genes in Benzimidazole-Susceptible and -Resistant Strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics*, **138**, 103-110.
- Benatar, M. (2000) Neurological potassium channelopathies. *QJM.*, **93**, 787-797.
- Blackhall, W. J., Liu, H. Y., Xu, M., Prichard, R. K. & Beech, R. N. (1998) Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **95**, 193-201.
- Blaxter, M. (1998) *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science*, **282**, 2041-2046.
- Blouin, M. S., Yowell, C. A., Courtney, C. H. & Dame, J. B. (1995) Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics*, **141**, 1007-1014.
- Boersema, J. H., Eysker, M. & Nas, J. W. (2002) Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Vet.Rec.*, **150**, 279-281.
- Boulin, T., Etchberger, J. F. & Hobert, O. (2006) Reporter gene fusions. *Wormbook*, 1-23.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **77**, 71-94.
- Britton, C. & Murray, L. (2006) Using *Caenorhabditis elegans* for functional analysis of genes of parasitic nematodes. *Int.J.Parasitol.*, **36**, 651-659.
- Britton, C., Redmond, D. L., Knox, D. P., McKerrow, J. H. & Barry, J. D. (1999) Identification of promoter elements of parasite nematode genes in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **103**, 171-181.
- Brown, T. A. (1999) Regulation der Genexpression. In: *Moderne Genetik*. ed. Brown, T. A., pp. 164-186.
- Bull, K., Cook, A., Hopper, N. A., Harder, A., Holden-Dye, L. & Walker, R. J. (2007) Effects of the novel anthelmintic emodepside on the locomotion, egg-laying behaviour and development of *Caenorhabditis elegans*. *Int.J.Parasitol.*, **37**, 627-636.
- Bürglin, T. R., Lobos, E. & Blaxter, M. L. (1998) *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes. *Int.J.Parasitol.*, **28**, 395-411.
- Bustin, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.*, **25**, 169-193.
- Bustin, S. A. (2004) Quantification strategies in real-time PCR. In *A-Z of quantitative PCR*. ed.: Bustin, S. A., pp. 95-98.

- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M. W. (2005) Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J.Mol.Endocrinol.*, **34**, 597-601.
- Bustin, S. A., Gyselman, V. G., Williams, N. S. & Dorudi, S. (1999) Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br.J.Cancer*, **79**, 1813-1820.
- Bustin, S. A. & Nolan, T. (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J.Biomol.Tech.*, **15**, 155-166.
- C.elegans Sequence Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, **282**, 2012-2018.
- Calvo, E. L., Boucher, C., Coulombe, Z. & Morisset, J. (1997) Pancreatic GAPDH gene expression during ontogeny and acute pancreatitis induced by caerulein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **235**, 636-640.
- Carre-Pierrat, M., Grisoni, K., Gieseler, K., Mariol, M. C., Martin, E., Jospin, M., Allard, B. & Segalat, L. (2006) The SLO-1 BK channel of *Caenorhabditis elegans* is critical for muscle function and is involved in dystrophin-dependent muscle dystrophy. *J.Mol.Biol.*, **358**, 387-395.
- Cassada, R. C. & Russell, R. L. (1975) The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev.Biol.*, **46**, 326-342.
- Castillo-Davis, C. I., Mekhedov, S. L., Hartl, D. L., Koonin, E. V. & Kondrashov, F. A. (2002) Selection for short introns in highly expressed genes. *Nat.Genet.*, **31**, 415-418.
- Cheng, Y., Coles, G. C. und Blake, N. (2003): Multiresistant nematodes on a Devon farm. *Vet Rec.*, **153**, 604.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G. & Thompson, J. D. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3497-3500.
- Coghlan, A. & Wolfe, K. H. (2004) Origins of recently gained introns in *Caenorhabditis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 11362-11367.
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A. & Waller, P. J. (1992) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol*, **44**, 35-44.
- Coles, G. C., Watson, C. L. & Anziani, O. S. (2001) Ivermectin-resistant *Cooperia* in cattle. *Vet.Rec.*, **148**, 283-284.
- Conder, G. A., Johnson, S. S., Nowakowski, D. S., Blake, T. E., Dutton, F. E., Nelson, S. J., Thomas, E. M., Davis, J. P. & Thompson, D. P. (1995) Anthelmintic profile of the cyclodepsipeptide PF1022A in in vitro and in vivo models. *J.Antibiot.(Tokyo)*, **48**, 820-823.

- Conway , D. P. (1964) Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *Am.J.Vet.Res.*, **25**, 844-846.
- Couthier, A., Smith, J., McGarr, P., Craig, B. & Gilleard, J. S. (2004) Ectopic expression of a *Haemonchus contortus* GATA transcription factor in *Caenorhabditis elegans* reveals conserved function in spite of extensive sequence divergence. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **133**, 241-253.
- Culetto, E., Combes, D., Fedon, Y., Roig, A., Toutant, J. P. & Arpagaus, M. (1999) Structure and promoter activity of the 5' flanking region of *ace-1*, the gene encoding acetylcholinesterase of class A in *Caenorhabditis elegans*. *J.Mol.Biol.*, **290**, 951-966.
- Davies, A. G., Pierce-Shimomura, J. T., Kim, H., VanHoven, M. K., Thiele, T. R., Bonci, A., Bargmann, C. I. & McIntire, S. L. (2003) A central role of the BK potassium channel in behavioral responses to ethanol in *C. elegans*. *Cell*, **115**, 655-666.
- Davletov, B. A., Meunier, F. A., Ashton, A. C., Matsushita, H., Hirst, W. D., Lelianova, V. G., Wilkin, G. P., Dolly, J. O. & Ushkaryov, Y. A. (1998) Vesicle exocytosis stimulated by alpha-latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored CA²⁺. *EMBO J*, **17**, 3909-3920.
- Deplazes, P. (2006) Helminthosen von Hund und Katze. In: *Veterinärmedizinische Parasitologie*. ed.: Schnieder, T., pp. 444-520.
- Desprez, P. Y., Poujol, D. & Saez, S. (1992) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C. 1.2.1.12.) gene expression in two malignant human mammary epithelial cell lines: BT-20 and MCF-7. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃). *Cancer Lett.*, **64**, 219-224.
- Dibb, N. J., Maruyama, I. N., Krause, M. & Karn, J. (1989) Sequence analysis of the complete *Caenorhabditis elegans* myosin heavy chain gene family. *J.Mol.Biol.*, **205**, 603-613.
- Echevarria, F., Borba, M. F., Pinheiro, A. C., Waller, P. J. & Hansen, J. W. (1996) The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Brazil. *Vet.Parasitol.*, **62**, 199-206.
- Eddi, C., Caracostantogolo, J., Pena, M., Schapiro, J., Marangunich, L., Waller, P. J. & Hansen, J. W. (1996) The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Argentina. *Vet.Parasitol.*, **62**, 189-197.
- Elard, L. & Humbert, J. F. (1999) Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 β -tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol Res*, **85**, 452-456.
- Elkins, T., Ganetzky, B. & Wu, C. F. (1986) A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **83**, 8415-8419.

- Eng, J. K., Blackhall, W. J., Osei-Atweneboana, M. Y., Bourguinat, C., Galazzo, D., Beech, R. N., Unnasch, T. R., Awadzi, K., Lubega, G. W. & Prichard, R. K. (2006) Ivermectin selection on beta-tubulin: evidence in *Onchocerca volvulus* and *Haemonchus contortus*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **150**, 229-235.
- Evans, T. C. (2006) Transformation and Microinjection. In *Wormbook*.
- Filmore, D. (2004): It's a GPCR world. *Modern Drug Discovery*. 24-28.
- Finn, R. D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. & Bateman, A. (2006) Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res.*, **34**, D247-D251.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fitch, D. H. (2005a) Evolution: an ecological context for *C. elegans*. *Curr.Biol.*, **15**, R655-R658.
- Fitch, D. H. (2005b) Introduction to nematode evolution and ecology. *WormBook.*, 1-8.
- Fredriksson, R. & Schioth, H. B. (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol.Pharmacol.*, **67**, 1414-1425.
- Freyschuss, B., Sahlin, L., Masironi, B. & Eriksson, H. (1994) The hormonal regulation of the oestrogen receptor in rat liver: an interplay involving growth hormone, thyroid hormones and glucocorticoids. *J.Endocrinol.*, **142**, 285-298.
- Geary, T. G. & Thompson, D. P. (2001) *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites? *Vet.Parasitol.*, **101**, 371-386.
- Geldhof, P., Visser, A., Clark, D., Saunders, G., Britton, C., Gilleard, J., Berriman, M. & Knox, D. (2007) RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects. *Parasitology*, **134**, 609-619.
- Gomez-Escobar, N., Gregory, W. F., Britton, C., Murray, L., Corton, C., Hall, N., Daub, J., Blaxter, M. L. & Maizels, R. M. (2002) Abundant larval transcript-1 and -2 genes from *Brugia malayi*: diversity of genomic environments but conservation of 5' promoter sequences functional in *Caenorhabditis elegans*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **125**, 59-71.
- Granato, M., Schnabel, H. & Schnabel, R. (1994) pha-1, a selectable marker for gene transfer in *C. elegans*. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1762-1763.
- Grant, W. N., Skinner, S. J., Newton-Howes, J., Grant, K., Shuttleworth, G., Heath, D. D. & Shoemaker, C. B. (2006a) Heritable transgenesis of *Parastrongyloides trichosuri*: a nematode parasite of mammals. *Int.J.Parasitol.*, **36**, 475-483.

- Grant, W. N., Stasiuk, S., Newton-Howes, J., Ralston, M., Bisset, S. A., Heath, D. D. & Shoemaker, C. B. (2006b) *Parastrongyloides trichosuri*, a nematode parasite of mammals that is uniquely suited to genetic analysis. *Int.J.Parasitol.*, **36**, 453-466.
- Guest, M., Bull, K., Walker, R. J., Amliwala, K., O'Connor, V., Harder, A., Holden-Dye, L. & Hopper, N. A. (2007) The calcium-activated potassium channel, SLO-1, is required for the action of the novel cyclo-octadepsipeptide anthelmintic, emodepside, in *Caenorhabditis elegans*. *Int.J.Parasitol.*, **37**, 1577-1588.
- Guiliano, D. B., Hall, N., Jones, S. J., Clark, L. N., Corton, C. H., Barrell, B. G. & Blaxter, M. L. (2002) Conservation of long-range synteny and microsynteny between the genomes of two distantly related nematodes. *Genome Biol.*, **3**, RESEARCH0057.
- Hannon, G. J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
- Harder, A. & von Samson-Himmelstjerna, G. von (2001) Activity of the cyclic depsipeptide emodepside (BAY 44-4400) against larval and adult stages of nematodes in rodents and the influence on worm survival. *Parasitol.Res.*, **87**, 924-928.
- Harder, A. & Samson-Himmelstjerna, G. von (2002) Cyclooctadepsipeptides--a new class of anthelmintically active compounds. *Parasitol Res.*, **88**, 481-488.
- Harder, A., Schmitt-Wrede, H. P., Krucken, J., Marinovski, P., Wunderlich, F., Willson, J., Amliwala, K., Holden-Dye, L. & Walker, R. (2003) Cyclooctadepsipeptides--an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. *Int.J.Antimicrob.Agents*, **22**, 318-331.
- Hart, A. C. (2006) Behavior. *Wormbook*, 1-67.
- Hashmi, S., Tawe, W. & Lustigman, S. (2001) *Caenorhabditis elegans* and the study of gene function in parasites. *Trends Parasitol.*, **17**, 387-393.
- Higazi, T. B., Deoliveira, A., Katholi, C. R., Shu, L., Barchue, J., Lisanby, M. & Unnasch, T. R. (2005) Identification of elements essential for transcription in *Brugia malayi* promoters. *J.Mol.Biol.*, **353**, 1-13.
- Holden-Dye, L., O'Connor, V., Hopper, N. A., Walker, R. J., Harder, A., Bull, K. & Guest, M. (2007) SLO, SLO, quick, quick, slow: calcium-activated potassium channels as regulators of *Caenorhabditis elegans* behaviour and targets for anthelmintics. *Invert.Neurosci.*, **7**, 199-208.
- Hotez, P., Hawdon, J. & Schad, G. A. (1993) Hookworm larval infectivity, arrest and amphiparatenesis: the *Caenorhabditis elegans* Daf-c paradigm. *Parasitol.Today*, **9**, 23-26.
- Hotez, P. J., Bethony, J., Bottazzi, M. E., Brooker, S., Diemert, D. & Loukas, A. (2006) New technologies for the control of human hookworm infection. *Trends Parasitol.*, **22**, 327-331.

- Hu, M., Campbell, B. E., Pellegrino, M., Loukas, A., Beveridge, I., Ranganathan, S. & Gasser, R. B. (2007) Genomic characterization of Tv-ant-1, a *Caenorhabditis elegans tag-61* homologue from the parasitic nematode *Trichostrongylus vitrinus*. *Gene*, **397**, 12-25.
- Hu, M. & Gasser, R. B. (2006) Mitochondrial genomes of parasitic nematodes--progress and perspectives. *Trends Parasitol.*, **22**, 78-84.
- Hu, P. J. (2007) Dauer. *WormBook.*, 1-19.
- Hunt-Newbury, R., Viveiros, R., Johnsen, R., Mah, A., Anastas, D., Fang, L., Halfnight, E., Lee, D., Lin, J., Lorch, A., McKay, S., Okada, H. M., Pan, J., Schulz, A. K., Tu, D., Wong, K., Zhao, Z., Alexeyenko, A., Burglin, T., Sonnhammer, E., Schnabel, R., Jones, S. J., Marra, M. A., Baillie, D. L. & Moerman, D. G. (2007) High-throughput in vivo analysis of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS.Biol.*, **5**, e237.
- Hüsken, R. (2007): Identifikation, Expression und Antigencharakterisierung von Paramyosin des Hakenwurms *Ancylostoma caninum*. Dissertation, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.104-106.
- Issa, Z., Grant, W. N., Stasiuk, S. & Shoemaker, C. B. (2005) Development of methods for RNA interference in the sheep gastrointestinal parasite, *Trichostrongylus colubriformis*. *Int.J.Parasitol.*, **35**, 935-940.
- Jackson, R., Rhodes, A. P., Pomroy, W. E., Leathwick, D. M., West, D. M., Waghorn, T. S. & Moffat, J. R. (2006) Anthelmintic resistance and management of nematode parasites on beef cattle-rearing farms in the North Island of New Zealand. *N.Z.Vet.J.*, **54**, 289-296.
- Jasmer, D. P., Goverse, A. & Smant, G. (2003) Parasitic nematode interactions with mammals and plants. *Annu.Rev.Phytopathol.*, **41**, 245-270.
- Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B. T. & MacKinnon, R. (2001) Structure of the RCK domain from the E. coli K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron*, **29**, 593-601.
- Kall, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E. L. (2004) A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J.Mol.Biol.*, **338**, 1027-1036.
- Kaminsky, R. (2007): Delivering a new class of anthelmintics. The 21st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Proceedings of the 21st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. **21**, 225.
- Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Weber, S. S., Wenger, A., Wieland-Berghausen, S., Goebel, T., Gauvry, N., Pautrat, F., Skripky, T., Froelich, O., Komoin-Oka, C., Westlund, B., Sluder, A. & Maser, P. (2008) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, **452**, 176-180.
- Kaplan, R. M. (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.*, **20**, 477-481.

