



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och  
husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsovetenskap

# Mekanismer för resistens mot makrocycliska laktoner

*Johan Sjöstedt*

*Uppsala  
2017*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2017:67*



# Mekanismer för resistens mot makrocycliska laktoner

## Mechanisms of resistance against macrocyclic lactones

*Johan Sjöstedt*

**Handledare:** *Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Examinator:** *Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** grund nivå, G2E

**Kurstitel:** *Självständigt arbete i veterinärmedicin*

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2017

**Serienamn:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

**Delnummer i serie:** 2017:67

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** *Resistens, makrocycliska laktoner, Caenorhabditis elegans, Haemonchus contortus, Cooperia oncophora*

**Key words:** *Resistance, macrocyclic lactones, Caenorhabditis elegans, Haemonchus contortus, Cooperia oncophora*

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	3
Förkortningar.....	4
Inledning.....	5
Material och metoder.....	5
Litteraturoversikt.....	5
Makrocycliska laktoner .....	5
Nematoder .....	6
<i>Caenorhabditis elegans</i> .....	6
<i>Cooperia oncophora</i> .....	6
<i>Haemonchus contortus</i> .....	6
Glutamatreglerade kloridjonkanaler .....	6
ABC transportörer .....	7
Mekanismer för resistens.....	8
Strukturella förändringar och nedreglering av GluCl .....	8
P-glykoprotein och andra ABC transportörer .....	9
Andra mekanismer med betydelse .....	10
Diskussion .....	11
Glutamatreglerade jonkanaler.....	11
ABC transportörer .....	11
Jämförelse mellan IVM och MOX .....	12
Ytterligare diskussionspunkter .....	13
Slutsats.....	13
Litteraturförteckning .....	14



## SAMMANFATTNING

Makrocycliska laktoner (ML) är ett viktig anthelmintika som används mycket. Den utbredda användningen har lett till att nematoder har utvecklat läkemedelsresistens. För att bekämpa det måste nya metoder tas fram för att hitta genetiska markörer som på ett tidigt stadie kan identifiera resistent nematoder. Därför pågår mycket forskning om bakomliggande mekanismer för resistens mot ML hos parasiter. Syftet med det här litteraturarbetet är att ta reda på vilka mekanismer för resistens mot ML som nematoderna *Caenorhabditis elegans*, *Cooperia oncophora* och *Haemonchus contortus* har utvecklat. Jag kommer även att jämföra om det finns ett samband för hur dessa tre nematoder utvecklar resistens. *C. elegans* som är en frilevande nematod och är lätt att odla i laboriemiljö, och används därför som en modellorganism. *C. oncophora* och *H. contortus* är parasiter som infekterar nötkreatur och får och de kan inte odlas i laboriemiljö. Arbetet jämför även olika mekanismer för resistens mot ivermektin (IVM) och moxidektin (MOX) som är två olika substanser inom ML-gruppen.

ML verkar genom att binda till glutamatreglerade kloridjonkanaler (GluCl) och leder till paralyt hos nematoden genom influx av kloridjoner. GluCl är en jonkanal som finns hos nematoder och den består av fem olika subenheter som kodas av fem olika gener. Forskarna antar att GluCl är en möjlig mekanism för resistens eftersom det är en verkningsmekanism för ML. Flera studier på detta har visat att det är vissa gener som är mer relevanta som mekanism för resistens än andra. De är framför allt genen *avr-14* hos de tre nematoderna och även generna *avr-15* och *glc-1* hos *C. elegans* och *glc-5* hos *H. contortus*.

ATP-binding cassette (ABC) transportörer transporterar olika substrat över membran. Det finns många olika gener som styr ABC transportörer. Det antas att ABC transportörer är en mekanism för resistens då de pumpar ML över membranet och därigenom sänks läkemedelskoncentrationen och nematoderna klarar av behandlingen. Det har visats att ML är ett utmärkt substrat för dessa ABC transportörer. Studier visar att det är många ABC transportör-gener som har koppling till resistens genom att uppregleras vid behandling med ML.

När mekanismerna för resistens jämförs mellan nematoderna ses ett litet samband mellan *C. elegans* och *C. oncophora*, vilka delar gemensamma mutationer både på GluCl som leder till att ML inte kan binda in och utöva sin effekt. *C. elegans* och *C. oncophora* visar även en uppreglering av samma ABC transportörer. *H. contortus* däremot delar inte samma mekanismer när det kommer till GluCl. Det är svårt att jämföra vissa ABC transportörer då det inte finns lika mycket forskning inom det området hos *H. contortus*.

När IVM och MOX jämförs ser man tydligt att det är skillnad mellan dessa substanser med avseende på mekanismer för resistens. Dock är studierna som det grundar sig på gjorda på *C. elegans* och *C. oncophora* men inte *H. contortus*. Det skulle därför vara intressant om det gjordes fler studier på det.

Min slutsats är att mer forskning behövs på nematoderna och de olika substanserna inom ML-gruppen separat då det finns skillnader mellan dem. Samtidigt tycker jag att GluCl och ABC

transportörerna borde studeras gemensamt då jag tror att de båda är viktiga mekanismer och att de säkert samspelar vid resistens hos nematoder.



## SUMMARY

Macrocyclic lactones (ML) are an important anthelmintic with high usage. The high usage has led to nematodes developing drug resistance. To combat this new methods are needed to find genetic markers that can identify resistant nematodes at an early stage. Because of this a lot of research is done on the underlying mechanisms of resistance to ML in parasites. The purpose of this review is to ascertain the mechanisms of resistance against ML that *Caenorhabditis elegans*, *Cooperia oncophora* and *Haemonchus contortus* have developed. I also compare these mechanisms to ascertain if there are any connections between how the three nematodes develop resistance. *C. elegans* is a free living nematode that is easy to grow in a laboratory environment, and is therefore used as a model organism. *C. oncophora* and *H. contortus* are parasites that infect cattle and sheep and cannot be grown in a laboratory environment. This review also compares ivermectin (IVM) and moxidectin (MOX) which are substrates in the ML-group.

