

7 Zusammenfassung

Die kleinen Strongyliden sind die bedeutendsten Endoparasiten des Pferdes und können erhebliche Verluste insbesondere bei Jungtieren verursachen. Die Benzimidazole stellen noch die am häufigsten zur Bekämpfung eingesetzten Anthelminthika dar. Die umfangreiche Verwendung und die Behandlung mit subtherapeutischen Dosierungen führte weltweit zur Entwicklung BZ-resistenter kleiner Strongylidenstämme. Als genetische Grundlage der BZ-Resistenz konnte beim Schafparasiten *H. contortus* eine Punktmutation innerhalb des Codons 200 des β -Tubulin-Gens ermittelt werden.

Die Charakterisierung der cDNA und der genomischen DNA des β -Tubulin-Gens der Spezies *Cylicocyclus nassatus* und einer Mischpopulation kleiner Strongyliden erfolgte mit verschiedenen PCR-Techniken. Zur Aufklärung der Sequenz der cDNA des β -Tubulin-Gens wurden die PCR mit degenerierten Primern aus einem Vergleich der Aminosäuresequenzen der β -Tubuline verschiedener Spezies, die SL1-PCR, die 3'RACE und eine PCR mit zwei spezifischen Primern aus der Sequenz der cDNA des β -Tubulin-Gens von *C. nassatus* eingesetzt. Die cDNA-Sequenzen des β -Tubulin-Gens von *C. nassatus* und einer Mischpopulation adulter kleiner Strongyliden umfassen 1429 bp und sind 96 % identisch. Sie codieren jeweils für ein Protein von 448 Aminosäuren. Die cDNA-Sequenzen zeigen mit den β -Tubulin-Genen anderer Spezies Identitäten zwischen 77 und 88 % (*C. nassatus*) bzw. 76 und 87 % (Mischpopulation). Die cDNA-Sequenz weist einige variable Nukleotide auf, von denen bei *C. nassatus* eine und bei der Mischpopulation vier zu einem Austausch der entsprechenden Aminosäure führen können. Beide Sequenzen zeigen einen Polymorphismus im Codon 200, der bei *H. contortus* als Ursache für die Benzimidazolresistenz beschrieben wurde.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen hohe Identitäten von 98 und 99 % mit den β -Tubulinen von *T. circumcincta* und *H. contortus* β 8-9, die als Isotyp 1 charakterisiert wurden. Aufgrund der hohen Identitäten mit den Sequenzen dieses Isotyps und der Übereinstimmungen der mit der 3'RACE erhaltenen Sequenzen des 3'-Endes, ist eine Zuordnung der charakterisierten Sequenzen des β -Tubulin-Gens von *C. nassatus* und der Mischpopulation kleiner Strongyliden zum Isotyp 1 möglich. Zur Aufklärung der Sequenz der genomischen DNA von *C. nassatus* und einer Larvenmischpopulation kleiner Strongyliden wurden spezifische Primer aus der Sequenz der cDNA des β -Tubulin-Gens von *C. nassatus* eingesetzt. Sie umfaßt 2652 bp und ist in neun Exons und acht Introns unterteilt. Die Exons weisen

Identitäten von 78 und 97 % (*C. nassatus*) bzw. 79 und 96 % (Mischpopulation) mit dem *gru-1* β -Tubulin-Gen von *H. contortus* auf, während die Introns stark variieren und keine deutlichen Übereinstimmungen über längere Sequenzabschnitte zeigen. Die Charakterisierung des β -Tubulin-Gens von *C. nassatus* und einer Mischpopulation kleiner Strongyliden ist die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Benzimidazolresistenz bei den kleinen Strongyliden des Pferdes. Der Vergleich der β -Tubulin-Gene BZ-resistenter und -empfindlicher Populationen soll zeigen, ob die im Codon 200 auftretende Mutation mit dem Resistenzmechanismus assoziiert ist.

8 Summary

Michaela Pape:

Characterisation of the β -tubulin gene of the small strongyles of horses

The small strongyles occur world-wide and are the most important parasites of horses. They cause severe clinical diseases in young horses. The widespread use together with improper dosage led to parasite resistance against the class of benzimidazoles. BZ-resistance in the sheep parasite *H. contortus* correlates with a single amino acid substitution in the codon 200 of the β -tubulin.

The cDNA and genomic DNA of the β -tubulin gene of *C. nassatus* and a mixed population of small strongyles were characterised.

The cDNA was amplified in the PCR using degenerate primers which were designed according to the alignment of the β -tubulin amino acid sequences of other species. To complete the coding sequence the 3' end was amplified with the 3'RACE and for the amplification of the 5' end the SL1-primer was used. The cDNA of the β -tubulin gene of *C. nassatus* and a mixed third larvae population of small strongyles spans 1429 bp and codes for a protein of 448 amino acids. The cDNA sequences of *C. nassatus* and the mixed population show identities of 96 % and the identities with the cDNA sequences of the β -tubulin gene of other species range between 77 and 88 % (*C. nassatus*) or 76 and 87 % (mixed population). The differences between the sequences of the β -tubulin gene of *C. nassatus* and the mixed population of small strongyles are caused by several variable nucleotides. One of them is responsible for a change in the amino acid sequences in both characterised sequences. This polymorphism is located in codon 200.

The entire amino acid sequences of the β -tubulin of *C. nassatus* and the mixed population are 98 % identical to the isotype 1 of *H. contortus* and 98 % (*C. nassatus*) and 99 % (mixed population) identical to the sequence of *T. circumcincta*. Based on the high identities ELARD et al. (1996) identified their *T. circumcincta* sequence as isotype 1. Because of the close similarity at the carboxytermini between the sequences of *C. nassatus* and the mixed population of small strongyles to the other known β -tubulin isotype 1 sequences the sequence presented here was identified as isotype 1. After multiple PCRs with different primers from the carboxyterminus in the 3'RACE the resulting sequences were identical and there was no evidence for more than one isotype.

The complete sequence of the genomic DNA of the β -tubulin gene of *C. nassatus* and a mixed population of third larvae of the small strongyles has a size of 2652 bp and is organised in nine exons and eight introns. The identities with the exons of the *gru-1* β -tubulin of *H. contortus* range between 78 and 97 % (*C. nassatus*) and 79 and 96 % (mixed population). The introns of the sequences did not show similarities.

The characterisation of the β -tubulin gene of *C. nassatus* and a mixed population of small strongyles is the basis for the studies on the mechanism of BZ-resistance in small strongyles of horses. The next step will be the comparison of the β -tubulin genes of BZ-resistant and -susceptible worms to show the possible involvement of the mutation in codon 200 in the mechanism of resistance.