- Kennerdell, J. R. & Carthew, R. W. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, **95**, 1017-1026.
- Kerboeuf, D., Guegnard, F. & Le Vern, Y. (2002) Analysis and partial reversal of multidrug resistance to anthelmintics due to P-glycoprotein in *Haemonchus contortus* eggs using *Lens culinaris* lectin. *Parasitol.Res.*, **88**, 816-821.
- Kerboeuf, D., Guegnard, F. & Vern, Y. L. (2003) Detection of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance against anthelmintics in *Haemonchus contortus* using anti-human mdr1 monoclonal antibodies. *Parasitol.Res.*, **91**, 79-85.
- Kiontke, K., Gavin, N. P., Raynes, Y., Roehrig, C., Piano, F. & Fitch, D. H. (2004) *Caenorhabditis* phylogeny predicts convergence of hermaphroditism and extensive intron loss. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **101**, 9003-9008.
- Kobayashi, M. N. T. T. S. A. (1994): Synthesis and anthelmintic activity of the cyclodepsipeptide, PF1022A. *Annu.Rep.Sankyo Res.Lab.* **46**, 67-75.
- Krasnoperov, V. G., Bittner, M. A., Beavis, R., Kuang, Y., Salnikov, K. V., Chepurny, O. G., Little, A. R., Plotnikov, A. N., Wu, D., Holz, R. W. & Petrenko, A. G. (1997) Alpha-Latrotoxin Stimulates Exocytosis by the Interaction with a Neuronal G-Protein-Coupled Receptor. *Neuron*, **18**, 925-937.
- Krasnoperov, V. G., Shamotienko, O. G. & Grishin, E. V. (1990a) [A crustacean-specific neurotoxin from the venom of the black widow spider *Latrodectus mactans tredecimguttatus*]. *Bioorg.Khim.*, **16**, 1567-1569.
- Krasnoperov, V. G., Shamotienko, O. G. & Grishin, E. V. (1990b) [Isolation and properties of insect-specific neurotoxins from venoms of the spider *Lactodectus mactans tredecimguttatus*]. *Bioorg.Khim.*, **16**, 1138-1140.
- Krause, S., Sommer, A., Fischer, P., Brophy, P. M., Walter, R. D. & Liebau, E. (2001) Gene structure of the extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* and its overexpression and promoter analysis in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **117**, 145-154.
- Kumar, S., Chaudhary, K., Foster, J. M., Novelli, J. F., Zhang, Y., Wang, S., Spiro, D., Ghedin, E. & Carlow, C. K. (2007) Mining predicted essential genes of *Brugia malayi* for nematode drug targets. *PLoS.ONE.*, **2**, e1189.
- Kwa, M. S. G. (1994): The molecular basis of chemotherapeutic resistance in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. Dissertation, Universität Utrecht. 1-116.
- Kwa, M. S. G., Veenstra, J. G. & Roos, M. H. (1993) Molecular characterisation of β -tubulin genes present in benzimidazole-resistant populations of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **60**, 133-144.
- Kwa, M. S. G., Veenstra, J. G., van Dijk, M. & Roos, M. H. (1995) Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, **246**, 500-510.

- Lajus, S., Vacher, P., Huber, D., Dubois, M., Benassy, M. N., Ushkaryov, Y. & Lang, J. (2006) Alpha-latrotoxin induces exocytosis by inhibition of voltage-dependent K⁺ channels and by stimulation of L-type Ca²⁺ channels via latrophilin in beta-cells. *J.Biol.Chem.*, **281**, 5522-5531.
- Lelianova, V. G., Davletov, B. A., Sterling, A., Rahman, M. A., Grishin, E. V., Totty, N. F. & Ushkaryov, Y. A. (1997) Alpha-Latrotoxin Receptor, Latrophilin, Is a Novel Member of the Secretin Family of G Protein-coupled Receptors. *J.Biol.Chem.*, **272**, 21504-21508.
- Leroy, S., Duperray, C. & Morand, S. (2003) Flow cytometry for parasite nematode genome size measurement. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **128**, 91-93.
- Lindgren, K., Ljungvall, O., Nilsson, O., Ljungstrom, B. L., Lindahl, C. & Hoglund, J. (2008) *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. *Vet Parasitol.*, **151**, 337-343.
- Liu, J., Dent, J. A., Beech, R. N. & Prichard, R. K. (2004) Genomic organization of an avermectin receptor subunit from *Haemonchus contortus* and expression of its putative promoter region in *Caenorhabditis elegans*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **134**, 267-274.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lok, J. B. (2007) *Strongyloides stercoralis*: a model for translational research on parasitic nematode biology. *WormBook.*, 1-18.
- Loveridge, B., McArthur, M., McKenna, P. B. & Mariadass, B. (2003) Probable multigeneric resistance to macrocyclic lactone anthelmintics in cattle in New Zealand. *N.Z.Vet.J.*, **51**, 139-141.
- Magleby, K. L. (2003) Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J.Gen.Physiol*, **121**, 81-96.
- Mango, S. E. (2007) The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis. *Wormbook*, 1-26.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D. & Bryant, S. H. (2007) CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.*, **35**, D237-D240.
- Marchler-Bauer, A. & Bryant, S. H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.*, **32**, W327-W331.
- Marrion, N. V. & Tavalin, S. J. (1998) Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature*, **395**, 900-905.

- Mason, P. C. & McKay, C. H. (2006) Field studies investigating anthelmintic resistance in young cattle on five farms in New Zealand. *N.Z.Vet.J.*, **54**, 318-322.
- Matsushita, H., Lelianova, V. G. & Ushkaryov, Y. A. (1999) The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution. *FEBS Lett.*, **443**, 348-352.
- Mee, C. J., Tomlinson, S. R., Perestenko, P. V., De, P. D., Duce, I. R., Usherwood, P. N. & Bell, D. R. (2004) Latrophilin is required for toxicity of black widow spider venom in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem.J.*, **378**, 185-191.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M. & Toro, L. (1997) Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 14066-14071.
- Mehlhorn, H., Schmahl, G., Frese, M., Mevissen, I., Harder, A. & Krieger, K. (2005) Effects of a combinations of emodepside and praziquantel on parasites of reptiles and rodents. *Parasitol.Res.*, **97**, S65-S69.
- Mejia, M. E., Fernandez Igartua, B. M., Schmidt, E. E. & Cabaret, J. (2003) Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? *Vet Res.*, **34**, 461-467.
- Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. & Ambros, V. (1991) Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.*, **10**, 3959-3970.
- Miller, C. (2000) An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.*, **1**, REVIEWS0004.
- Miltsch, S. (2008): Identifikation von putativen Emodepsidrezeptoren in Askariden. Diplomarbeit, Universität Hannover, pp 99-100
- Nam, S., Jin, Y. H., Li, Q. L., Lee, K. Y., Jeong, G. B., Ito, Y., Lee, J. & Bae, S. C. (2002) Expression pattern, regulation, and biological role of runt domain transcription factor, run, in *Caenorhabditis elegans*. *Mol.Cell Biol.*, **22**, 547-554.
- Nari, A., Salles, J., Gil, A., Waller, P. J. & Hansen, J. W. (1996) The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Uruguay. *Vet.Parasitol.*, **62**, 213-222.
- Niedermaier, J. & Moritz, K. B. (2000) Organization and dynamics of satellite and telomere DNAs in *Ascaris*: implications for formation and programmed breakdown of compound chromosomes. *Chromosoma*, **109**, 439-452.
- Njue, A. I., Hayashi, J., Kinne, L., Feng, X. P. & Prichard, R. K. (2004) Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel alpha3 and beta subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *J Neurochem.*, **89**, 1137-1147.

- Nonet, M. L., Grundahl, K., Meyer, B. J. & Rand, J. B. (1993) Synaptic function is impaired but not eliminated in *C. elegans* mutants lacking synaptotagmin. *Cell*, **73**, 1291-1305.
- Norton, D. C. & Niblack, T. L. (1991) Biology and ecology of nematodes. In: *Manual of Agricultural Nematology*. ed.: Nickel, W. R., pp. 47-72.
- Oelgeschlager, M., Larrain, J., Geissert, D. & De Robertis, E. M. (2000) The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature*, **405**, 757-763.
- Okkema, P. G., Harrison, S. W., Plunger, V., Aryana, A. & Fire, A. (1993) Sequence requirements for myosin gene expression and regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **135**, 385-404.
- Okkema, P. G. & Krause, M. (2005) Transcriptional regulation. *Wormbook*, 1-40.
- Otsen, M., Hoekstra, R., Plas, M. E., Buntjer, J. B., Lenstra, J. A. & Roos, M. H. (2001) Amplified fragment length polymorphism analysis of genetic diversity of *Haemonchus contortus* during selection for drug resistance. *Int.J.Parasitol.*, **31**, 1138-1143.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45.
- Pillai, S., Kalinna, B. H., Liebau, E., Hartmann, S., Theuring, F. & Lucius, R. (2005) Studies on *Acanthocheilonema viteae* cystatin: genomic organization, promoter studies and expression in *Caenorhabditis elegans*. *Filaria.J.*, **4**, 9.
- Prachumwat, A., DeVincentis, L. & Palopoli, M. F. (2004) Intron size correlates positively with recombination rate in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **166**, 1585-1590.
- Pratt, D., Cox, G. N., Milhausen, M. J. & Boisvenue, R. J. (1990) A developmentally regulated cysteine protease gene family in *Haemonchus contortus*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **43**, 181-191.
- Prichard, R. K., Hall, C. A., Kelly, J. D., Martin, I. C. & Donald, A. D. (1980) The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust Vet J*, **56**, 239-251.
- Prociv, P. & Croese, J. (1996) Human enteric infection with *Ancylostoma caninum*: hookworms reappraised in the light of a "new" zoonosis. *Acta Trop.*, **62**, 23-44.
- Puissant, C., Bayat-Sarmadi, M., Devinoy, E. & Houdebine, L. M. (1994) Variation of transferrin mRNA concentration in the rabbit mammary gland during the pregnancy-lactation-weaning cycle and in cultured mammary cells. A comparison with the other major milk protein mRNAs. *Eur.J.Endocrinol.*, **130**, 522-529.

- Qin, L., Smant, G., Stokkermans, J., Bakker, J., Schots, A. & Helder, J. (1998) Cloning of a trans-spliced glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* and expression of its putative promoter region in *Caenorhabditis elegans*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **96**, 59-67.
- Ray, C. & McKerrow, J. H. (1992) Gut-specific and developmental expression of a *Caenorhabditis elegans* cysteine protease gene. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **51**, 239-249.
- Redmond, D. L., Clucas, C., Johnstone, I. L. & Knox, D. P. (2001) Expression of *Haemonchus contortus* pepsinogen in *Caenorhabditis elegans*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **112**, 125-131.
- Reinemeyer, C. R., Charles, S. D., Buch, J., Settje, T., Altreuther, G., Cruthers, L., McCall, J. W., Young, D. R. & Epe, C. (2005) Evaluation of the efficacy of emodepside plus praziquantel topical solution against ascarid infections (*Toxocara cati* or *Toxascaris leonina*) in cats. *Parasitol.Res.*, **97**, S41-S50.
- Riddle, D. L. & Albert, P. S. (1997) Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development. eds.: Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., & Priess, J. R., pp. 739-768.
- Rolland, V., Dugail, I., Le, L., X & Lavau, M. (1995) Evidence of increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthetase promoter activities in transiently transfected adipocytes from genetically obese rats. *J.Biol.Chem.*, **270**, 1102-1106.
- Roos, M. H., Boersema, J. H., Borgsteede, F. H. M., Cornelissen, J., Taylor, M. & Ruitenber, E. J. (1990) Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in the sheep parasite *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **43**, 77-88.
- Roy, S. W. & Gilbert, W. (2005) Resolution of a deep animal divergence by the pattern of intron conservation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **102**, 4403-4408.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol.Biol.*, **132**, 365-386.
- Saeger, B. (2000): Der heptahelikale Transmembran-Rezeptor HC110-R aus dem parasitischen Nematoden *Haemonchus contortus* als Target für das Breitspektrum-Anthelminthikum PF1022A. Dissertation, Universität Düsseldorf
- Saeger, B., Schmitt-Wrede, H. P., Dehnhardt, M., Benten, W. P., Krucken, J., Harder, A., Samson-Himmelstjerna, G. von, Wiegand, H. & Wunderlich, F. (2001) Latrophilin-like receptor from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* as target for the anthelmintic depsipeptide PF1022A. *FASEB J.*, **15**, 1332-1334.

- Samson-Himmelstjerna, G. von, Fritzen, B., Demeler, J., Schurmann, S., Rohn, K., Schnieder, T. & Epe, C. (2007) Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Vet Parasitol.*, **144**, 74-80.
- Samson-Himmelstjerna, G. von, Harder, A., Sangster, N. C. & Coles, G. C. (2005) Efficacy of two cyclooctadepsipeptides, PF1022A and emodepside, against anthelmintic-resistant nematodes in sheep and cattle. *Parasitology*, **130**, 343-347.
- Samson-Himmelstjerna, G. von, Harder, A., Schnieder, T., Kalbe, J. & Mencke, N. (2000) In vivo activities of the new anthelmintic depsipeptide PF 1022A. *Parasitol Res*, **86**, 194-199.
- Sargison, N. D., Jackson, F., Bartley, D. J. & Moir, A. C. (2005) Failure of moxidectin to control benzimidazole-, levamisole- and ivermectin-resistant *Teladorsagia circumcincta* in a sheep flock. *Vet Rec.*, **156**, 105-109.
- Sargison, N. D., Jackson, F., Bartley, D. J., Wilson, D. J., Stenhouse, L. J. & Penny, C. D. (2007) Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Vet Parasitol.*, **145**, 65-76.
- Sargison, N. D., Jackson, F. und Scott, P. R. (2001): Multiple anthelmintic resistance in sheep. *Vet Rec.*, **149**, 748-749.
- Sasaki, T., Takagi, M., Yaguchi, T., Miyadoh, S., Okada, T. & Koyama, M. (1992) A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *J.Antibiot.(Tokyo)*, **45**, 692-697.
- Schafer, W. R. (2005) Egg-laying. *WormBook.*, 1-7.
- Schmittgen, T. D. (2001) Real-time quantitative PCR. *Methods*, **25**, 383-385.
- Schnieder, T. (2006) Helminthosen der Wiederkäuer. In: *Veterinärmedizinische Parasitologie*. ed.: Schnieder, T., pp. 166-234.
- Schougaard, H. & Nielsen, M. K. (2007) Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark. *Vet Rec*, **160**, 439-440.
- Schreiber, M. & Salkoff, L. (1997) A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys.J.*, **73**, 1355-1363.
- Schürmann, S., Harder, A., Schnieder, T. und von Samson-Himmelstjerna, G. von (2007): Effects of emodepside on egg-hatching, larval development and larval motility in parasitic nematodes. *Parasitol Res*. **101**, S45-S56.
- Shoop, W. L., Eary, C. H., Michael, B. F., Haines, H. W. & Seward, R. L. (1991) Anthelmintic activity of paraherquamide in dogs. *Vet.Parasitol.*, **40**, 339-341.
- Shoop, W. L., Egerton, J. R., Eary, C. H. & Suhayda, D. (1990) Anthelmintic activity of paraherquamide in sheep. *J.Parasitol.*, **76**, 349-351.