The mode of action of ML is through glutamate-gated chloride channels (GluCl) and leads to paralysis in the nematode through influx of chloride ions. GluCl is an ion channel found in nematodes and it consists of five different subunits encoded by five different genes. The scientists assume that GluCl is a good candidate of resistance because that is the binding site of ML. Studies have shown that there are some genes that are more relevant as a mechanism of resistance than others. These are in particular the gene *avr-14* in all three nematodes and also the genes *avr-15* and *glc-1* in *C. elegans* and *glc-5* in *H. contortus*.

ATP-binding cassette (ABC) transporters transport different substrates over membranes. There exists many different genes that control ABC transporters. It is assumed that ABC transporters are a mechanism of resistance because they pump ML across the membrane and thereby lower the drug concentration in the parasite and the nematodes survive the treatment. It has been shown that ML is an excellent substrate for these ABC-transporters. Studies show that many of the ABC transporter genes have a connection to resistance by increased expression during treatment with ML.

When the mechanisms of resistance are compared between the nematodes a small connection can be seen between *C. elegans* and *C. oncophora*. They share mutations both on GluCl and increased expression of the same ABC transporters. *H. contortus* on the other hand does not share the same mechanisms when it comes to GluCl. It is hard to compare ABC transporters because there is not as much research on some of the ABC transporters on *H. contortus*.

When IVM and MOX are compared there is a clear difference between mechanisms of resistance for these two substances. However the studies this is based on are done on *C. elegans* and *C. oncophora* but not *H. contortus*. It would therefore be interesting if more studies were done on this.

My conclusion is that we should do research on nematodes and the different substances within the ML group separately since there are differences between them. At the same time I think GluCl and ABC transporters ought to be studied collectively because I think they are both important mechanisms and they probably interact in the resistance of nematodes.

## FÖRKORTNINGAR

ABC – ATP-binding cassette

*C. elegans* – *Caenorhabditis elegans*

*C. oncophora* – *Cooperia oncophora*

GluCl – Glutamatreglerad kloridjonkanal

*H. contortus* – *Haemonchus contortus*

haf – Half transporters

IVM – Ivermektin

ML – Makrocycliska laktoner

MOX – Moxidectin

mrp – Multidrug resistance protein

NBD – Nukleotidbindande domäner

pgp – P-glykoprotein

TMD – Transmembrana domäner

## INLEDNING

Makrocycliska laktoner (ML) är en viktig substansgrupp inom anthelmintika eftersom ML har en hög effekt och brett spektrum (McCavera *et al.*, 2007). Hög användning av ML har lett till utbredd resistens hos *Haemonchus contortus* hos får och *Cooperia oncophora* hos nötkreatur (Rezansoff *et al.*, 2016; El-Abdellati *et al.*, 2011). *Parascaris equorum* och cyathostominerna hos hästar har också påvisats ha resistens (Matthews, 2014). Det har även börjat uppkomma resistens hos parasiter hos människor (Glendinning *et al.*, 2011).

Det är viktigt att behandla rätt så att resistensen inte blir värre. För att kunna behandla rätt måste man veta om parasiterna är resistent eller inte. De metoder som finns idag för att upptäcka resistens är inte tillräckligt snabba eller känsliga men det forskas på nya molekylära metoder för snabb detektion av resistent gener. För att få fram dessa metoder pågår det intensiv forskning på att förstå vilka gener som styr mekanismerna för resistens hos parasiten (El-Abdellati *et al.*, 2011; McCavera *et al.*, 2007).

Syftet med det här litteraturarbetet är att ta reda på vilka mekanismer parasiterna *C. elegans*, *C. oncophora* och *H. contortus* har utvecklat för att överleva en behandling med ML. För att se om det finns ett samband hos resistensutvecklingen kommer mekanismerna hos dessa tre nematoder att jämföras. Även olika substanser inom substansgruppen ML kommer att jämföras med avseende mekanismer för resistens. Orsaken till att endast *C. elegans*, *C. oncophora* och *H. contortus* används i det här litteraturarbetet är för att det har gjorts mest forskning på dem.

## MATERIAL OCH METODER

Databaserna Web of science, Pubmed, Scopus och Google scholar användes för att söka litteratur. Sökorden som användes var: ("macrocyclic lactones" OR ivermectin OR moxidectin) AND (nematode\* OR helminth\*) AND (resistance OR "anthelmintic resistance") AND (mechanism). Även referenslistor i reviewartiklar som hittades via sökning användes för att få fram ytterligare litteratur.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Makrocycliska laktoner

Makrocycliska laktoner (ML) är endektociner som används mot nematoder och artropoder (Reinemeyer & Courtney, 2001). ML delas in i två grupper, avermektiner och milbemyrciner. I gruppen avermektiner ingår till exempel ivermectin (IVM) och i gruppen milbemyrciner ingår till exempel moxidectin (MOX) (Ardelli *et al.*, 2009).

Glutamat som är den naturliga liganden har affinitet för  $\beta$ -subenheten på glutamatreglerade kloridjonkanaler (GluCl). ML binder till  $\alpha$ -subenheterna på GluCl. (Martin *et al.*, 2003). När ML binder till GluCl blir det ett influx av kloridjoner som orsakar hyperpolarisation i postsynaptiska nervceller, vilket gör att transmissionen av signaler stoppas. Det leder till paralyt hos nematoden. Vid tillräckligt hög koncentration binder ML även till GABA-receptorer (Reinemeyer & Courtney, 2001).

## Nematoder

### ***Caenorhabditis elegans***

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) är en frilevande nematod, den är alltså inte en parasit. Den finns i stora delar av världen. *C. elegans* bor i marken och lever där av mikrober (Edgley, 2015). Den har blivit en modellorganism då den är lätt att odla i laboratoriemiljö. Livscykeln är dessutom komplett efter tre och en halv dag. Det finns också många olika genetiska stammar tillgängliga för forskare (Janssen *et al.*, 2013).

