

PREVALENTIE VAN DE *ABCB1* MUTATIE IN DE DIERGENEESKUNDIGE PRAKTIJK: TO TEST OR NOT TO TEST?

Aantal woorden: 17066

Iris Casselman

Studentennummer: 01707469

Promotor: Prof. dr. Bart Broeckx

Promotor: dr. Evy Beckers

Promotor: Frédérique Boeykens

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de
diergeneeskunde

Academiejaar: 2022 – 2023

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

Voorwoord

Eerst en vooral zou ik mijn promotor prof. dr. Bart Broeckx willen bedanken – doorheen het ganse proces dat bij deze masterthesis hoort, werd een excellente begeleiding aangeboden. Alsook zou ik graag dr. Evy Beckers, mijn co-promotor, willen bedanken. Zowel bij het schrijfproces en aflijning van het onderwerp als bij het praktisch uitvoeren van het onderzoek werd alle nodige assistentie verleend. Na het afronden van dr. Evy Beckers' doctoraat heeft Frédérique Boeykens de rol van dr. Evy Beckers als co-promotor op zich genomen. In het laatste stadium van de masterthesis bood Frédérique een helpende hand om de thesis tot een mooi geheel te vormen. Verder zou ik prof. dr. Sylvie Daminet en prof. dr. Dominique Paepe willen bedanken, beiden verzorgden de efficiënte aanvoer van stalen uit de kliniek kleine huisdieren. Bijkomend zou ik de laboranten Liz Leemans en Elody Andres Gutierrez in de bloemetjes willen zetten voor het bijhouden van de stalen nodig voor deze studie. Een laatste appreciatie zou ik willen uiten voor mijn mama en zussen die de thesis meerdere malen hebben nagelezen en de nodige feedback hebben gegeven.

Inhoudsopgave

Samenvatting	6
Abstract	6
Literatuurstudie	7
1. Bloed-hersenbarrière	7
1.1. <i>Functie</i>	8
1.2. <i>Anatomie</i>	8
1.3. <i>Transport</i>	9
1.3.1. Passieve diffusie	10
1.3.2. Solute carriers	10
1.3.3. ATP-afhankelijke cassette transporters	11
1.3.4. Transcytose	13
1.3.5. Transmigratie van cellen doorheen de bloed-hersenbarrière	13
1.4. <i>Disfunctie van de bloed-hersenbarrière</i>	14
2. Mutatie	16
3. Populatieverdeling	18
4. Belang in de diergeneeskunde	19
5. Over de species heen	21
Probleemstelling en doelstelling	24
Materiaal en methode	25
<i>Bepaling van de steekproefgrootte</i>	25
<i>Staalname</i>	25
<i>DNA-extractie</i>	25
<i>DNA-testen</i>	26
Polymerase chain reaction (PCR)	26
Kwantitatieve PCR (qPCR)	28
Sanger sequencer	30
Resultaten	32
Discussie	33
Conclusie	38
Bibliografie	
Appendix	