- Shoop, W. L., Michael, B. F., Haines, H. W. & Eary, C. H. (1992) Anthelmintic activity of paraherquamide in calves. *Vet.Parasitol.*, **43**, 259-263.
- Soutello, R. G., Seno, M. C. & Amarante, A. F. (2007) Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern Sao Paulo State, Brazil. *Vet.Parasitol.*, **148**, 360-364.
- Spieth, J. & Lawson, D. (2006) Overview of gene structure. *WormBook.*, 1-10.
- Stear, M. J., Doligalska, M. & Donskow-Schmelter, K. (2007) Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology*, **134**, 139-151.
- Stoneham, S. & Coles, G. (2006) Ivermectin resistance in *Parascaris equorum*. *Vet Rec*, **158**, 572.
- Stryer, L. (1995) Signalübertragungsprozesse. In: *Biochemie*. ed.: Stryer, L.pp. 343-380.
- Suarez, V. H. & Cristel, S. L. (2007) Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina. *Vet.Parasitol.*, **144**, 111-117.
- Tagaki, M., Sasaki, T., Yaguchi, T., Kodama, Y., Okada, T., Miyadoh, S. & Koyama, M. (1991) On a new cyclic depsipeptide, PF1022A, with anthelmintic effects. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **65**, 326.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol.Biol.Evol.*, **24**, 1596-1599.
- Tawe, W., Walter, R. D. & Henkle-Duhrsen, K. (2000) *Onchocerca volvulus* superoxide dismutase genes: identification of functional promoters for pre-mRNA transcripts which undergo trans-splicing. *Exp.Parasitol.*, **94**, 172-179.
- Thompson, D. P., Davis, J. P., Larsen, M. J., Coscarelli, E. M., Zinser, E. W., Bowman, J. W., Alexander-Bowman, S. J., Marks, N. J. & Geary, T. G. (2003) Effects of KHEYLRFamide and KNEFIRFamide on cyclic adenosine monophosphate levels in *Ascaris suum* somatic muscle. *Int.J.Parasitol.*, **33**, 199-208.
- Tissenbaum, H. A., Hawdon, J., Perregaux, M., Hotez, P., Guarente, L. & Ruvkun, G. (2000) A common muscarinic pathway for diapause recovery in the distantly related nematode species *Caenorhabditis elegans* and *Ancylostoma caninum*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **97**, 460-465.
- Traversa, D., Paoletti, B., Otranto, D. & Miller, J. (2007) First report of multiple drug resistance in trichostrongyles affecting sheep under field conditions in Italy. *Parasitol.Res.*, **101**, 1713-1716.
- Trivedi, S. & Arasu, P. (2005) Evaluation of endogenous reference genes for real-time PCR quantification of gene expression in *Ancylostoma caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **143**, 241-244.

- Ullu, E., Tschudi, C. & Chakraborty, T. (2004) RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol.*, **6**, 509-519.
- Ungemach, F. R. (1999) Anthelminthika. In. *Pharmakotherapie bei Nutz - und Haustieren*. ed.: Löscher, W., pp. 247-277.
- van Wyk, J. A. & Malan, F. S. (1988) Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Vet Rec*, **123**, 226-228.
- van Wyk, J. A., Stenson, M. O., Van der Merwe, J. S., Vorster, R. J. & Viljoen, P. G. (1999) Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort J.Vet.Res.*, **66**, 273-284.
- Vattaa, A. F. & Lindberg, A. L. (2006) Managing anthelmintic resistance in small ruminant livestock of resource-poor farmers in South Africa. *J.S.Afr.Vet.Assoc.*, **77**, 2-8.
- Viney, M. E. (2006) The biology and genomics of *Strongyloides*. *Med.Microbiol.Immunol.*, **195**, 49-54.
- Wadsworth, W. G. & Hedgecock, E. M. (1996) Hierarchical guidance cues in the developing nervous system of *C. elegans*. *Bioessays*, **18**, 355-362.
- Waghorn, T. S., Leathwick, D. M., Rhodes, A. P., Jackson, R., Pomroy, W. E., West, D. M. & Moffat, J. R. (2006) Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand. *N.Z.Vet.J.*, **54**, 278-282.
- Währing, J. (2002): Molekulare Untersuchungen zum heptahelikalen Transmembrantransporter Hc110-R von *Haemonchus contortus* und Orthologer in verschiedenen parasitischen Nematoden. Diplomarbeit, Universität Hannover, pp 42-46.
- Walthall, W. W., Li, L., Plunkett, J. A. & Hsu, C. Y. (1993) Changing synaptic specificities in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*: differentiation of the DD motoneurons. *J.Neurobiol.*, **24**, 1589-1599.
- Wang, Z. W., Saifee, O., Nonet, M. L. & Salkoff, L. (2001) SLO-1 potassium channels control quantal content of neurotransmitter release at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Neuron*, **32**, 867-881.
- Wei, A., Jegla, T. & Salkoff, L. (1996) Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology*, **35**, 805-829.
- Welz, C., Harder, A., Schnieder, T., Hoglund, J. & Samson-Himmelstjerna, G. (2005) Putative G protein-coupled receptors in parasitic nematodes-potential targets for the new anthelmintic class cyclooctadepsipeptides? *Parasitol.Res.*, **97**, S22-S32.
- Westheide, W. (1996) Nematoda. In *Spezielle Zoologie, Teil 1: Einzeller und wirbellose Tiere*. ed.: Westheide, W.; Rieger, R., pp. 692-709.

- Willson, J., Amliwala, K., Davis, A., Cook, A., Cuttle, M. F., Kriek, N., Hopper, N. A., O'Connor, V., Harder, A., Walker, R. J. & Holden-Dye, L. (2004) Latrotoxin receptor signaling engages the UNC-13-dependent vesicle-priming pathway in *C. elegans*. *Curr.Biol.*, **14**, 1374-1379.
- Willson, J., Amliwala, K., Harder, A., Holden-Dye, L. & Walker, R. J. (2003a) The effect of the anthelmintic emodepside at the neuromuscular junction of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Parasitology*, **126**, 79-86.
- Willson, J., Amliwala, K., Harder, A., Holden-Dye, L. & Walker, R. J. (2003b) The effect of the anthelmintic emodepside at the neuromuscular junction of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Parasitology*, **126**, 79-86.
- Wong, M. L. & Medrano, J. F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, **39**, 75-85.
- Wylie, T., Martin, J. C., Dante, M., Mitreva, M. D., Clifton, S. W., Chinwalla, A., Waterston, R. H., Wilson, R. K. & McCarter, J. P. (2004) Nematode.net: a tool for navigating sequences from parasitic and free-living nematodes. *Nucleic Acids Res.*, **32**, D423-D426.
- Xu, M., Molento, M., Blackhall, W., Ribeiro, P., Beech, R. & Prichard, R. (1998) Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **91**, 327-335.
- Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F. & Stewart, C. N., Jr. (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC.Bioinformatics.*, **7**, 85.
- Zahner, H., Taubert, A., Harder, A. & Samson-Himmelstjerna, G. von (2001) Filaricidal efficacy of anthelmintically active cyclodepsipeptides. *Int.J.Parasitol.*, **31**, 1515-1522.
- Zinser, E. W., Wolf, M. L., Alexander-Bowman, S. J., Thomas, E. M., Davis, J. P., Groppi, V. E., Lee, B. H., Thompson, D. P. & Geary, T. G. (2002) Anthelmintic paraherquamides are cholinergic antagonists in gastrointestinal nematodes and mammals. *J.Vet.Pharmacol.Ther.*, **25**, 241-250.

7 Anhang

7.1 Voraussage von Transmembranregionen und Signalpeptiden mittels der Programme ConPred II, Phobius, HMMTOP, TMHMM, TMMOD

Programm	Position des NH ₂ - und COOH-Terminus	Signalpeptide, weitere signifikante Regionen	Anzahl Transmembranhelices	Position der Transmembranhelices
ConPred II	NT: extra CT: intra	SP: 1 – 24	7	536 – 556 567 – 587 594 – 614 634 – 654 675 – 695 722 – 742 753 – 773
Phobius	NT: extra CT: intra	SP: 1 – 17 N: 1 – 3 H: 4 – 12 C: 13 – 17	7	533 – 557 569 – 588 594 – 614 634 – 654 674 – 700 721 – 743 749 – 773
HMMTOP	NT: extra CT: intra		7	533 – 557 570 – 586 595 – 614 635 – 654 675 – 699 724 – 743 750 – 774
TMHMM	NT: extra CT: intra		7	535 – 557 564 – 586 596 – 614 634 – 653 673 – 695 721 – 743 749 – 771
TMMOD	NT: extra CT: intra		7	533 – 557 565 – 585 594 – 614 634 – 654 673 – 700 720 – 743 749 – 773

Tab.7: Darstellung der vorausgesagten Transmembranhelices des Depsiphilins von *A. caninum* (999 AS). NT: NH₂Terminus, CT: COOH-Terminus (extrazellulär, intrazellulär), SP: Signalpeptid, N: positiv geladene N-Region, H: hydrophobische Region, C: polare und ungeladene Region zwischen H-Region und Spaltungsstelle.

Programm	Position des NH ₂ - und COOH-Terminus	Signalpeptide, weitere signifikante Regionen	Anzahl Transmembranhelices	Position der Transmembranhelices
ConPred II	NT: intra CT: extra	-	7	47 – 67 136 – 156 179 – 199 204 – 224 262 – 282 301 – 321 327 – 347
Phobius	NT: intra CT: extra	-	7	45 – 69 138 – 158 179 – 197 203 – 227 262 – 283 299 – 318 325 – 346
HMMTOP	NT: extra CT: extra	-	8	47 – 64 138 – 156 181 – 199 208 – 226 241 – 258 265 – 283 304 – 322 329 – 346
TMHMM	NT: intra CT: extra	-	7	47 – 69 138 – 160 181 – 198 208 – 230 262 – 284 299 – 318 325 – 347
TMMOD	NT: extra CT: extra	-	6	45 – 69 138 – 158 178 – 198 262 – 282 299 – 317 329 – 349

Tab. 8: Darstellung der vorausgesagten Transmembranhelices des SLO-1 von *A. caninum* (999 AS). NT: NH₂-Terminus, CT: COOH-Terminus, extrazellulär, intrazellulär.

7.2 Daten der Untersuchung der Transkriptionsraten des Depsiphilins von *A. caninum* mittels quantitativer *real-time* PCR

Depsiphilin Probe	Kopien			Ct -Werte		
	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	20,24	0,06	0,29
Standard 2	1.00E+06	-	-	22,96	0,04	0,17
Standard 3	1.00E+05	-	-	29,24	1,30	4,44
Standard 4	1.00E+04	-	-	31,79	0,47	1,48
Standard 5	1.00E+03	-	-	36,54	0,20	0,55
Standard 6	1.00E+02	-	-	38,89	0,30	0,77
Standard 7	1.00E+01	-	-	Kein Ct	Kein Ct	-
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac Männchen I	1,988E+005	3,837E+003	1,85	26,83	0,03	0,11
Ac Männchen II	3,041E+005	8,908E+004	29,3	26,53	0,49	1,85
Ac Männchen III	2,639E+005	3,708E+003	1,41	26,54	0,02	0,08

Tab.9: Daten der *real-time* PCR mit dem Zielgen Depsiphilin auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* Männchen

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

60S Probe	Kopien			Ct -Werte		
	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	26,24	0,07	0,26
Standard 2	1.00E+06	-	-	25,97	0,00	0,00
Standard 3	1.00E+05	-	-	29,19	1,11	3,80
Standard 4	1.00E+04	-	-	33,74	0,60	1,78
Standard 5	1.00E+03	-	-	38,60	1,92	4,97
Standard 6	1.00E+02	-	-	Kein Ct	Kein Ct	-
Standard 7	1.00E+01	-	-	Kein Ct	Kein Ct	-
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac Männchen I	1,271E+008	2,448E+007	19,26	19,84	0,04	0,2
Ac Männchen II	3,008E+008	3,255E+007	10,82	18,55	0,02	0,11
Ac Männchen III	9,736E+007	5,891E+007	60,51	20,24	0,14	0,69

Tab.10: Daten der *real-time* PCR mit dem Referenzgen 60S arp auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* Männchen

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

18 S	Kopien			Ct -Werte		
Probe	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	17,76	0,23	1,30
Standard 2	1.00E+06	-	-	25,49	1,47	5,77
Standard 3	1.00E+05	-	-	25,81	0,26	1,01
Standard 4	1.00E+04	-	-	29,11	0,02	0,07
Standard 5	1.00E+03	-	-	31,47	0,25	0,79
Standard 6	1.00E+02	-	-	31,78	0,01	0,03
Standard 7	1.00E+01	-	-	31,76	0,10	0,31
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac Männchen I	1,044E+008	5,576E+006	5,34	18,95	0,04	0,21
Ac Männchen II	1,031E+008	1,866E+007	18,1	18,96	0,15	0,79
Ac Männchen III	4,747E+007	9,583E+006	20,19	19,69	0,17	0,86

Tab.11: Daten der *real-time* PCR mit dem Referenzgen 18S rRNA auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* Männchen

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

Depsiphilin	Kopien			Ct -Werte		
Probe	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	17,41	1,00	5,74
Standard 2	1.00E+06	-	-	20,55	0,98	4,77
Standard 3	1.00E+05	-	-	26,93	0,52	1,93
Standard 4	1.00E+04	-	-	29,10	1,48	5,09
Standard 5	1.00E+03	-	-	33,80	0,22	0,65
Standard 6	1.00E+02	-	-	37,94	1,60	4,22
Standard 7	1.00E+01	-	-	Kein Ct	0,03	-
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac Weibchen I	6,967E+005	3,819E+005	54,82	22,08	0,83	3,76
Ac Weibchen II	3,921E+005	1,769E+005	45,12	23,11	0,76	3,29
Ac Weibchen III	3,723E+005	1,251E+005	33,60	23,20	0,59	2,54

Tab.12: Daten der *real-time* PCR mit dem Zielgen Depsiphilin auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* Weibchen

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

60S	Kopien			Ct -Werte		
Sample	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	26,16	0,07	0,26
Standard 2	1.00E+06	-	-	28,34	0,06	0,21
Standard 3	1.00E+05	-	-	31,29	1,38	4,41
Standard 4	1.00E+04	-	-	35,01	0,6	1,71
Standard 5	1.00E+03	-	-	Kein Ct	0,09	-
Standard 6	1.00E+02	-	-	Kein Ct	0,03	-
Standard 7	1.00E+01	-	-	Kein Ct	Kein Ct	-
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac Weibchen I	4,00E+009	2,00E+008	5,00	18,10	0,08	0,44
Ac Weibchen II	4,604E+009	7,828E+008	17,00	17,92	0,28	1,56
Ac Weibchen III	4,027E+009	6,885E+008	17,10	18,09	0,28	1,55