### ***Cooperia oncophora***

*Cooperia oncophora* (*C. oncophora*) finns över hela världen och är en av de vanligaste nematoderna hos nötkreatur i Sverige (SVA, 2017; Taylor *et al.*, 2007). Värddjuren är framför allt nötkreatur men kan också vara små idisslare (Taylor *et al.*, 2007). Symptomen vid infektion med *C. oncophora* är oftast sämre tillväxt men kan vid högt smittryck även vara diarré, viktminskning och nedsatt allmäntillstånd (SVA, 2017).

### ***Haemonchus contortus***

*Haemonchus contortus* (*H. contortus*) finns i hela världen och prevalensen ökar i Sverige och ligger nu på 25 %. Får är det primära värddjuret men även getter och nötkreatur kan bli infekterade (SVA, 2016; Taylor *et al.*, 2007). Ofta är infektion med *H. contortus* subklinisk eller så är enda symptomet diarré. Anemi, ödem i käftgropen och plötsliga dödsfall är symptomen vid allvarigare sjukdom. Högräktiga tackor kan bli extra påverkade (SVA, 2016).

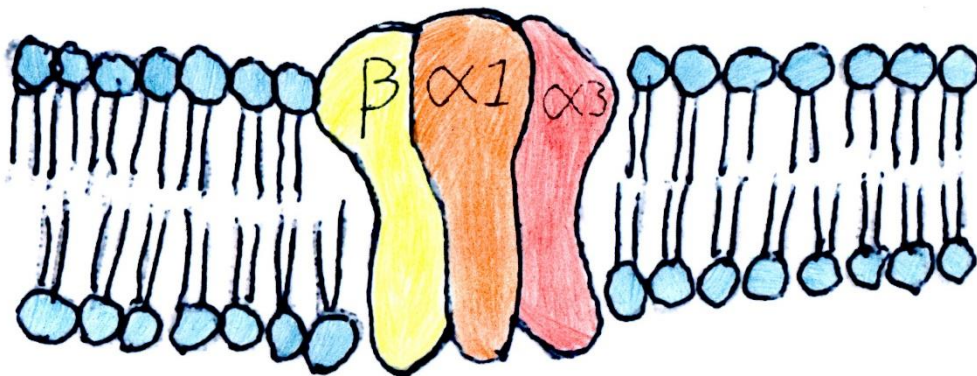
## **Glutamatreglerade kloridjonkanaler**

Glutamatreglerade jonkanaler (GluCl) finns endast hos nematoder, insekter och kräftdjur (Martin *et al.*, 2003) och återfinns i muskelceller i pharynx och i nervsystemet (Wolstenholme & Rogers, 2005). GluCl har en bred funktion då de styr rörelse, födointag och förmedlingen av sensorisk stimulans (Wolstenholme, 2012).

GluCl är väl studerat hos *C. elegans* där de fem generna *avr-14*, *avr-15*, *glc-1*, *glc-2* och *glc-3* kodar för fem subenheter i jonkanalen. De subenheterna är GluCl $\alpha$ 3, GluCl $\alpha$ 2, GluCl $\alpha$ 1, GluCl $\beta$  och GluCl $\alpha$ 4 (Cook *et al.*, 2006). Hur dessa fem subenheter bildar en jonkanal är inte helt klarlagt men det antas att fem subenheter bildar en kanal genom membranet då andra ligandreglerade jonkanaler i samma familj, som kallas Cys-loop, gör så (Se figur 1) (Wolstenholme & Rogers, 2005). GluCl kan bestå av bara  $\alpha$ -subenheter eller bara  $\beta$ -subenheter och kallas då för en homomer eller en kombination av de båda subenheterna och kallas då för en heteromer (Martin *et al.*, 2003). Det finns homologer, vilket är gener med samma ursprung hos olika organismer, till några av dessa GluCl gener hos nematoderna men det finns också betydelsefulla skillnader. Till exempel har *H. contortus* inte homologer för *avr-15* och *glc-1* men har gener som *C. elegans* inte har, nämligen *glc-5* och *glc-6*. De flesta nematoder har dock en homolog för genen *avr-14* (Se tabell 1) (Glendinning *et al.*, 2011; McCavera *et al.*, 2007; Cook *et al.*, 2006).

Tabell 1. Vilka gener hos *C. elegans*, *C. oncophora* och *H. contortus* som kodar för respektive subenheter

Subenhet	Gen		
	<i>C. elegans</i>	<i>C. oncophora</i>	<i>H. contortus</i>
GluCl $\beta$	Glc-2	Glc-2	Glc-2
GluCl $\alpha$ 1	Glc-1	-	-
GluCl $\alpha$ 2	Avr-15	-	-
GluCl $\alpha$ 3	Avr-14	Avr-14	Avr-14
GluCl $\alpha$ 4	Glc-3	-	-
-	-	-	Glc-5
-	-	-	Glc-6



Figur 1. Exempel på hur GluCl kan se ut, tre av fem subenheter syns ( $\beta$ ,  $\alpha$ 1 och  $\alpha$ 2).

### ABC transportörer

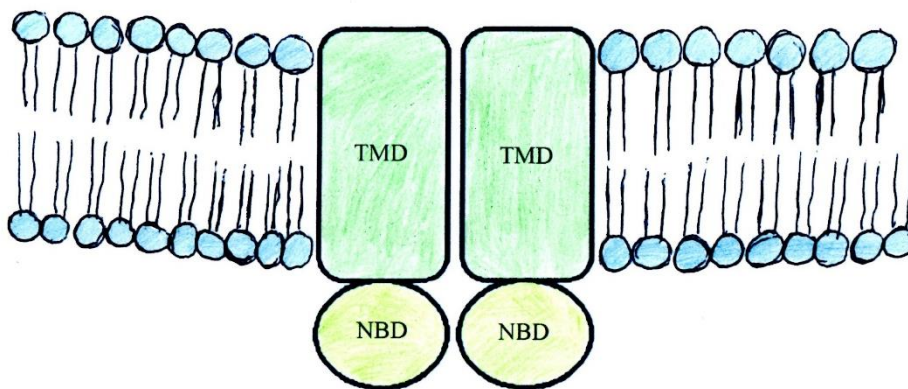
ATP-binding cassette (ABC) transportörer är proteiner som sitter i lipidmembran och transporterar många olika substrat. Det finns två olika typer av ABC transportörer, de som importerar substrat och de som exporterar substrat. Eukaryoter har endast de som exporterar substrat. ABC transportörer består av två nukleotidbindande domäner (NBD) och två transmembrana domäner (TMD) (Se figur 2). ATP binder till NBD och förändrar utseendet på TMD. Det gör så att substratet antingen kan binda eller inte kan binda till ABC transportören (Hollenstein *et al.*, 2007).

