

# Inhaltsverzeichnis

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

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

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