Tab.13: Daten der *real-time* PCR mit dem Referenzgen 60S arp auf Grundlage von cDNA

der *A. caninum* Weibchen

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

18S	Kopien			Ct -Werte		
Probe	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	17,94	0,08	0,45
Standard 2	1.00E+06	-	-	26,67	0,00	0
Standard 3	1.00E+05	-	-	25,88	0,31	1,19
Standard 4	1.00E+04	-	-	29,34	0,37	1,26
Standard 5	1.00E+03	-	-	31,46	0,28	0,89
Standard 6	1.00E+02	-	-	31,56	0,31	0,98
Standard 7	1.00E+01	-	-	31,67	0,21	0,66
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac Weibchen I	3,953E+008	2,099E+007	5,31	18,51	0,05	0,27
Ac Weibchen II	3,999E+007	6,029E+006	15,08	20,52	0,13	0,63
Ac Weibchen III	1,141E+008	8,109E+005	0,71	19,60	0,01	0,05

Tab.14: Daten der *real-time* PCR mit dem Referenzgen 18 rRNA auf Grundlage von cDNA

der *A. caninum* Weibchen

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

Depsiphilin Probe	Kopien			Ct -Werte		
	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	17,53	0,24	1,37
Standard 2	1.00E+06	-	-	20,83	0,25	1,20
Standard 3	1.00E+05	-	-	25,48	0,26	1,02
Standard 4	1.00E+04	-	-	29,21	0,23	0,79
Standard 5	1.00E+03	-	-	32,87	0,25	0,76
Standard 6	1.00E+02	-	-	36,07	0,04	0,11
Standard 7	1.00E+01	-	-	39,90	1,43	3,58
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac Eier I	7,832E+005	5,632E+005	71,91	21,74	1,03	4,74
Ac Eier II	1,203E+006	6,003E+005	49,90	21,04	0,74	3,52
Ac Eier III	1,459E+006	5,008E+004	3,43	20,72	0,05	0,24

Tab.15: Daten der *real-time* PCR mit dem Zielgen Depsiphilin auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* Eier

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

60S Probe	Kopien			Ct -Werte		
	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	24,63	0,01	0,04
Standard 2	1.00E+06	-	-	27,27	0,47	1,72
Standard 3	1.00E+05	-	-	30,10	0,93	3,09
Standard 4	1.00E+04	-	-	34,1	1,23	3,61
Standard 5	1.00E+03	-	-	Kein Ct	0,92	-
Standard 6	1.00E+02	-	-	39,02	1,23	3,15
Standard 7	1.00E+01	-	-	Kein Ct	Kein Ct	-
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac Eier I	1,444E+010	1,484E+009	10,28	15,09	0,17	1,13
Ac Eier II	1,285E+010	6,564E+009	51,08	15,24	0,89	5,84
Ac Eier III	1,861E+010	1,928E+007	1,04	14,77	0,00	0

Tab.16: Daten der *real-time* PCR mit dem Referenzgen 60S arp auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* Eier

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

18S Probe	Kopien			Ct -Werte		
	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	18,97	0,26	1,37
Standard 2	1.00E+06	-	-	27,10	0,76	2,80
Standard 3	1.00E+05	-	-	26,97	0,39	1,45
Standard 4	1.00E+04	-	-	30,94	0,09	0,29
Standard 5	1.00E+03	-	-	33,53	0,07	0,21
Standard 6	1.00E+02	-	-	34,58	0,27	0,78
Standard 7	1.00E+01	-	-	34,76	0,08	0,23
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac Eier I	1,041E+008	3,643E+007	34,99	19,67	0,36	1,83
Ac Eier II	1,359E+007	1,777E+006	13,08	21,84	0,14	4,93
Ac Eier III	9,191E+008	7,790E+006	0,85	19,80	0,09	0,45

Tab.17: Daten der *real-time* PCR mit dem Referenzgen 18 rRNA auf Grundlage von cDNA

der *A. caninum* Eier

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

Depsiphilin Probe	Kopien			Ct -Werte		
	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	15,88	0,20	1,26
Standard 2	1.00E+06	-	-	18,99	0,26	1,37
Standard 3	1.00E+05	-	-	25,99	1,49	5,73
Standard 4	1.00E+04	-	-	27,81	0,36	1,29
Standard 5	1.00E+03	-	-	32,00	0,59	1,84
Standard 6	1.00E+02	-	-	35,33	0,75	2,12
Standard 7	1.00E+01	-	-	38,89	0,98	2,52
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac L1/L2 I	2,623E+005	2,026E+004	7,72	22,32	0,15	0,67
Ac L1/L2 II	5,486E+005	1,102E+005	20,09	21,09	0,32	1,52
Ac L1/L2 III	6,740E+005	1,115E+005	16,54	20,77	0,27	1,30

Tab.18: Daten der *real-time* PCR mit dem Zielgen Depsiphilin auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* L1/L2

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

60S	Kopien			Ct -Werte		
Probe	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	23,42	0,95	4,06
Standard 2	1.00E+06	-	-	25,94	0,40	1,54
Standard 3	1.00E+05	-	-	28,10	0,29	1,03
Standard 4	1.00E+04	-	-	33,90	0,17	0,50
Standard 5	1.00E+03	-	-	36,02	0,41	1,14
Standard 6	1.00E+02	-	-	Kein Ct	0,24	-
Standard 7	1.00E+01	-	-	Kein Ct	Kein Ct	-
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac L1/L2 I	2,010E+009	2,425E+008	12,06	15,28	0,18	1,18
Ac L1/L2 II	3,800E+009	6,431E+008	16,92	14,51	0,24	1,65
Ac L1/L2 III	3,944E+009	8,782E+008	22,27	14,38	0,37	2,57

Tab.19: Daten der *real-time* PCR mit dem Referenzgen 60S arp auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* L1/L2

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

18S	Kopien			Ct -Werte		
Probe	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	15,93	2,85	17,89
Standard 2	1.00E+06	-	-	20,77	2,68	12,90
Standard 3	1.00E+05	-	-	21,97	0,04	0,18
Standard 4	1.00E+04	-	-	26,12	0,03	0,11
Standard 5	1.00E+03	-	-	28,44	0,22	0,77
Standard 6	1.00E+02	-	-	28,86	0,62	2,15
Standard 7	1.00E+01	-	-	29,25	0,08	0,27
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac L1/L2 I	3,526E+008	3,947E+008	111,94	14,31	0,28	1,96
Ac L1/L2 II	1,207E+008	1,979E+008	163,96	15,35	0,44	2,87
Ac L1/L2 III	6,275E+007	7,830E+007	124,78	15,99	0,37	2,31

Tab.20: Daten der *real-time* PCR mit dem Referenzgen 18 rRNA auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* L1/L2

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

Depsiphilin Probe	Kopien			Ct -Werte		
	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	16,41	1,25	7,62
Standard 2	1.00E+06	-	-	19,35	1,66	8,58
Standard 3	1.00E+05	-	-	25,97	0,39	1,50
Standard 4	1.00E+04	-	-	29,46	0,02	0,07
Standard 5	1.00E+03	-	-	34,60	0,32	0,92
Standard 6	1.00E+02	-	-	35,58	0,73	2,05
Standard 7	1.00E+01	-	-	Kein Ct	Kein Ct	-
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac L3 I	9,364E+004	1,101E+004	11,76	24,94	0,39	1,56
Ac L3 II	1,162E+005	1,720E+004	14,80	24,55	0,29	1,18
Ac L3 III	1,050E+005	4,432E+002	0,42	24,74	0,01	0,04

Tab.21: Daten der *real-time* PCR mit dem Zielgen Depsiphilin auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* L3

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

60S Probe	Kopien			Ct -Werte		
	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	24,20	0,85	3,51
Standard 2	1.00E+06	-	-	26,68	0,57	2,14
Standard 3	1.00E+05	-	-	29,85	1,47	4,92
Standard 4	1.00E+04	-	-	33,36	1,40	4,20
Standard 5	1.00E+03	-	-	36,28	1,46	4,02
Standard 6	1.00E+02	-	-	Kein Ct	Kein Ct	-
Standard 7	1.00E+01	-	-	Kein Ct	Kein Ct	-
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac L3 I	2,364E+009	8,676E+009	367,00	16,58	0,84	5,07
Ac L3 II	3,130E+009	1,699E+010	542,81	16,21	1,17	7,22
Ac L3 III	2,763E+009	2,396E+009	86,71	16,38	0,21	1,28

Tab.22: Daten der *real-time* PCR mit dem Referenzgen 60S arp auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* L3

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

18 S	Kopien			Ct -Werte		
Probe	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Standard 1	1.00E+07	-	-	17,85	0,17	0,95
Standard 2	1.00E+06	-	-	26,21	0,75	2,86
Standard 3	1.00E+05	-	-	25,89	0,23	0,89
Standard 4	1.00E+04	-	-	29,49	0,30	1,02
Standard 5	1.00E+03	-	-	31,71	0,12	0,38
Standard 6	1.00E+02	-	-	32,51	0,06	0,18
Standard 7	1.00E+01	-	-	32,75	0,32	0,98
NTC	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	Kein Ct	-
Ac L3 I	4,054E+008	1,348E+006	0,33	17,67	0,00	0
Ac L3 II	5,649E+008	7,006E+007	12,40	17,35	0,12	0,69
Ac L3 III	4,311E+008	4,539E+007	10,52	17,61	0,10	0,57

Tab.23: Daten der *real-time* PCR mit dem Referenzgen 18 rRNA auf Grundlage von cDNA der *A. caninum* L3

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

7.2.1 C_T-Werte aus der Verdünnungsreihe von cDNA der Männchen für das Depsiphilin, 18S rRNA und 60S arp

Männchen	Verdünnung	ΔCt	MW ΔCt	SD ΔCt	CV ΔCt
Depsiphilin / 18S rRNA	1:2	10,85	10,85	0,10	0,92
	1:5	10,84			
	1:10	11,01			
	1:20	10,79			
	1:50	10,75			
Depsiphilin / 60S	1:2	7,39	7,42	0,13	1,75
	1:5	7,52			
	1:10	7,25			
	1:20	7,57			
	1:50	7,38			

Tab.24: ΔCt Werte, Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Variationskoeffizienten (CV) von Proben einer Verdünnungsreihe von cDNA von *A. caninum* Männchen.

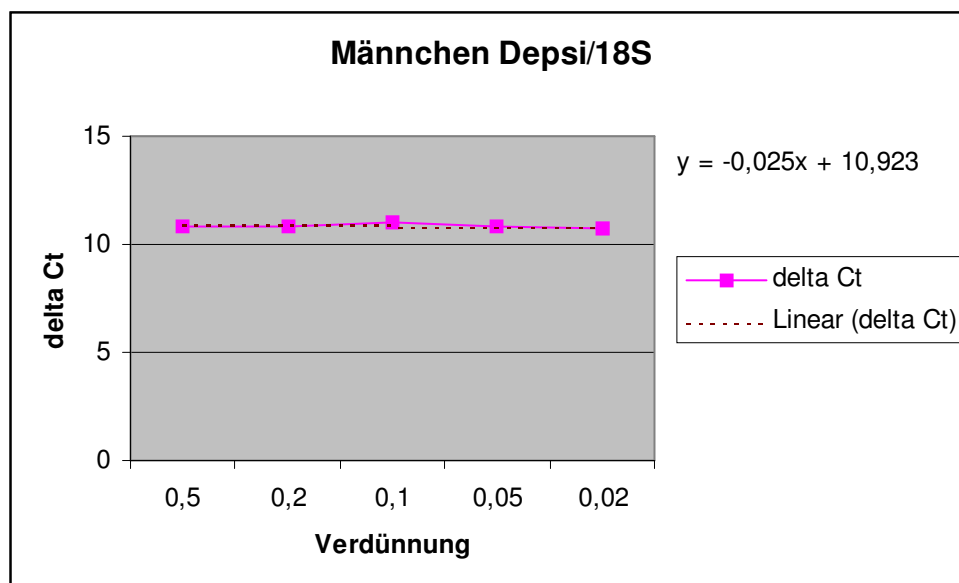


Abb. 49: ΔCt Werte von Proben einer Verdünnungsreihe von cDNA von *A. caninum* Männchen. (ΔCt Depsi/18S rRNA = Ct Depsiphilin – Ct 18S). Linear (delta Ct) stellt die Trendlinie dar, $y = -0,025x + 10,923$ bezeichnet die Steigung der Kurve, sowie den Schnittpunkt mit der Y-Achse.

Probe	2 ^{-ΔΔC_T} Methode			Verhältnis der relativen Kopienzahlen			Relative Kopienzahlen		
	Depsiphilin/ 18S	Depsiphilin/ 60S	18S/60S	Depsiphilin/ 18S	Depsiphilin/ 60S	18S/60S	18S	60S	Depsiphilin
Männchen	100,00 %	100,00%	100,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %
Weibchen	179,01 %	28,72 %	636,43 %	174,77 %	63,90 %	57,22 %	186,78 %	326,42 %	208,58 %
Eier	701,28 %	90,13 %	778,12 %	1719,15 %	41,44 %	5,82 %	68,06 %	1169,99 %	484,80 %
L1/L2	249,67 %	35,85 %	696,44 %	38,71 %	82,19 %	258,30 %	647,70 %	250,76 %	206,10 %
L3	7,18 %	6,61 %	108,67 %	328,69 %	2,66 %	30,42 %	472,02 %	1551,48 %	41,28 %

Tab. 25: Relative Mengen der Gentranskripte des Depsiphilins verschiedener Entwicklungsstadien von *A. caninum* im Vergleich zu den Transkripten des Depsiphilins der Männchen.

	Depsiphilin	60S arp	18S rRNA
Männchen	80,3 %	138,2 %	194,2 %
Weibchen	77,1 %	112,2 %	213,0 %
Eier	88,4 %	11,9 %	155,1 %
L1/L2	81,4 %	98,2 %	208,7 %
L3	76,0 %	139,1 %	178,0 %
Mittelwert	80,64 %	119,92 %	189,78 %

Tab. 26: Werte für die Effizienzen der Standardreihen mit Kopien von 10^7 - 10^1 Kopien/ μ l cDNA. Die cDNA wurde aus 1 μ g total RNA synthetisiert. Für jedes Entwicklungsstadium von *A. caninum* wurde ein separates real-time PCR-Experiment durchgeführt und jeweils erneut eine Standardreihe mitgeführt.