*C. elegans* har många gener som kodar för olika ABC transportörer. Det finns 15 p-glykoprotein (pgp), 8 multidrug resistance protein (mrp) och 9 half transporters (haf) (Sheps *et al.*, 2004). Hos *C. oncophora* har man hittat vissa homologer till de gener som *C. elegans* har. Hittills har det hittats sju homologer till pgp-gener (pgp-1, pgp-2, pgp-3, pgp-9, pgp-11, pgp-12 och pgp-16) (De Graef *et al.*, 2013). De Graef *et al.* (2013) studerade ABC-gener hos *C. oncophora* och fann 5 haf-gener (haf-2, haf-3, haf-4, haf-7 och haf-9) och 3 mrp-gener (mrp-1, mrp-4 och mrp-7). Även *H. contortus* har visats ha homologer till ABC-gener hos *C. elegans*. Det finns nio homologer till pgp-gener. De är pgp-1, pgp-2, pgp-3, pgp-4, pgp-9, pgp-10, pgp-11, pgp-12 och

pgp-14 (Williamson & Wolstenholme, 2012). Dock har *H. contortus* endast en homolog till haf och två till mrp som har hittats (Se tabell 2) (Lespine *et al.*, 2008).

Tabell 2. Vilka ABC transportör-gener som är identifierade hos *C. elegans*, *C. oncophora* och *H. contortus*

ABC transportör	Gen		
	<i>C. elegans</i>	<i>C. oncophora</i>	<i>H. contortus</i>
pgp	1-15	1, 2, 3, 9, 11, 12, 16	1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 14
mrp	1-8	1, 4, 7	2 st (ej namn)
haf	1-9	2, 3, 4, 7, 9	1 st (ej namn)



Figur 2. Exempel på hur ABC-transportörer kan se ut med NBD intracellulärt.

## Mekanismer för resistens

### Strukturella förändringar och nedreglering av GluCl

Då GluCl är den receptor som ML verkar genom har forskarna antagit att strukturella förändringar och nedreglering av dem skulle kunna vara en mekanism för resistens hos nematoderna (Glendinning *et al.*, 2011; Njue *et al.*, 2004).

Dent *et al.* (2000) visar att det måste ske mutationer i de tre generna *avr-14*, *avr-15* och *glc-1* för att det ska bildas hög resistens mot ML men att det räcker med två av de tre för att det ska bli låg till måttlig resistens. Studien är utförd på *C. elegans* i laboriemiljö. Det visade sig att *C. elegans* klarar av att överleva i laboriemiljö med dessa mutationer men klarar sig inte i sin naturliga miljö (McCavera *et al.*, 2007). Ytterligare en studie av Ardelli *et al.* (2009) styrkte att mutationer i generna *avr-14*, *avr-15* och *glc-1* var av betydelse för resistens mot IVM, men de visade också att det var skillnad i resistensmekanismen mellan IVM och MOX. För resistens mot MOX var mutation i genen *glc-2* mer relevant. En annan studie har kommit fram till att det räcker med en mutation i *glc-1* (deletion av fyra aminosyror) som leder till en funktionslös subenhet för att få resistens mot IVM (Ghosh *et al.*, 2012).

Njue *et al.* (2004) visar att avr-14 (GluCl $\alpha$ 3) även har betydelse för resistens mot IVM och MOX hos *C. oncophora*. En mutation gör att det sker ett byte av aminosyror från leucin till fenylalanin (L256F) vilket gör att bindningen mellan IVM/MOX och receptor blir sämre. Om det är en direkt eller indirekt påverkan är oklart. Samma studie kom också fram till att MOX binder bättre än IVM till den resistenta receptorn. MOX binder lika bra till den resistenta receptorn som IVM binder till den känsliga receptorn. En annan studie av El-Abdellati *et al.* (2011) hittade däremot inte denna mutation hos *C. oncophora*. De såg dock att *C. oncophora* hade en selektionspress på den genen då allel-diversiteten var förminskad hos resistenta stammar. Det betyder att det finns tecken på att L265F mutationen snart kan finnas även hos dessa stammar. Den studien fann istället en skillnad i genuttryck hos de olika subenheterna. Subenheten som genen avr-14 kodar för var nedreglerad och subenheten som genen glc-2 kodar för var uppregerad. De observerade skillnaderna i genuttryck kan leda till förändringar som påverkar känsligheten för IVM.

McCavera *et al.* (2009) studerade L256F mutationen i subenhet GluCl $\alpha$ 3 (avr-14) hos *H. contortus*. Författarna kom fram till att IVM har dålig affinitet till GluCl $\alpha$ 3 med mutationen, vilket kan vara en möjlig förklaring till resistens. De testade även att byta ut leucin mot andra aromatiska aminosyror och fick då samma resultat. De studerade även mutationen T300S, där treonin byts ut till serin. Det bytet ledde till att det inte bildades en funktionell jonkanal.

En annan gen som påverkar strukturen på GluCl hos *H. contortus* är glc-5 (Beech *et al.*, 2010). Studien undersökte dock inte hur förändringarna ser ut. Även Williamson *et al.* (2011) visar att glc-5 har en roll i resistens då de såg att genen var nedreglerad hos resistenta *H. contortus*. Studien visade dock inte någon skillnad strukturellt mellan resistenta och känsliga stammar. De visade även att glc-3 skulle kunna vara viktig då även den nedreglerades. Williamson *et al.* (2011) kom dock fram till att det inte fanns en ökning av uttryck av avr-14 hos resistenta *H. contortus*.

Rezansoff *et al.* (2016) har gjort en studie med backcross experiment där man studerade flödet av gener mellan generationer. De kollade på en mikrosatellit och sex gener som tidigare artiklar har tagit fram som kandidater för resistens mot ML hos *H. contortus*. De fann att generna avr-14 och glc-5 hos *H. contortus* inte var signifikanta vid resistens mot ML. Studien kom fram till att genmarkören mikrosatelliten Hcms8a20 var kopplat till resistens hos *H. contortus* (Rezansoff *et al.*, 2016). Hcms8a20 kan studeras noggrannare för att hitta specifika mutationer som kan vara kopplade till resistens (Redman *et al.*, 2012).

### ***P-glykoprotein och andra ABC transportörer***

Flera studier visar att pgp har stor påverkan på känslighet för ML. Pgp är nematodens sätt att göra sig av med toxiska substanser. Då det är visat att ML binder till pgp förmodar forskarna att detta skulle vara en mekanism för resistens hos nematoder (Raza *et al.*, 2015; AlGusbi *et al.*, 2014; Janssen *et al.*, 2013).

James and Davey (2009) studerade bara pgp-1 och pgp-2 och mrp-1, mrp-2, mrp-5 och mrp-6 i sin studie. De visade att hos resistenta *C. elegans* uttrycktes högre del pgp-1, mrp-1 och mrp-6. Yan *et al.* (2012) styrker de fynden och visar dessutom på att det uttrycks högre del pgp-4,

pgp-12, pgp-14, mrp-4, mrp-5, mrp-7, haf-1, haf-2 och haf-3. De drar dock slutsatsen att mrp-1 och haf-2 skulle ha mest påverkan. En annan studie studerade alla 15 pgp-gener hos *C. elegans* (Ardelli & Prichard, 2013). Den studien visade att inaktivering av pgp-2, pgp-5, pgp-6, pgp-12 och pgp-13 ledde till ökad känslighet för IVM. Janssen *et al.* (2013) visade i sin studie att *C. elegans* med icke fungerande pgp-1, pgp-3, pgp-8, pgp-9, pgp-11, pgp-12, pgp-14 och pgp-15 blev känsligare mot IVM men speciellt de med icke funktionellt pgp-11 och pgp-14. Till skillnad från de andra studierna använder den här studien flytande agar istället för fast. Författarna argumenterar att det skulle vara bättre då IVM är utblandat ordentligt. De använde även fler maskar för experimentet vilket de tycker ger en bättre relevans (Janssen *et al.*, 2013).

En studie har jämfört uttryck av pgp-gener hos *C. elegans* mellan IVM-behandling och MOX-behandling. Efter behandling med IVM i två och en halv timmar ökade uttrycket av pgp-4, pgp-7, pgp-11, pgp-14 och pgp-15 och efter behandling av MOX under samma tid ökade uttrycket av pgp-1, pgp-5, pgp-6, pgp-12, pgp-14 och pgp-15. Över hela experimentets gång uttrycktes pgp-4, pgp-7, pgp-11, pgp-13 högre endast vid behandling av IVM och pgp-6 uttrycktes högre endast vid behandling av MOX (Bygarski *et al.*, 2014).

Studier på *C. onchophora* av De Graef *et al.* (2013) visade att pgp-11 uppreglades hos vuxna maskar vid behandling av både IVM och MOX, medan pgp-12 uppreglerades vid behandling av MOX men inte IVM. De visade också att mrp-1 och pgp-11 var uppreglerade hos L3 som var resistenta. Ytterligare en studie styrker att mrp-1 var uppreglerat hos resistenta individer och påvisade att även pgp-16 var relevant (Tyden *et al.*, 2014). Det finns även studier som har undersökt pgp-2, pgp-3 och pgp-9. Dessa tre är troligtvis inte relevanta för resistensbildning (Areskog *et al.*, 2013; Demeler *et al.*, 2013).

Hos *H. contortus* har pgp också en roll. Williamson *et al.* (2011) såg att det uttrycktes högre andel pgp-2 och pgp-9 hos resistenta stammar, vilket stämmer överens med tidigare publikationer (Blackhall *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998). De såg dock att pgp-1 uttrycktes mindre hos resistenta stammar. Även Rezansoff *et al.* (2016) studerade pgp-2 och pgp-9 hos *H. contortus*. De kom fram till att pgp-2 kunde ha en inverkan hos en av stammarna som användes i studien. De såg dock inte att pgp-9 skulle ha någon relevans för resistens.

### **Andra mekanismer med betydelse**

Hos *C. elegans* är *unc-7* och *unc-9* gener som kodar för innexiner. Innexiner är subenheter som bygger upp gap junctions. Dessa gap junctions finns i interneuron mellan pharyngeala och extrapharyngeala neuron. Författarna tror att dessa gap junctions gör att hyperpolarisationen från IVM kan ta sig till celler som inte har GluCl och gör att effekten av IVM blir bredare. Mutationen i dessa gener skulle göra att hyperpolarisationen inte sprids lika mycket och att det då skulle bli en sämre effekt av IVM (Dent *et al.*, 2000).

Osm-1 är en Dye filling defective (Dyf)-gen som visats ha effekt på resistensbildning hos *C. elegans*. Dyf-gener med mutationer gör att fluorescerande färg inte kan tas upp via amphid sensory neurons, därför tror författarna att permeabiliteten för IVM minskar hos masken (Dent *et al.*, 2000). *Unc-7*, *unc-9* och *osm-1* ger i samverkan med *avr-14* och *avr-15* en högre resistens. Urdaneta-Marquez *et al.* (2014) visade i sin studie att *dyf-7* hos *H. contortus* och *C. elegans* är



en del av resistensbildningen mot ML. Dock hittade Rezansoff *et al.* (2016) ingen koppling mellan Hco-dyf-7, som är dyf-7 genen hos *H. contortus*, och resistens.