7.3 Rohdaten der *body bends*/min

Im Folgenden sind die Daten aus den Bewegungsassays der transgenen *C. elegans* Würmer nach Emodepsidexposition aufgeführt (Tabellen 27-66). Die Legende ist im Folgenden für alle Tabellen zusammengefasst (Beispiel *Ac slo-1 snb-1*, 10 μ M Emodepsid):

Ac slo-1 snb-1: transgene *C. elegans js379* mit Expression von *A. caninum slo-1* unter dem *snb-1*-Promotor

Co slo-1 snb-1: transgene *C. elegans js379* mit Expression von *C. oncophora slo-1* unter dem *snb-1*-Promotor (jeweils Linie I und II)

Ac slo-1 Ce slo-1 prom: transgene *C. elegans js379* mit Expression von *A. caninum slo-1* unter dem 3 kb *C. elegans slo-1*-Promotor

Co slo-1 Ce slo-1 prom: transgene *C. elegans js379* mit Expression von *C. oncophora slo-1* unter dem 3 kb *C. elegans slo-1*-Promotor (jeweils Linie I und II)

Ce slo-1 Ce slo-1 prom: transgene *C. elegans js379* mit Expression von *C. elegans slo-1* unter dem 3 kb *C. elegans slo-1*-Promotor (jeweils Linie I und II)

js 379 EtOH: Emodepsid-resistente *C. elegans slo-1*-Mutante *js 379* inkubiert auf einer NGM-Agar-Platte mit EtOH als Trägerstoff

js 379 10 µM Emodepsid: Emodepsid-resistente *C. elegans slo-1*-Mutante *js 379* inkubiert auf einer NGM-Agar-Platte mit 10 µM Emodepsid

N2 EtOH: *C. elegans* Wildtyp Bristol N2 inkubiert auf einer NGM-Agar-Platte mit EtOH als Trägerstoff

N2 10 µM Emodepsid: *C. elegans* Wildtyp Bristol N2 inkubiert auf einer NGM-Agar-Platte mit 10 µM Emodepsid

Ac *slo-1 snb-1* EtOH: transgene *C. elegans js379* mit Expression von *A. caninum slo-1* unter dem *snb-1*-Promotor inkubiert auf einer NGM-Agar-Platte mit EtOH als Trägerstoff

Ac *slo-1 snb-1* 10 µM Emodepsid: transgene *C. elegans js379* mit Expression von *A. caninum slo-1* unter dem *snb-1*-Promotor inkubiert auf einer NGM-Agar-Platte mit 10 µM Emodepsid

MW: Mittelwert

SD: Standardabweichung

CV: Variationskoeffizient

Je nach Versuch variieren die verwendeten *C. elegans*-Linien und die Emodepsidkonzentrationen.

<i>Ac slo-1 snb-1</i>	<i>js 379</i> EtOH	<i>js 379</i> 10 μ M Emodepsid	N2 EtOH	N2 10 μ M Emodepsid	<i>Ac slo-1 snb-1</i> EtOH	<i>Ac slo-1 snb-1</i> 10 μ M Emodepsid
<i>body bends/min.</i>	24	23	25	2	23	11
	26	24	26	0	24	8
	23	25	25	0	22	15
	27	25	27	0	26	13
	28	27	28	0	27	16
	30	23	28	0	30	17
	31	28	30	0	31	13
	26	30	30	0	27	12
	24	31	27	0	26	12
	30	27	26	0	30	9
MW	26,9	26,3	27,2	0,2	26,6	12,6
SD	2,81	2,79	1,81	0,63	3,06	2,88
CV	10,43	10,61	6,67	316,23	11,51	22,82

Tab. 27

<i>Ac slo-1 snb-1</i>	<i>js 379</i> EtOH	<i>js 379</i> 1 μ M Emodepsid	N2 EtOH	N2 1 μ M Emodepsid	<i>Ac slo-1 snb-1</i> EtOH	<i>Ac slo-1 snb-1</i> 1 μ M Emodepsid
<i>body bends/min.</i>	24	25	25	7	23	16
	26	27	26	5	24	14
	23	26	25	3	22	16
	27	22	27	7	26	17
	28	27	28	8	27	13
	30	28	28	10	30	18
	31	30	30	8	31	20
	26	32	30	4	27	16
	24	27	27	6	26	14
	30	28	26	8	30	15
MW	26,9	27,2	27,2	6,6	26,6	15,9
SD	2,81	2,70	1,81	2,12	3,06	2,08
CV	10,43	9,93	6,67	32,10	11,51	13,08

Tab. 28

<i>Ac slo-1 snb-1</i>	<i>js 379</i> EtOH	<i>js 379</i> 100 nM Emodepsid	N2 EtOH	N2 100 nM Emodepsid	<i>Ac slo-1 snb-1</i> EtOH	<i>Ac slo-1 snb-1</i> 100nM Emodepsid
<i>body bends/min.</i>	24	26	25	13	23	23
	26	24	26	12	24	20
	23	24	25	16	22	19
	27	27	27	17	26	20
	28	28	28	10	27	17
	30	30	28	17	30	21
	31	32	30	16	31	24
	26	28	30	13	27	25
	24	24	27	14	26	23
	30	26	26	16	30	20
MW	26,9	26,9	27,2	14,4	26,6	21,2
SD	2,81	2,69	1,81	2,37	3,06	2,49
CV	10,43	9,98	6,67	16,43	11,51	11,72

Tab. 29

<i>Ac slo-1 snb-1</i>	<i>js 379</i> EtOH	<i>js 379</i> 10 nM Emodepsid	N2 EtOH	N2 10 nM Emodepsid	<i>Ac slo-1 snb-1</i> EtOH	<i>Ac slo-1 snb-1</i> 10nM Emodepsid
<i>body bends/min.</i>	23	22	24	23	24	22
	22	24	25	22	26	25
	25	27	20	25	27	26
	28	26	27	26	26	27
	30	24	26	24	28	29
	26	32	29	27	31	28
	24	28	31	28	30	30
	31	26	28	30	29	28
	28	30	27	25	28	29
	27	28	30	27	28	27
MW	26,4	26,7	26,7	25,7	27,7	27,1
SD	2,95	2,98	3,20	2,41	2,06	2,33
CV	11,18	11,17	11,98	9,36	7,43	8,60

Tab. 30

<i>Ac slo-1 snb-1</i>	<i>js 379</i> EtOH	<i>js 379</i> 1 nM Emodepsid	N2 EtOH	N2 1 nM Emodepsid	<i>Ac slo-1 snb-1</i> EtOH	<i>Ac slo-1 snb-1</i> 1 nM Emodepsid
<i>body bends/min.</i>	23	20	24	24	24	23
	22	24	25	25	26	24
	25	25	20	21	27	24
	28	23	27	27	26	24
	30	28	26	29	28	27
	26	32	29	30	31	28
	24	29	31	30	30	30
	31	29	28	27	29	31
	28	27	27	28	28	28
	27	28	30	26	28	30
MW	26,4	26,5	26,7	26,7	27,7	26,9
SD	2,95	3,50	3,20	2,83	2,06	2,96
CV	11,18	13,22	11,98	10,60	7,43	11,01

Tab. 31

<i>Co slo-1 snb-1 II</i>	<i>js 379</i> EtOH	<i>js 379</i> 10 µM Emodepsid	N2 EtOH	N2 10 µM Emodepsid	<i>Co slo-1 snb-1 II</i> EtOH	<i>Co slo-1 snb-1 II</i> 10 µM Emodepsid
<i>body bends/min.</i>	22	29	35	11	28	17
	32	18	34	11	40	14
	34	26	40	11	29	1
	31	22	32	6	32	16
	28	29	29	0	27	13
	35	33	27	4	33	15
	36	25	32	7	30	13
	23	27	32	11	32	13
	25	25	35	4	28	16
	30	30	30	3	32	12
MW	29,6	26,4	32,6	6,8	31,1	13
SD	4,97	4,27	3,66	4,05	3,75	4,52
CV	16,79	16,19	11,22	59,55	12,07	34,78

Tab. 32

<i>Co slo-1 snb-1 II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 µM Emodepsid</i>	N2 EtOH	N2 1 µM Emodepsid	<i>Co slo-1 snb-1 II EtOH</i>	<i>Co slo-1 snb-1 II 1 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	26	24	27	15	33	14
	28	32	30	20	32	15
	23	24	28	14	25	14
	22	26	27	8	35	17
	28	24	29	1	26	14
	23	26	32	12	28	11
	28	23	30	11	26	13
	27	31	31	15	30	19
	24	32	28	12	27	19
22	23	26	14	26	17	
MW	25,1	26,5	28,8	12,2	28,8	15,3
SD	2,56	3,72	1,93	5,03	3,49	2,63
CV	10,19	14,04	6,71	41,22	12,12	17,17

Tab. 33

<i>Co slo-1 snb-1 II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 100 nM Emodepsid</i>	N2 EtOH	N2 100 nM Emodepsid	<i>Co slo-1 snb-1 II EtOH</i>	<i>Co slo-1 snb-1 II 100nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	26	27	27	6	33	23
	28	23	30	15	32	20
	23	26	28	13	25	30
	22	26	27	10	35	26
	28	25	29	12	26	18
	23	25	32	20	28	15
	28	27	30	13	26	20
	27	24	31	18	30	30
	24	25	28	16		17
22		26	13		21	
MW	25,1	25,33	28,8	13,6	29,38	22
SD	2,56	1,32	1,93	3,98	3,70	5,21
CV	10,19	5,22	6,71	29,25	12,60	23,67

Tab. 34

<i>Co slo-1 snb-1 II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 nM Emodepsid</i>	N2 EtOH	N2 10 nM Emodepsid	<i>Co slo-1 snb-1 II EtOH</i>	<i>Co slo-1 snb-1 II 10nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	21	42	26	32	24	27
	24	30	27	27	26	22
	21	27	27	29	22	21
	22	26	23	23	28	30
	23	32	25	33	30	28
	24	27	26	24	29	28
	24	32	26	30	24	30
	25	31	22	25	24	33
	23	35	28	29	27	25
26	27	27	21	32	26	
MW	23,3	30,90	25,7	27,3	26,60	27
SD	1,64	4,86	1,89	3,97	3,17	3,68
CV	7,02	15,74	7,35	14,56	11,91	13,64

Tab. 35

<i>Co slo-1 snb-1 II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 nM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 1 nM Emodepsid</i>	<i>Co slo-1 snb-1 II EtOH</i>	<i>Co slo-1 snb-1 II 1 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	21	33	26	32	24	27
	24	32	27	27	26	28
	21	27	27	29	22	23
	22	24	23	23	28	28
	23	28	25	33	30	26
	24	27	26	24	29	30
	24	35	26	30	24	24
	25	26	22	25	24	27
	23	24	28	29	27	27
	26	23	27	21	32	25
MW	23,3	27,90	25,7	27,3	26,60	26,5
SD	1,64	4,12	1,89	3,97	3,17	2,07
CV	7,02	14,77	7,35	14,56	11,91	7,80

Tab. 36

<i>Co slo-1 snb-1 I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 µM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 10 µM Emodepsid</i>	<i>Co slo-1 snb-1 I EtOH</i>	<i>Co slo-1 snb-1 I 10 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	24	26	28	0	30	11
	26	24	26	2	27	9
	22	27	30	2	26	7
	25	25	24	0	24	8
	30	22	27	0	22	14
	28	24	30	0	26	11
	28	28	32	0	27	12
	30	27	24	0	26	7
	25	29	27	0	28	9
	28	26	28	0	30	10
MW	26,6	25,80	27,6	0,4	26,60	9,8
SD	2,63	2,10	2,59	0,84	2,46	2,25
CV	9,90	8,13	9,39	210,82	9,24	22,97

Tab. 37

<i>Co slo-1 snb-1 I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 µM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 1 µM Emodepsid</i>	<i>Co slo-1 snb-1 I EtOH</i>	<i>Co slo-1 snb-1 I 1 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	29	26	30	5	24	20
	26	32	28	10	26	20
	28	29	29	8	25	17
	27	29	27	10	26	12
	26	29	24	6	28	19
	32	28	24	7	29	20
	25	27	29	6	29	21
	27	31	27	4	27	18
	29	27	25	3	26	20
	32	27	26	5	25	17
MW	28,1	28,50	26,9	6,4	26,50	18,4
SD	2,42	1,90	2,13	2,37	1,72	2,63
CV	8,63	6,67	7,92	36,98	6,48	14,31

Tab. 38

<i>Co slo-1 snb-1 I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 100 nM Emodepsid</i>	N2 EtOH	N2 100 nM Emodepsid	<i>Co slo-1 snb-1 I EtOH</i>	<i>Co slo-1 snb-1 I 100nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	28	30	26	16	23	16
	24	27	22	18	24	16
	24	25	25	14	26	18
	25	21	27	14	28	20
	30	27	23	12	30	19
	27	24	30	15	29	14
	23	30	23	14	30	18
	30	31	28	14	26	16
	24	23	26	18	24	12
	26	27	28	12	25	17
MW	26,1	26,50	25,8	14,7	26,50	16,6
SD	2,56	3,27	2,57	2,11	2,59	2,37
CV	9,80	12,36	9,97	14,36	9,78	14,26

Tab. 39

<i>Co slo-1 snb-1 I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 nM Emodepsid</i>	N2 EtOH	N2 10 nM Emodepsid	<i>Co slo-1 snb-1 I EtOH</i>	<i>Co slo-1 snb-1 I 10nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	27	25	24	31	25	24
	26	28	24	27	24	26
	26	26	25	29	27	26
	27	26	26	23	28	27
	30	27	23	33	28	30
	28	25	24	24	29	29
	27	24	27	30	30	28
	25	28	27	25	31	28
	31	28	27	29	26	25
	27	30	28	21	27	28
MW	27,4	26,70	25,5	27,2	27,50	27,1
SD	1,84	1,83	1,72	3,85	2,17	1,85
CV	6,71	6,85	6,73	14,16	7,90	6,84

Tab. 40

<i>Co slo-1 snb-1 I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 nM Emodepsid</i>	N2 EtOH	N2 1 nM Emodepsid	<i>Co slo-1 snb-1 I EtOH</i>	<i>Co slo-1 snb-1 I 1 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	27	27	30	32	28	28
	30	27	28	28	27	28
	27	28	31	30	27	28
	28	25	26	26	30	31
	28	28	27	27	26	26
	30	30	27	27	31	29
	29	25	28	28	26	27
	27	26	30	29	24	25
	26	28	29	27	30	23
	27	30	26	28	30	30
MW	27,9	27,40	28,2	28,2	27,90	27,5
SD	1,37	1,78	1,75	1,75	2,28	2,37
CV	4,91	6,48	6,21	6,21	8,18	8,61

Tab. 41

<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 µM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 10 µM Emodepsid</i>	<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom EtOH</i>	<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom 10 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	24	23	25	2	25	3
	26	24	26	0	23	2
	23	25	25	0	22	0
	27	25	27	0	26	0
	28	27	28	0	26	0
	30	23	28	0	30	0
	31	28	30	0	31	0
	26	30	30	0	27	0
	24	31	27	0	28	0
	30	27	26	0	30	0
MW	26,9	26,3	27,2	0,2	26,8	0,5
SD	2,81	2,79	1,81	0,63	3,01	1,08
CV	10,43	10,61	6,67	316,23	11,24	216,02

Tab. 42

<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 µM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 1 µM Emodepsid</i>	<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom EtOH</i>	<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom 1 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	24	25	25	7	25	4
	26	27	26	5	23	5
	23	26	25	3	22	7
	27	22	27	7	26	10
	28	27	28	8	26	11
	30	28	28	10	30	4
	31	30	30	8	31	6
	26	32	30	4	27	8
	24	27	27	6	28	5
	30	28	26	8	30	4
MW	26,9	27,2	27,2	6,6	26,8	6,4
SD	2,81	2,70	1,81	2,12	3,01	2,55
CV	10,43	9,93	6,67	32,10	11,24	39,80

Tab. 43

<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 100 nM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 100 nM Emodepsid</i>	<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom EtOH</i>	<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom 100 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	24	26	25	13	25	12
	26	24	26	12	23	14
	23	24	25	16	22	17
	27	27	27	17	26	16
	28	28	28	10	26	18
	30	30	28	17	30	11
	31	32	30	16	31	13
	26	28	30	13	27	15
	24	24	27	14	28	17
	30	26	26	16	30	18
MW	26,9	26,9	27,2	14,4	26,8	15,1
SD	2,81	2,69	1,81	2,37	3,01	2,51
CV	10,43	9,98	6,67	16,43	11,24	16,65