## DISKUSSION

### Glutamatreglerade jonkanaler

Ett syfte med den här litteraturstudien var att jämföra olika mekanismer för GluCl hos de tre nematoderna. Det är tydligt att genen *avr-14*, som kodar för en subenhet i GluCl, är involverad i resistens hos *C. elegans* och *C. oncophora* (Njue *et al.*, 2004; Dent *et al.*, 2000). Det finns även en studie som visar att *avr-14* är en del av resistensen hos *H. contortus* (McCavera *et al.*, 2009). En förklaring till resistens är en mutation i *avr-14* som leder till att leucin byts ut mot fenylalanin (L256F) och därmed förhindrar att ML kan binda till receptorn och utöva sin effekt. Det verkar vara samma mutation, L256F, som ligger bakom det hos *C. oncophora* och *H. contortus* (McCavera *et al.*, 2009; Njue *et al.*, 2004). Detta är ganska förväntat då *avr-14* är en gen som utvecklades tidigt i evolutionen och alla tre nematoderna har den genen (McCavera *et al.*, 2007).

För *C. elegans* och *C. oncophora* är det flera studier som visar att genen *avr-14* är viktig för resistens (El-Abdellati *et al.*, 2011; Ardelli *et al.*, 2009; Njue *et al.*, 2004; Dent *et al.*, 2000). Men hos *H. contortus* är forskarna inte lika överens. Det finns en studie som styrker att genen *avr-14* är orsaken till resistens (McCavera *et al.*, 2009) och två studier som visar att *avr-14* inte är orsaken till resistens (Rezansoff *et al.*, 2016; Williamson *et al.*, 2011). Dock spekulerar Rezansoff *et al.* (2016) att det är olika stammar och att det kan vara så att det är skillnader även mellan olika stammar i samma art. Författarna tror dock att genen *avr-14* inte har med resistens att göra (Rezansoff *et al.*, 2016). Det kan tyda på att genen *avr-14* inte spelar en lika stor roll för resistens hos *H. contortus* som hos de andra två nematoderna.

### ABC transportörer

Det finns många gener som kodar för ABC transportörer och de flesta uppregleras vid resistens. *C. elegans* och *C. oncophora* har några gemensamma ABC transportörer som kan förklara resistens mot ML. Både *C. elegans* och *C. oncophora* har visat ett uppreglerat genuttryck för ABC transportörerna *mrp-1*, *pgp-11* och *pgp-12* hos resistent stammar (Bygarski *et al.*, 2014; Tyden *et al.*, 2014; Ardelli & Prichard, 2013; De Graef *et al.*, 2013; Janssen *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2012; James & Davey, 2009). I studier på *C. elegans* ökar antingen uttrycket av *pgp-1* (Bygarski *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2012; James & Davey, 2009) eller så är stammar med inaktiverad *pgp-1* känsligare för ML (Janssen *et al.*, 2013). Hos resistent *C. oncophora* är *pgp-1* inte uppreglerad (De Graef *et al.*, 2013).

I studier på *H. contortus* ser man istället minskat uttryck av *pgp-1* i resistent stammar. De ABC transportörer som uttrycks hos resistent *H. contortus* är *pgp-2* och *pgp-9* (Williamson *et al.*, 2011). Hos *C. oncophora* är *pgp-9* inte kopplad till resistens (Areskog *et al.*, 2013) och De Graef *et al.* (2013) såg ingen ökning av uttryck av *pgp-2* hos resistent *C. oncophora*. Hos *C. elegans* är *pgp-2* och *pgp-9* endast uppreglerade i en studie vardera (Ardelli & Prichard, 2013; Janssen *et al.*, 2013). I kontrast har andra ABC transportör-gener visats vara uppreglerade i flera

studier på *C. elegans* (Bygarski *et al.*, 2014; Ardelli & Prichard, 2013; Janssen *et al.*, 2013; James & Davey, 2009).

Hos *H. contortus* har forskarna hittat två homologer till mrp (Lespine *et al.*, 2008). Dock finns det inga studier som har visat om dessa två mrp är involverade i resistens. Det skulle kunna vara möjligt att även mrp, speciellt då mrp-1, hos *H. contortus* också spelar roll vid resistens mot ML. Det skulle därför vara intressant om det både hittades fler homologer och om det skulle komma mer studier på mrp hos *H. contortus*.

## Jämförelse mellan IVM och MOX

Det finns tydliga skillnader mellan IVM- och MOX-resistens. Ardelli *et al.* (2009) visar att avr-14, avr-15 och glc-1 är viktiga mekanismer vid IVM-resistens men att glc-2 är viktig vid MOX-resistens. Det är intressant då glc-2 är den gen som kodar för GluCl $\beta$ , som är den subenhet som den naturliga liganden glutamat har affinitet för (Cook *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2003). Detta ställer frågan vilken affinitet MOX har för GluCl $\beta$  respektive GluCl $\alpha$ . Idag tror man nämligen att ML verkar genom GluCl $\alpha$  (Martin *et al.*, 2003).

Njue *et al.* (2004) studerade endast genen avr-14, och såg att MOX hade högre affinitet till GluCl hos resistent *C. onchophora* jämfört med IVM. Dock var det svårare för MOX att binda till GluCl hos resistent maskar än GluCl hos känsliga maskar. Det borde tyda på att MOX-resistens styrs av andra mekanismer än IVM. Om det var samma mekanismer skulle det vara lika stor resistens hos MOX som hos IVM. Det skulle kunna förklaras av att MOX och IVM binder till olika ställen på GluCl. Det behövs mer forskning om hur IVM och MOX binder till GluCl, eftersom det är en viktig komponent för att förstå både verkningsmekanism och mekanismer för resistens.

Även olika pgg-gener uttrycks mer vid IVM- och MOX-resistens (Bygarski *et al.*, 2014). Författarna visade att det fanns likheter och skillnader mellan mekanismer mot IVM och MOX hos *C. elegans*. Både pgg-14 och pgg-15 uttrycktes mer vid behandling av både IVM och MOX, medan pgg-4, pgg-7, pgg-11 och pgg-13 generna uttrycktes mer vid IVM-behandling men inte vid MOX-behandling. Generna som kodar för pgg-6 uttrycktes mer vid MOX-behandling men inte vid IVM-behandling (Bygarski *et al.*, 2014). De Graef *et al.* (2013) studerade skillnad på IVM och MOX på *C. onchophora*. De kom fram till att pgg-11 uppreglerades vid behandling av båda substanserna, medan pgg-12 endast uppreglerades vid behandling av MOX. Båda dessa studier har endast studerat pgg-gener. Det skulle vara intressant att se skillnader mellan IVM och MOX på andra ABC-transportörer. Dessa studier omfattar endast *C. elegans* och *C. onchophora* och det skulle därför vara bra om det gjordes studier på skillnaden mellan IVM och MOX på fler nematoder.