Tab. 44

<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 nM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 10 nM Emodepsid</i>	<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom EtOH</i>	<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom 10 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	23	22	24	23	26	23
	22	24	25	22	23	25
	25	27	20	25	24	24
	28	26	27	26	26	28
	30	24	26	24	28	29
	26	32	29	27	30	27
	24	28	31	28	33	27
	31	26	28	30	29	28
	28	30	27	25	26	30
	27	28	30	27	27	30
MW	26,4	26,7	26,7	25,7	27,2	27,1
SD	2,95	2,98	3,20	2,41	2,94	2,42
CV	11,18	11,17	11,98	9,36	10,80	8,95

Tab. 45

<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 nM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 1 nM Emodepsid</i>	<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom EtOH</i>	<i>Ac slo-1 Ce slo-1 prom 1 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	23	20	24	24	26	23
	22	24	25	25	23	22
	25	25	20	21	24	24
	28	23	27	27	26	26
	30	28	26	29	28	24
	26	32	29	30	30	28
	24	29	31	30	33	28
	31	29	28	27	29	31
	28	27	27	28	26	29
	27	28	30	26	27	30
MW	26,4	26,5	26,7	26,7	27,2	26,5
SD	2,95	3,50	3,20	2,83	2,94	3,14
CV	11,18	13,22	11,98	10,60	10,80	11,83

Tab. 46

<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 µM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 10 µM Emodepsid</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I EtOH</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I 10 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	24	26	28	0	24	3
	26	24	26	2	27	0
	22	27	30	2	30	0
	25	25	24	0	27	0
	30	22	27	0	28	2
	28	24	30	0	32	0
	28	28	32	0	26	0
	30	27	24	0	24	0
	25	29	27	0	27	0
	28	26	28	0	27	0
MW	26,6	25,80	27,6	0,4	27,20	0,5
SD	2,63	2,10	2,59	0,84	2,44	1,08
CV	9,90	8,13	9,39	210,82	8,97	216,02

Tab. 47

<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 µM Emodepsid</i>	N2 EtOH	N2 1 µM Emodepsid	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I EtOH</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I 1 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	29	26	30	5	32	7
	26	32	28	10	33	8
	28	29	29	8	33	10
	27	29	27	10	32	5
	26	29	24	6	28	8
	32	28	24	7	27	3
	25	27	29	6	34	6
	27	31	27	4	30	4
	29	27	25	3	29	8
	32	27	26	5	26	7
MW	28,1	28,50	26,9	6,4	30,40	6,6
SD	2,42	1,90	2,13	2,37	2,80	2,12
CV	8,63	6,67	7,92	36,98	9,20	32,10

Tab. 48

<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 100 nM Emodepsid</i>	N2 EtOH	N2 100 nM Emodepsid	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I EtOH</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I 100 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	28	30	26	16	24	20
	24	27	22	18	26	18
	24	25	25	14	26	20
	25	21	27	14	28	14
	30	27	23	12	25	10
	27	24	30	15	28	17
	23	30	23	14	30	9
	30	31	28	14	24	13
	24	23	26	18	29	12
	26	27	28	12	26	17
MW	26,1	26,50	25,8	14,7	26,60	15
SD	2,56	3,27	2,57	2,11	2,07	3,97
CV	9,80	12,36	9,97	14,36	7,77	26,48

Tab. 49

<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 nM Emodepsid</i>	N2 EtOH	N2 10 nM Emodepsid	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I EtOH</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I 10 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	27	25	24	31	24	27
	26	28	24	27	26	22
	26	26	25	29	27	23
	27	26	26	23	28	30
	30	27	23	33	25	28
	28	25	24	24	30	28
	27	24	27	30	32	31
	25	28	27	25	28	28
	31	28	27	29	27	30
	27	30	28	21	26	26
MW	27,4	26,70	25,5	27,2	27,30	27,3
SD	1,84	1,83	1,72	3,85	2,36	2,95
CV	6,71	6,85	6,73	14,16	8,64	10,79

Tab. 50

<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 nM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 1 nM Emodepsid</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I EtOH</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom I 1 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	27	27	30	32	25	27
	30	27	28	28	30	28
	27	28	31	30	28	26
	28	25	26	26	28	26
	28	28	27	27	28	28
	30	30	27	27	26	30
	29	25	28	28	24	31
	27	26	30	29	27	26
	26	28	29	27	30	30
	27	30	26	28	27	30
MW	27,9	27,40	28,2	28,2	27,30	28,2
SD	1,37	1,78	1,75	1,75	1,95	1,93
CV	4,91	6,48	6,21	6,21	7,13	6,85

Tab. 51

<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 µM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 10 µM Emodepsid</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II EtOH</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II 10 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	26	26	26	0	25	0
	24	25	26	2	24	0
	27	24	27	2	26	0
	27	26	23	0	27	0
	25	25	25	0	27	0
	28	30	26	0	27	0
	28	29	26	0	28	0
	30	28	22	0	30	0
	28	27	28	0	28	0
	27	27	27	0	30	0
MW	27	26,70	25,6	0,4	27,20	0
SD	1,70	1,89	1,84	0,84	1,93	0
CV	6,30	7,07	7,18	210,82	7,10	0

Tab. 52

<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 µM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 1 µM Emodepsid</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II EtOH</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II 1 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	26	24	26	7	25	10
	24	26	26	5	24	8
	27	27	27	7	26	12
	27	24	23	10	27	13
	25	26	25	5	27	7
	28	26	26	12	27	5
	28	28	26	8	28	6
	30	29	22	5	30	6
	28	30	28	7	28	10
	27	31	27	10	30	11
MW	27	27,10	25,6	7,6	27,20	8,8
SD	1,70	2,38	1,84	2,41	1,93	2,78
CV	6,30	8,78	7,18	31,75	7,10	31,60

Tab. 53

<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 100 nM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 100 nM Emodepsid</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II EtOH</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II 100 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	25	27	29	16	28	17
	23	25	25	14	25	14
	26	24	26	12	24	15
	27	28	30	10	27	19
	28	30	31	17	27	23
	28	27	27	12	30	14
	28	26	27	11	32	18
	30	30	28	9	30	20
	29	27	24	17	26	11
	27	26	30	20	28	14
MW	27,1	27,00	27,7	13,8	27,70	16,5
SD	2,02	1,94	2,31	3,58	2,45	3,57
CV	7,47	7,20	8,35	25,97	8,85	21,62

Tab. 54

<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 nM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 10 nM Emodepsid</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II EtOH</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II 10 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	25	27	29	23	28	25
	23	25	25	25	25	24
	26	26	26	26	24	27
	27	28	30	24	27	26
	28	32	31	27	27	30
	28	28	27	27	30	31
	28	28	27	28	32	28
	30	27	28	30	30	27
	29	29	24	29	26	26
	27	26	30	28	28	30
MW	27,1	27,60	27,7	26,7	27,70	27,4
SD	2,02	1,96	2,31	2,21	2,45	2,32
CV	7,47	7,08	8,35	8,29	8,85	8,46

Tab. 55

<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 nM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 1 nM Emodepsid</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II EtOH</i>	<i>Co slo-1 Ce slo-1 prom II 1 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	30	27	30	25	27	28
	25	24	28	27	25	26
	27	27	25	27	28	25
	27	30	31	27	28	24
	28	30	27	30	30	31
	26	28	28	31	30	28
	25	27	30	28	26	27
	30	28	28	26	27	28
	26	26	26	29	27	30
	27	30	29	30	25	26
MW	27,1	27,70	28,2	28	27,30	27,3
SD	1,79	1,95	1,87	1,94	1,77	2,16
CV	6,61	7,03	6,64	6,94	6,47	7,92

Tab. 56

<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 µM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 10 µM Emodepsid</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I EtOH</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I 10 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	24	26	28	0	24	0
	26	24	26	2	24	0
	22	27	30	2	28	0
	25	25	24	0	27	0
	30	22	27	0	30	0
	28	24	30	0	23	0
	28	28	32	0	27	0
	30	27	24	0	28	0
	25	29	27	0	30	0
28	26	28	0	30	0	
MW	26,6	25,80	27,6	0,4	27,10	0
SD	2,63	2,10	2,59	0,84	2,64	0
CV	9,90	8,13	9,39	210,82	9,76	0

Tab. 57

<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 µM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 1 µM Emodepsid</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I EtOH</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I 1 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	29	26	30	5	29	7
	26	32	28	10	27	7
	28	29	29	8	32	7
	27	29	27	10	26	5
	26	29	24	6	25	4
	32	28	24	7	27	4
	25	27	29	6	27	3
	27	31	27	4	28	4
	29	27	25	3	30	7
32	27	26	5	25	5	
MW	28,1	28,50	26,9	6,4	27,60	5,3
SD	2,42	1,90	2,13	2,37	2,22	1,57
CV	8,63	6,67	7,92	36,98	8,05	29,57

Tab. 58

<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 100 mM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 100 nM Emodepsid</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I EtOH</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I 100 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	28	30	26	16	25	18
	24	27	22	18	22	20
	24	25	25	14	26	19
	25	21	27	14	26	21
	30	27	23	12	26	16
	27	24	30	15	27	15
	23	30	23	14	22	13
	30	31	28	14	28	16
	24	23	26	18	30	11
26	27	28	12	26	10	
MW	26,1	26,50	25,8	14,7	25,80	15,9
SD	2,56	3,27	2,57	2,11	2,44	3,73
CV	9,80	12,36	9,97	14,36	9,46	23,43

Tab. 59

<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 mM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 10 nM Emodepsid</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I EtOH</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I 10 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	27	25	24	31	26	24
	26	28	24	27	28	23
	26	26	25	29	27	26
	27	26	26	23	30	28
	30	27	23	33	31	28
	28	25	24	24	26	29
	27	24	27	30	25	26
	25	28	27	25	28	30
	31	28	27	29	28	30
	27	30	28	21	27	26
MW	27,4	26,70	25,5	27,2	27,60	27
SD	1,84	1,83	1,72	3,85	1,84	2,40
CV	6,71	6,85	6,73	14,16	6,66	8,90

Tab. 60

<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 mM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 1 nM Emodepsid</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I EtOH</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom I 1 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	27	27	30	32	30	27
	30	27	28	28	32	27
	27	28	31	30	30	26
	28	25	26	26	32	28
	28	28	27	27	25	29
	30	30	27	27	27	28
	29	25	28	28	28	30
	27	26	30	29	30	31
	26	28	29	27	27	30
	27	30	26	28	28	28
MW	27,9	27,40	28,2	28,2	28,90	28,4
SD	1,37	1,78	1,75	1,75	2,28	1,58
CV	4,91	6,48	6,21	6,21	7,90	5,56

Tab. 61

<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 µM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 10 µM Emodepsid</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II EtOH</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II 10 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	26	26	26	0	27	2
	24	25	26	2	25	0
	27	24	27	2	26	0
	27	26	23	0	24	0
	25	25	25	0	26	0
	28	30	26	0	27	0
	28	29	26	0	28	0
	30	28	22	0	28	0
	28	27	28	0	30	0
	27	27	27	0	26	0
MW	27	26,70	25,6	0,4	26,70	0,2
SD	1,70	1,89	1,84	0,84	1,70	0,63
CV	6,30	7,07	7,18	210,82	6,38	316,23

Tab. 62

<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 µM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 1 µM Emodepsid</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II EtOH</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II 1 µM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	26	24	26	7	27	8
	24	26	26	5	25	7
	27	27	27	7	26	4
	27	24	23	10	24	5
	25	26	25	5	26	8
	28	26	26	12	27	10
	28	28	26	8	28	12
	30	29	22	5	28	9
	28	30	28	7	30	5
	27	31	27	10	26	7
MW	27	27,10	25,6	7,6	26,70	7,5
SD	1,70	2,38	1,84	2,41	1,70	2,46
CV	6,30	8,78	7,18	31,75	6,38	32,81

Tab. 63

<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 100 nM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 100 nM Emodepsid</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II EtOH</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II 100 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	25	27	29	16	24	12
	23	25	25	14	27	15
	26	24	26	12	28	18
	27	28	30	10	26	19
	28	30	31	17	30	14
	28	27	27	12	25	12
	28	26	27	11	26	11
	30	30	28	9	27	11
	29	27	24	17	28	15
	27	26	30	20	30	7
MW	27,1	27,00	27,7	13,8	27,10	13,4
SD	2,02	1,94	2,31	3,58	1,97	3,57
CV	7,47	7,20	8,35	25,97	7,27	26,61

Tab. 64

<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 10 nM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 10 nM Emodepsid</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II EtOH</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II 10 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	25	27	29	23	24	25
	23	25	25	25	27	26
	26	26	26	26	28	27
	27	28	30	24	26	28
	28	32	31	27	30	27
	28	28	27	27	25	26
	28	28	27	28	26	25
	30	27	28	30	27	30
	29	29	24	29	28	28
	27	26	30	28	30	30
MW	27,1	27,60	27,7	26,7	27,10	27,2
SD	2,02	1,96	2,31	2,21	1,97	1,81
CV	7,47	7,08	8,35	8,29	7,27	6,67

Tab. 65

<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II</i>	<i>js 379 EtOH</i>	<i>js 379 1 nM Emodepsid</i>	<i>N2 EtOH</i>	<i>N2 1 nM Emodepsid</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II EtOH</i>	<i>Ce slo-1 Ce slo-1 prom II 1 nM Emodepsid</i>
<i>body bends/min.</i>	30	27	30	25	25	28
	25	24	28	27	26	26
	27	27	25	27	27	26
	27	30	31	27	26	30
	28	30	27	30	31	28
	26	28	28	31	26	27
	25	27	30	28	24	24
	30	28	28	26	27	26
	26	26	26	29	28	30
	27	30	29	30	30	30
MW	27,1	27,70	28,2	28	27,00	27,5
SD	1,79	1,95	1,87	1,94	2,16	2,07
CV	6,61	7,03	6,64	6,94	8,00	7,52

Tab. 66

7.4 Primer und Sonden

Primername	Sequenz 5' – 3'	Produktgröße
HCTMR I Fw	5'- TAC GCA CCG ACA ACC TTT T-3'	404 bp
HCTMR I Rv	5'-GCT CTG GCT CCC GTG ATA CCT CTA -3'	

Tab. 67: Sequenzen der Primer für die Amplifikation der Sonde für den Southern Blot. Die Sonde umfasst einen Teilbereich der Transmembranregion der kodierenden Sequenz von Hc110-R von *H. contortus*.

Primername	Sequenz 5' – 3'	Produktgröße
Ac Depsi FL Fw 1	5'- TGC TGT CGC TTT CAG AAC AT -3'	3086
Ac Depsi FL Rv 3	5'- GAC ATT CCT GGG CCA ATA GC -3'	

Tab.68: Sequenzen der Primer für die Amplifikation der vollständigen kodierenden Sequenz des Depsiphilins von *A. caninum*

Primername	Sequenz 5' – 3'	Produktgröße
Ac Slo-1 FL Fw	5'- TGG GCG AAC ACT ACG TCG GTA G -3'	3413 bp
Ac Slo-1 FL Rv	5'- GAG CAA AGG ACT GGA CAA GTT GAG C -3'	

Tab.69: Sequenzen der Primer für die Amplifikation der vollständigen kodierenden Sequenz des *slo-1* von *A. caninum*

Primer	Sequenz 5' – 3'	Restriktionsenzym schnittstelle	Produktgröße
Ac Depsi <i>San D I</i> Fw 3	5'- <u>GGG ACC</u> CGG TTT AAT ACC GTA GCG ATG -3'	<i>San D I</i>	3031 bp
Ac Depsi <i>Nhe I</i> Rv 3	5'- <u>GCT AGC</u> TTT AGA CAT TCC TGG GCC AAT AGC -3'	<i>Nhe I</i>	
Co Depsi <i>SanDI</i> F	5'- <u>GGG ACC</u> CAT ATG AAG AAA CTG CCG A -3'	<i>San D I</i>	3012 bp
Co Depsi <i>NheI</i> Re	5'- <u>GCT AGC</u> TAG GAA TGT GCT AAA CGT TTC GC -3'	<i>Nhe I</i>	

Tab. 70: Sequenzen der Primer inklusive der Restriktionsenzymchnittstellen (unterstrichen) für die Amplifikation der codierenden Sequenzen der Depsiphiline von *A. caninum* und *C. oncophora* zur Expression in dem Expressionsvektor pPD 30.69.

Primername	Sequenz 5' – 3'	Restriktions- enzymchnittstelle	Produktgröße
Co Depsi prom <i>Hind</i> F	5'- <u>AAG CTT</u> ACG ATT ATC CAA GGT ATA GTG GGC -3'	<i>Hind I</i>	3187 bp
Co Depsi prom <i>Bam</i> Re	5'- <u>GGA TCC</u> ATT GGT ATT AAA CCA AGC TGC -3'	<i>Bam H I</i>	

Tab. 71: Sequenzen der Primer inklusive der Restriktionsenzymchnittstellen (unterstrichen) für die Amplifikation der Promotorsequenzen von Depsiphilin von *C. oncophora* zur Ligation in den Expressionsvektor pPD 95.75.

Primername	Sequenz 5' – 3'	Restriktions- enzymschnittstelle	Produktgröße
Ac slo-1 prom fw2 <i>Hin</i> D III	5'- <u>AAG CTT</u> GCA ATG AAG ACG ACC -3'	<i>Hin</i> d III	2869 bp
Ac slo-1 prom rv <i>Bam</i> H I	5'- <u>GGA TCC</u> TCT GCT CGA CGC TA -3'	<i>Bam</i> H I	
Co slo-1 prom <i>Pst</i> I F	5'- <u>CTG CAG</u> CAT AGG GTG GTA AGG AT -3'	<i>Pst</i> I	3421 bp
Co slo-1 prom <i>Bam</i> Re	5'- <u>GGA TCC</u> AAA TGC AAA GAC CAT AAA C -3'	<i>Bam</i> H I	
Ce slo-1 <i>Hin</i> d F	5'- <u>AAG CTT</u> TCT CAT TGG ACA GGG GGT AG-3'	<i>Hin</i> d III	3084 bp
Ce slo-1 <i>Xba</i> Re	5'- <u>TCT AGA</u> CGA CGA AGG GTC CAC CC -3'	<i>Xba</i> I	

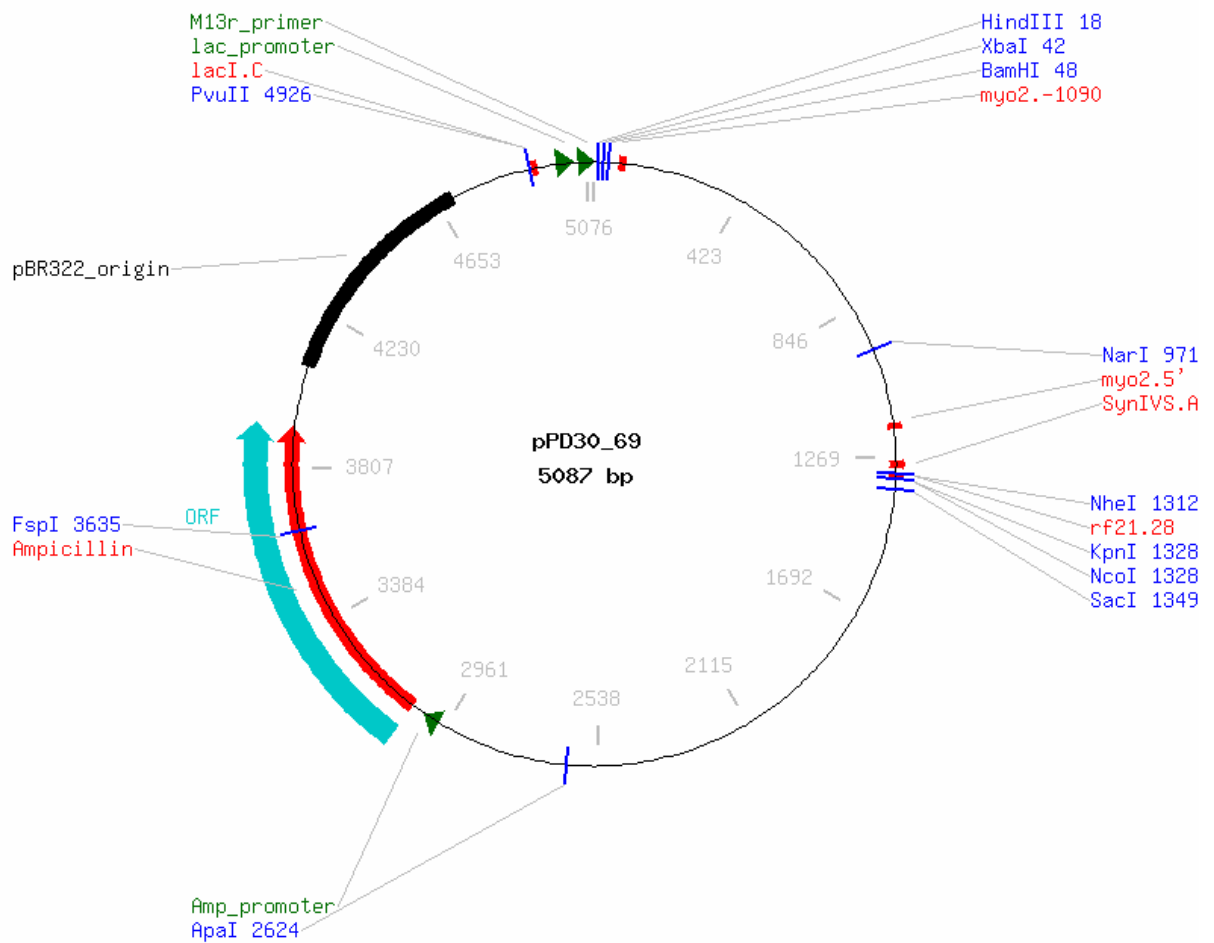
Tab. 72: Sequenzen der Primer inklusive der Restriktionsenzymschnittstellen (unterstrichen) für die Amplifikation der Promotorsequenzen von *slo-1* von *A. caninum*, *C. oncophora* und *C. elegans* zur Ligation in den Expressionsvektor pPD 95.75.

Primername	Sequenz 5' – 3'	Restriktions- enzymschnittstelle	Produktgröße
Ac slo-1 <i>Xba</i> II F	5'- <u>TCT AGA</u> TGG GCG AAC ACT ACG TC -3'	<i>Xba</i> I	3341 bp
Ac slo-1 <i>Bam</i> II Re	5'- <u>GGA TCC</u> TCC GTA GCC AAG TGA -3'	<i>Bam</i> H I	
Co slo <i>Xba</i> IF	5'- <u>TCT AGA</u> TGT CTG TTC ATT TAG GGA TGG G -3'	<i>Xba</i> I	3365 bp
Co slo <i>Bam</i> Re	5'- <u>GGA TCC</u> GTA ACT GCG AAT GGG A -3'	<i>Bam</i> H I	

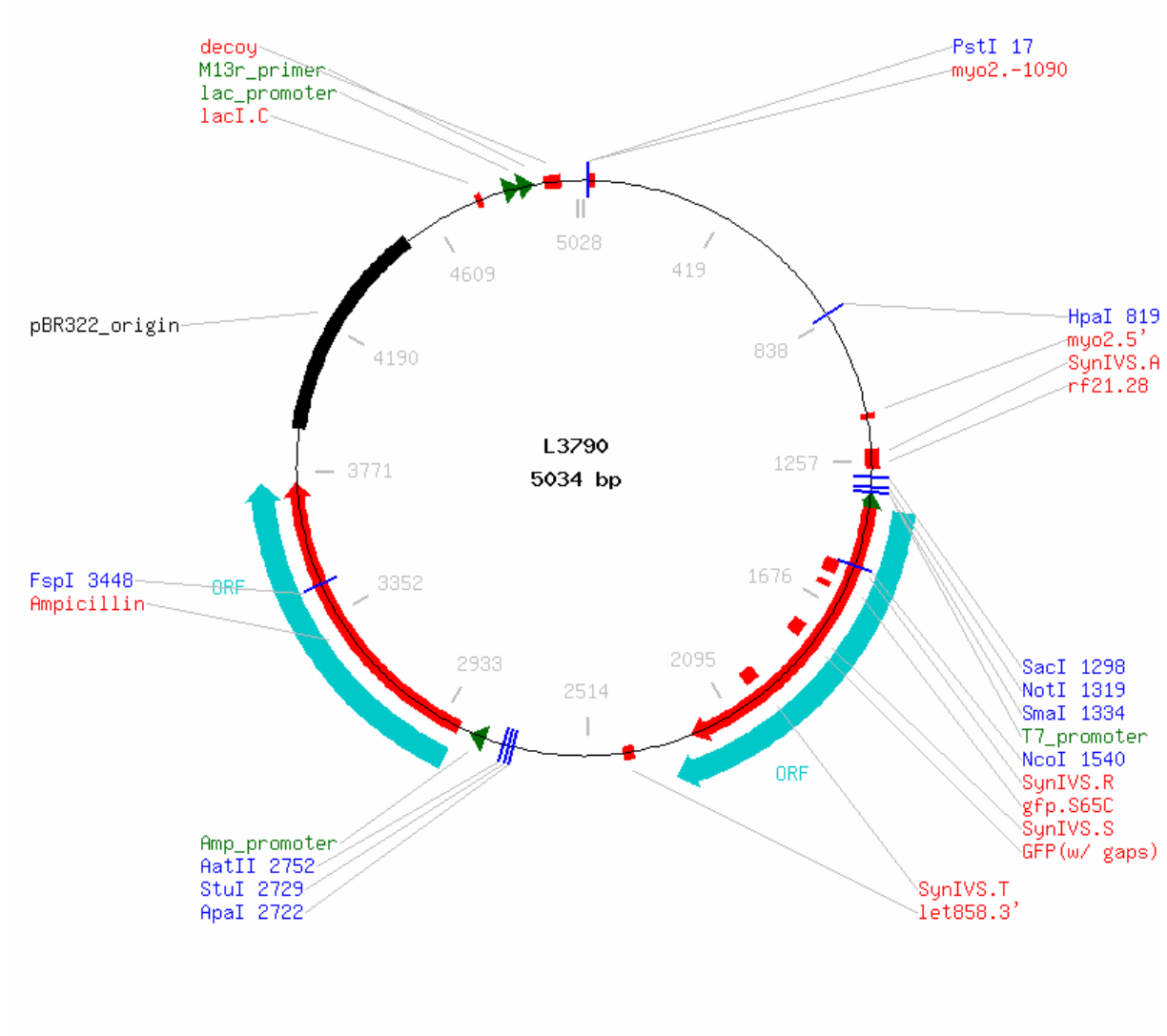
Tab. 73: Sequenzen der Primer inklusive der Restriktionsenzymschnittstellen (unterstrichen) für die Amplifikation der kodierenden Sequenzen von *slo-1* von *A. caninum* und *C. oncophora* zur Ligation in die Expressionsvektoren pBK3.1 und pBK4.1.

7.5 Vektoren zur heterologen Expression in *C. elegans*

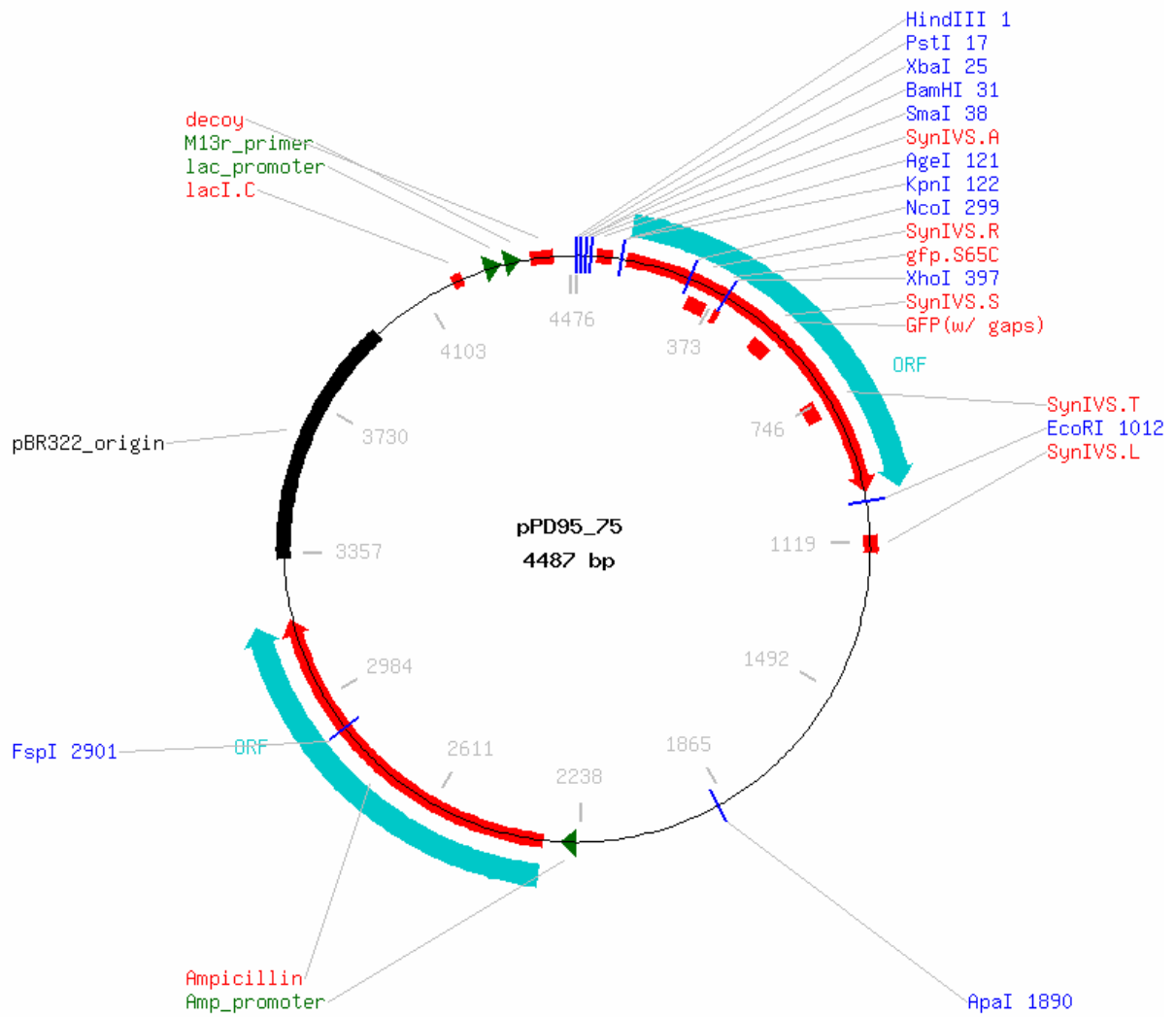
7.5.1 pPD30.69 (Addgene Plasmid: 1444)