Jag tycker det är viktigt att man fortsätter att forska på både IVM och MOX i framtiden då man kan se att det är olika mekanismer som styr IVM- och MOX-resistens. Om man bara forskar på IVM, vilket verkar vara det som görs då många av artiklarna i det här arbetet är gjorda på IVM, får man inte med de mekanismer som styr MOX-resistens och därmed får man inte hela bilden av ML-resistens. Det kan även vara bra att studera andra substanser i substansgruppen ML då även de kan ha olika mekanismer som styr resistens.

## Ytterligare diskussionspunkter

*C. elegans* är en modellorganism som man använder mycket i forskningen om mekanismer för resistens (Janssen *et al.*, 2013). Frågan är hur bra den är som modellorganism då jag har sett i mina jämförelser att det inte finns så mycket gemensamt när det kommer till mekanismer för resistens mellan de tre nematoderna. Det betyder att studier borde göras på varje nematod för sig då det är svårt att dra slutsatser om andra nematoder när de inte är så jämförbara som man kanske tänker sig.

Ytterligare en punkt som har med vilka nematoder som används är hur de parasitära nematodstammarna hålls vid liv. För att föröka sig måste de gå genom levande djur, till exempel *C. oncophora* genom kalvar (De Graef *et al.*, 2013). Det blir inte lika kontrollerat som in vitro studier på *C. elegans*. Det kan vara ett argument för att använda *C. elegans* när man studerar mekanismer för resistens.

I de publikationer som har använts i det här litteraturarbetet ha endast polymorfism i en gen, alltså olika former av genen i populationen, studerats. Det skulle kunna vara så att resistens mot ML är polygenetiskt, alltså att det är flera gener som samverkar (McCavera *et al.*, 2007). Forskarna delar även upp mekanismerna i GluCl och ABC transportörer. Även i de studier som studerar både GluCl och ABC transportörer diskuterar författarna inte om det skulle kunna vara ett samspel av dessa mekanismer som leder till resistens. Jag tror att båda dessa mekanismer är viktiga och att det kan vara ett samspel mellan dem.

## Slutsats

När man jämför *C. elegans* och *C. oncophora* verkar det finnas ett litet samband mellan mekanismer för resistens. Speciellt när GluCl jämförs, där avr-14 har visats vara en del av resistensen hos båda nematoderna. Även när ABC transportörer jämförs ser man samband mellan *C. elegans* och *C. oncophora*, då generna mrp-1, pgp-11 och pgp-12 uttrycks högre hos båda. *H. contortus* verkar ha en annan molekylär förklaring till resistens. Dock saknas det mycket grundforskning, till exempel vilka gener som finns hos de olika nematoderna och verkningsmekanismen för ML. Detta gör att det fanns vissa svårigheter när jag gjorde min jämförelse. Det behövs mer forskning på fler ABC-transportörer än pgp för att ge en bredare bild av hur resistens uppstår. Det är tydligt att det finns skillnader mellan IVM och MOX. Detta måste tas i åtanke när man fortsätter att forska på resistens mot ML i stort och det måste forskas mer specifikt på det området. Jag tror att både GluCl och ABC transportörer är viktiga mekanismer för resistens hos nematoder.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- AlGusbi, S., Krucken, J., Ramunke, S., von Samson-Himmelstjerna, G. & Demeler, J. (2014). Analysis of putative inhibitors of anthelmintic resistance mechanisms in cattle gastrointestinal nematodes. *Int J Parasitol*, 44(9), ss. 647-658.
- Ardelli, B.F. & Prichard, R.K. (2013). Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Veterinary Parasitology*, 191(3-4), ss. 264-275.
- Ardelli, B.F., Stitt, L.E., Tompkins, J.B. & Prichard, R.K. (2009). A comparison of the effects of ivermectin and moxidectin on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), ss. 96-108.
- Areskog, M., Engstrom, A., Tallkvist, J., von Samson-Himmelstjerna, G. & Hoglund, J. (2013). PGP expression in *Cooperia oncophora* before and after ivermectin selection. *Parasitology Research*, 112(8), ss. 3005-3012.
- Beech, R., Levitt, N., Cambos, M., Zhou, S.F. & Forrester, S.G. (2010). Association of ion-channel genotype and macrocyclic lactone sensitivity traits in *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 171(2), ss. 74-80.
- 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*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 95(2), ss. 193-201.
- Bygarski, E.E., Prichard, R.K. & Ardelli, B.F. (2014). Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance*, 4(3), ss. 143-151.
- Cook, A., Aptel, N., Portillo, V., Siney, E., Sihota, R., Holden-Dye, L. & Wolstenholme, A. (2006). *Caenorhabditis elegans* ivermectin receptors regulate locomotor behaviour and are functional orthologues of *Haemonchus contortus* receptors. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 147(1), ss. 118-125.
- De Graef, J., Demeler, J., Skuce, P., Mitreva, M., Von Samson-Himmelstjerna, G., Vercruysse, J., Claerebout, E. & Geldhof, P. (2013). Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant *Cooperia oncophora* isolate following in vivo and in vitro exposure to macrocyclic lactones. *Parasitology*, 140(4), ss. 499-508.
- Demeler, J., Krucken, J., AlGusbi, S., Ramunke, S., De Graef, J., Kerboeuf, D., Geldhof, P., Pomroy, W.E. & von Samson-Himmelstjerna, G. (2013). Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 188(1), ss. 10-19.
- Dent, J.A., Smith, M.M., Vassilatis, D.K. & Avery, L. (2000). The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), ss. 2674-2679.
- Edgley, M. (2015-02-20). What is *C. elegans*? Tillgänglig: <https://cbs.umn.edu/cgc/what-c-elegans> [2017-03-02].
- El-Abdellati, A., De Graef, J., Van Zeveren, A., Donnan, A., Skuce, P., Walsh, T., Wolstenholme, A., Tait, A., Vercruysse, J., Claerebout, E. & Geldhof, P. (2011). Altered avr-14B gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi*. *Int J Parasitol*, 41(9), ss. 951-957.
- Ghosh, R., Andersen, E.C., Shapiro, J.A., Gerke, J.P. & Kruglyak, L. (2012). Natural Variation in a Chloride Channel Subunit Confers Avermectin Resistance in *C. elegans*. *Science*, 335(6068), ss. 574-578.
- Glendinning, S.K., Buckingham, S.D., Sattelle, D.B., Wonnacott, S. & Wolstenholme, A.J. (2011). Glutamate-Gated Chloride Channels of *Haemonchus contortus* Restore Drug Sensitivity to Ivermectin Resistant *Caenorhabditis elegans*. *Plos One*, 6(7).