7.5.2 pPD 118.33 (Addgene plasmid: 1596)



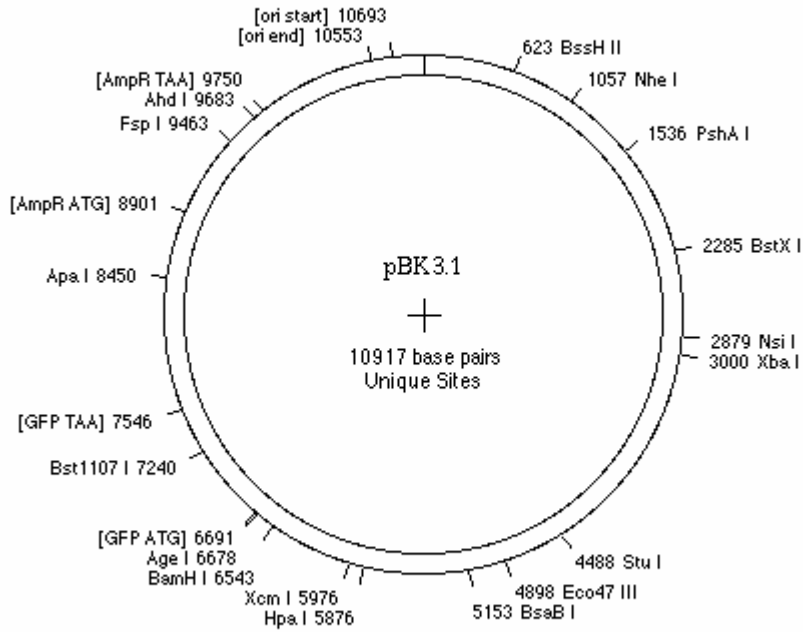
7.5.3 pPD 95.75 (Addgene Plasmid: 1494)



7.5.4 pBK 3.1

pBK 3.1 ist abgeleitet von pRM248 (Nonet et al., 1993), Sequenz siehe:

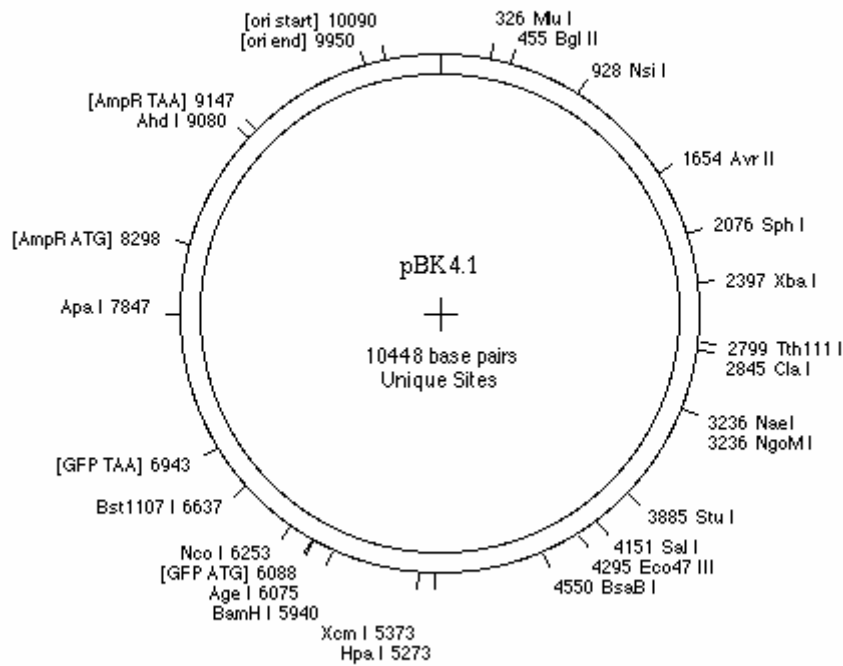
<http://thalamus.wustl.edu/nonetlab/ResourcesF/seqinfo.html>



7.5.5 pBK 4.1

pBK 4.1 ist abgeleitet von pPD96.52, Sequenz siehe:

<http://thalamus.wustl.edu/nonetlab/ResourcesF/seqinfo.html>



7.6 Zugangsnummern (Accession numbers) verwendeter Sequenzen der NCBI-Genbank

Bezeichnung Gen/Protein/Sequenz	Accession number
<i>A. californica</i> SLO-1	AAR27959
<i>A. caninum</i> , whole genome shotgun library (enthält Fragment des Depsiphilins)	CZ196895
<i>A. caninum</i> , whole genome shotgun library (enthält Fragment des <i>slo-1</i>)	CW974961
<i>A. caninum</i> Depsiphilin <i>cds</i>	1104815
<i>A. caninum slo-1 cds</i>	1104829
<i>B. taurus</i> LPH-1, Protein	AAD09191
<i>B. taurus</i> LPH-2, Protein	AAD05306
<i>B. taurus</i> LPH-3, Protein	AAD05329
<i>B. taurus</i> Kaliumkanal, Protein	AAK54354
<i>C. familiaris</i> LPH-2	XP_547314
<i>C. familiaris</i> Kaliumkanal	NCBI Q28265
<i>C. elegans lat-1a cds</i>	AY314770
<i>C. elegans lat-1b cds</i>	AY314771
<i>C. elegans lat-1c cds</i>	B0457.c
<i>C. elegans</i> LAT-1a Protein	AAQ84877
<i>C. elegans</i> LAT-1b Protein	AAQ84878
<i>C. elegans</i> LAT-1c Protein	CE02945
<i>C. elegans lat-2</i>	AY314772
<i>C. elegans</i> LAT-2	AAQ84879
<i>C. elegans slo-1 A cds</i>	NM_001029089
<i>C. elegans slo-1 B cds</i>	NM_001029089
<i>C. elegans slo-1 C cds</i>	NM_001029089
<i>C. elegans</i> SLO-1 A, abgeleitetes Protein	NM_001029089
<i>C. elegans</i> SLO-1 B Protein	NM_001029089
<i>C. elegans</i> SLO-1 C Protein	NM_001029089
<i>C. briggsae</i> mögliches LAT-1	CAE59757
<i>C. briggsae</i> mögliches LAT-2	CAE60128
<i>C. oncophora</i> Depsiphilin, abgeleitetes Protein	DQ356247

<i>C. oncophora</i> SLO-1, abgeleitetes Protein	AJ272270
<i>D. melanogaster</i> SLO-1 P	AAX52990
<i>G. gallus</i> Kaliumkanal, Protein	AAC35370
<i>H. contortus</i> Hc110-R cds	AJ272270
<i>H. contortus</i> Hc110-R Protein	CAC01096
<i>H. contortus</i> SLO-1, abgeleitetes Protein	EF494184
<i>H. sapiens</i> LPH-2	CAI22398
<i>H. sapiens</i> , Kaliumkanal	EAW54600
<i>M. musculus</i> LPH-1	NP 851382
<i>M. musculus</i> LPH-2	XP 131258
<i>M. musculus</i> LPH-3	NP 941991
<i>M. sexta</i> SLO-1	AAT44358
<i>O. ostertagi</i> Depsiphilin, abgeleitetes Protein	DQ356249
<i>R. norvegicus</i> LPH-1	NP 075251
<i>R. norvegicus</i> LPH-2	NP 599235
<i>R. norvegicus</i> LPH-3	NP 570835
<i>R. norvegicus</i> Kaliumkanal	AAD34786
<i>T. castaneum</i> SLO-1	XP_968651

Die Arbeiten zur heterologen Expression in *C. elegans* wurden in der Arbeitsgruppe Neuroscience von Prof. Lindy Holden-Dye in der School of Biological Sciences der University Southampton, GB, durchgeführt.

8 Curriculum Vitae

Nina Fischer
Luhterstrasse 48
30171 Hannover

Geboren am 23.10.1975 in Hamburg

Schulen:

Buntenskamp Grundschule in Geesthacht, 1982 – 1986
Otto- Hahn-Gymnasium Geesthacht, 1986-1995

Studium:

2 Semester Studium der Germanistik, Geschichte, Philosophie an der Leibniz
Universität Hannover, Wintersemester 1996/97-Sommersemester 1997

Studium der Biologie (Diplom) an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg,
Wintersemester 1997/98-Wintersemester 1998/99

ab dem Sommersemester 1999 bis zum Wintersemester 2003/04 Fortführung an der
Leibniz Universität Hannover

Diplomarbeit im Institut für Tierökologie und Zellbiologie der Stiftung Tierärztliche
Hochschule Hannover bei Prof. Bernd Schierwater

Thema: „Molekulargenetische Studie zur Struktur und Funktion des *Pax-B*-Gens bei
Trichoplax adhaerens (Placozoa)“ Abschluss als Diplom-Biologin mit der Note Sehr
gut

Promotion:

April 2004

Beginn der Promotion in der Arbeitsgruppe Prof. Georg von Samson-Himmelstjerna
im Institut für Parasitologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Thema: „Identifikation, Charakterisierung und funktionale Untersuchung von
putativen Emodepsidrezeptoren bei Nematoden“

9 Publikationsliste

Wissenschaftliche Vorträge

7. bis 9. Juni 2006

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

N. Fischer, A. Harder, G. von Samson-Himmelstjerna:

„Identifikation und Charakterisierung eines putativen Emodepsidrezeptors in *Ancylostoma caninum*“

4. bis 6. Juni 2007

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

N. Fischer, A. Harder, G. von Samson-Himmelstjerna

„Genomische Organisation des putative Emodepsidrezeptors bei *Ancylostoma caninum*“

5. bis 7. März 2008

The German Society for Parasitology, 23rd Annual Meeting, Hamburg

N. Fischer, C. Welz, M. Guest, L. Holden-Dye, A. Harder, T. Schnieder, G. von Samson-Himmelstjerna:

„Functional expression of the calcium-gated potassium channel SLO-1 of parasitic nematodes in *Caenorhabditis elegans*“

Posterpräsentationen

19. bis 23. August 2007

The 21st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology; From EPG to Genes, Gent, Belgien

N. Fischer, C. Welz, A. Harder, G. von Samson-Himmelstjerna:

„Transcription studies on dephosphilins in different stages of *Ancylostoma caninum*, *Haemonchus contortus* and *Ostertagia ostertagi* using quantitative real-time PCR“

10 Erklärung

Hierdurch erkläre ich, dass ich die Dissertation „Identifikation, Charakterisierung und funktionale Expression von putativen Emodepsidrezeptoren“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfestellung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 18.06.2008

Nina Fischer

Danksagung

Herrn Prof. Georg von Samson-Himmelstjerna danke ich für die Überlassung des wunderbaren Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ich möchte mich außerdem für die freundliche, motivierende und freundschaftliche Unterstützung bei jeglichen Fragen und Problemen bezüglich der Dissertation bedanken, die dazu beigetragen hat, dass ich immer mit viel Spaß und Freude gearbeitet habe. Zudem bin ich dankbar, dass ich die Möglichkeit hatte an zahlreichen Fachtagungen teilzunehmen und dort meine Arbeit vorzustellen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Schnieder für das entgegengebrachte Vertrauen und die stets motivierende, freundliche Unterstützung während der Anfertigung der Dissertation.

Ich danke der Bayer HealthCare AG für die finanzielle Unterstützung des Projektes. Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Achim Harder für die großartige Unterstützung, das stets unerschütterliche Vertrauen und die konstruktiven fachlichen Anregungen.

Ich bedanke mich bei Prof. Lindy Holden-Dye für die fruchtbare Kooperation und die Möglichkeit die heterologe Expression in *C. elegans* in Southampton zu erlernen und erfolgreich durchzuführen.

Ich danke außerdem ganz besonders Marcus Guest, der sich in Southampton sehr viel Zeit genommen hat, mich in die spannende Welt von *C. elegans* einzuarbeiten. Nicht nur seine Hilfsbereitschaft war außerordentlich, sondern auch sein Interesse und die Begeisterung für meine Arbeit.

Außerdem danke ich Neline Kriek, PhD, für die vielen fachlichen Gespräche, die Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Unterstützung im Labor.

Zudem sei der gesamten Arbeitsgruppe von Lindy Holden-Dye gedankt, die mich so freundlich aufgenommen hat und mir nie das Gefühl gab, eine Fremde zu sein.

Kann man sich für Freundschaft bedanken? Ich freue mich, dass ich mit Claudia Welz, PhD dieses wunderbare Projekt teilen durfte. Ich bedanke mich bei ihr für die großartige Unterstützung und den Einsatz. Ohne Claudia hätten einige Teile dieser Arbeit nicht in diesem Maße entstehen können.

Ich bedanke mich bei Sandra Buschbaum, die mich im Labor eingearbeitet hat. Von ihr habe ich schnell gelernt, dass ein Labor nicht von alleine läuft und dass es Spaß machen kann auch für andere Verantwortung zu übernehmen. Ihre Freundschaft hat erheblich dazu beigetragen (fast) jeden Tag gerne ins Labor zu gehen.

Mit Dr. Ricarda Hüsken habe ich nicht nur eine fantastische Kollegin, sondern auch eine tolle Freundin gefunden. Wir sind gemeinsam durch die Höhen und Tiefen des Labor- und Studienalltags gegangen. Ich danke Rice für die vielen fachlichen und privaten Gespräche in der „vierten“ und für Schokokekese für die Seele.

Ich danke außerdem Dr. Sonja Wolken und Dr. Christian von Holtum für eine tolle gemeinsame Doktorandenzeit und für die Freundschaft, die sich daraus entwickelt hat. Tür zu in der „vierten“ und immer ein offenes Ohr zu finden, dafür bin ich dankbar.

Ich danke Christina Strube, PhD für die fachliche Unterstützung, die konstruktive Hilfestellung und die fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche.

Ich bin außerdem Dr. Janina Demeler, meiner neuen Zimmergenossin, dankbar, dass sie mich in der Phase des Zusammenschreibens so tapfer ertragen hat und mir stets mit großer Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Ich fühle mich der Parasitologie verbunden, komme gerne zur Arbeit und freue mich auf meine Kollegen. Dass dies so ist, habe ich allen Mitarbeitern des Instituts zu verdanken! Hier alle aufzuzählen würde den Rahmen sprengen, denn mir würde zu jeder Person etwas einfallen, wofür ich dankbar bin. So kommt an dieser Stelle ein großes DANKE an alle!

Ich danke Lars, der mir immer in erster Sekunde angesehen hat, wenn im Labor etwas schief gelaufen war und der mir geholfen hat, zu erkennen, dass die Welt so groß ist, dass die eigenen Probleme ganz klein werden.

Last but not least danke ich meinem Vater! Ohne seine Unterstützung, den Rückhalt und das grenzenlose Vertrauen wäre ich nicht so weit gekommen.