- Hollenstein, K., Dawson, R.J.P. & Locher, K.P. (2007). Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(4), ss. 412-418.
- James, C.E. & Davey, M.W. (2009). Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol*, 39(2), ss. 213-220.
- Janssen, I.J.I., Krucken, J., Demeler, J. & von Samson-Himmelstjerna, G. (2013). *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains. *Experimental Parasitology*, 134(2), ss. 171-177.
- Lespine, A., Alvinerie, M., Vercruyse, J., Prichard, R.K. & Geldhof, P. (2008). ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends in Parasitology*, 24(7), ss. 293-298.
- Martin, R.J., Robertson, A.P. & Wolstenholme, A.J. (2003). Mode of Action of the Macrocyclic Lactones. I: Vercruyse, J. & Rew, R.S. (red.) *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. Wallingford: CABI Publishing, s. 127.
- Matthews, J.B. (2014). Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance*, 4(3), ss. 310-315.
- McCavera, S., Rogers, A.T., Yates, D.M., Woods, D.J. & Wolstenholme, A.J. (2009). An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular Pharmacology*, 75(6), ss. 1347-1355.
- McCavera, S., Walsh, T.K. & Wolstenholme, A.J. (2007). Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. *Parasitology*, 134, ss. 1111-1121.
- Njue, A.I., Hayashi, J., Kinne, L., Feng, X.-P. & Prichard, R.K. (2004). Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel  $\alpha 3$  and  $\beta$  subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *Journal of Neurochemistry*, 89(5), ss. 1137-1147.
- Raza, A., Kopp, S.R., Jabbar, A. & Kotze, A.C. (2015). Effects of third generation P-glycoprotein inhibitors on the sensitivity of drug-resistant and -susceptible isolates of *Haemonchus contortus* to anthelmintics in vitro. *Veterinary Parasitology*, 211(1-2), ss. 80-88.
- Redman, E., Sargison, N., Whitelaw, F., Jackson, F., Morrison, A., Bartley, D.J. & Gilleard, J.S. (2012). Introgression of Ivermectin Resistance Genes into a Susceptible *Haemonchus contortus* Strain by Multiple Backcrossing. *Plos Pathogens*, 8(2), s. e1002534.
- Reinemeyer, C.R. & Courtney, C.H. (2001). *Chemotherapy of Parasitic Diseases. I: Adams, H.R. (red.) Veterinary Pharmaceuticals and Therapeutics. 8 uppl. Ames: Iowa State University Press, s. 963.*
- Rezansoff, A.M., Laing, R. & Gilleard, J.S. (2016). Evidence from two independent backcross experiments supports genetic linkage of microsatellite Hcms8a20, but not other candidate loci, to a major ivermectin resistance locus in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol*, 46(10), ss. 653-661.
- Sheps, J.A., Ralph, S., Zhao, Z.Y., Baillie, D.L. & Ling, V. (2004). The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biology*, 5(3), s. 17.
- SVA (2016-02-25). Parasitsjukdomar hos får. Tillgänglig: <http://www.sva.se/djurhalsa/far/endemiska-sjukdomar-hos-far/parasitsjukdomar-far?lid=33878> [2017-03-02].
- SVA (2017-01-09). Magtarmparasiter hos nötkreatur-betessmitta. Tillgänglig: <http://www.sva.se/djurhalsa/notkreatur/endemiska-sjukdomar-notkreatur/parasitsjukdomar-notkreatur/magtarmparasiter-pa-bete-notkreatur> [2017-03-02].
- Taylor, M.A., Coop, R.L. & Wall, R.L. (2007). *Veterinary Parasitology. 3 uppl. Oxford: Blackwell Publishing.*

- Tyden, E., Skarin, M. & Hoglund, J. (2014). Gene expression of ABC transporters in *Cooperia oncophora* after field and laboratory selection with macrocyclic lactones. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 198(2), ss. 66-70.
- Urdaneta-Marquez, L., Bae, S.H., Janukavicius, P., Beech, R., Dent, J. & Prichard, R. (2014). A *dyf-7* haplotype causes sensory neuron defects and is associated with macrocyclic lactone resistance worldwide in the nematode parasite *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol*, 44(14), ss. 1063-1071.
- Williamson, S.M., Storey, B., Howell, S., Harper, K.M., Kaplan, R.M. & Wolstenholme, A.J. (2011). Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 180(2), ss. 99-105.
- Williamson, S.M. & Wolstenholme, A.J. (2012). P-glycoproteins of *Haemonchus contortus*: development of real-time PCR assays for gene expression studies. *Journal of Helminthology*, 86(2), ss. 202-208.
- Wolstenholme, A.J. (2012). Glutamate-gated chloride channels. *J Biol Chem*, 287(48), ss. 40232-8.
- Wolstenholme, A.J. & Rogers, A.T. (2005). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 131, ss. S85-S95.
- 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(2), ss. 327-335.
- Yan, R., Urdaneta-Marquez, L., Keller, K., James, C.E., Davey, M.W. & Prichard, R.K. (2012). The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Veterinary Parasitology*, 190(3-4), ss. 519-529.