Afkorting

Aβ	Amyloid beta-peptide
ABC	ATP-binding cassette
ACE	Angiotensineconverterend enzyme
AD	De ziekte van Alzheimer
Aqp4	Aquaporine 4
ATP	Adenosinetrifosfaat
AZn	Aminozuren
BCRP	Breast cancer resistance protein
BCSVB	Bloed-cerebrospinaal vocht barrière
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BHB	Bloed-hersenbarrière
°C	Graden Celcius
CSV	Cerebrospinaalvocht
CYP	Cytochroom P
CZS	Centraal zenuwstelsel
Da	Dalton
ddNTPs	Dideoxynucleotiden
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
dNTP's	Deoxynucleotiden
EthBr	Ethidium bromide
γ-GT	Gamma-glutamyltransferase
GABA	Gamma-aminoboterzuur
GSH	Glutathion
IBD	Identical by descent
IBS	Identical by state
(K)bp	(Kilo)basenpaar
Kir	Inwardly rectifying potassium
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	Low-density lipoprotein receptor related protein
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MDR1	Multidrug Resistance Proteïne 1
MLn	Macrocyclische lactonen
mRNA	Messenger RNA
MRP1	Multidrug Resistance Proteïne 1
MRPs	Multidrug Resistance-associated Proteïnes
MS	Multiple sclerose
NBDn	Nucleotide bindende domeinen
NSAID	Niet-steroidale ontstekingsremmer
P-gp	P-glycoproteïne
PCR	Polymerase chain reaction
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
ROS	Reactive oxygen species
SBP	Substraat bindend proteïne
siRNA	Klein interfererend RNA/small interfering RNA
SLCs	Solute carriers
SNP	Single nucleotide polymorfismen
TGF-β	Transforming growth factor bèta
TMDn	Transmembrane domeinen
(TN)AF	(weefsel non-specifiek) Alkalisch fosfatase
TPMT	Thiopurine methyltransferase
tRNA	Transfer RNA
Uv	Ultraviolet
vt	Variant type
wt	Wild type
ZO	Zonula occludens

Samenvatting

Een 4-bp deletiemutatie in het *ABCB1*-gen – vroeger multidrug-resistentie gen – resulteert in de vorming van een onvolledig P-glycoproteïne (P-gp). P-gp kent een belangrijke functie in het lichaam als effluxpomp. Op een verscheidenheid aan locaties is de pomp terug te vinden in het lichaam – het darmepitheel, de hepatocyten, het epitheel in de nier en de endotheelcellen in de bloed-hersenbarrière. De voornaamste functie van P-gp bestaat uit bescherming van het lichaam tegenover diverse stoffen, zoals endo- en exotoxines. Bij de collie-achtigen is de 4-bp deletiemutatie goed beschreven. Na toediening van P-gp substraten, zoals ivermectine en loperamide, treden bij homozygoot variant type dieren neurologische symptomen op. In fysiologische omstandigheden verhindert het P-gp de accumulatie van deze geneesmiddelen in de hersenen. Bij dieren met een afunctionele effluxpomp treedt dit beschermingsmechanisme buiten werking en blijven geneesmiddelen in het centraal zenuwstelsel aanwezig met alle gevolgen van dien. Klinische tekens bestaan uit ataxie, lethargie en in ernstige gevallen zelf sterfte. Wegens een gebrek aan een effectief antidotum tegen de overgevoeligheidsreactie is behoedzaam gebruik van P-gp substraten bij ‘hoogrisicorassen’ een belangrijke maatregel. Naast de hond worden mutaties in het *ABCB1*-gen eveneens bij andere soorten beschreven. Het doel van deze thesis was het risico blootleggen dat gepaard gaat met het gebruik van geneesmiddelen die substraten zijn van P-gp in de alledaagse populatie praktijkhonden. Aan de hand van biomoleculaire technieken, uitgevoerd op restbloedstalen (n=150) verkregen uit de kliniek kleine huisdieren (faculteit diergeneeskunde, UGent), werd de prevalentie van de 4-bp deletiemutatie onderzocht. Daar de hondenpopulatie uit de kliniek en de alledaagse praktijkpopulatie qua signalement verwacht werden gelijkaardig te zijn, konden de bekomen resultaten geëxtrapoleerd worden naar de praktijkpopulatie. In de, voor deze masterthesis, onderzochte hondenpopulatie werd geen enkel variant type allel gevonden. Dit staat in contrast met de routine gegenotypeerde hondenpopulatie – die voornamelijk bestond uit ‘hoogrisicorassen’ – waarin de frequentie van het variant type allel 21,6% (n=599) bedroeg. Daar geen enkele hond in de onderzochte kliniekpopulatie het variant type allel bezat, is de kans erg klein om een overgevoeligheidsreactie na toediening van P-gp substraten waar te nemen. De opmerkelijke discrepantie tussen de routine gegenotypeerde dieren en de kliniekpopulatie benadrukt dat het testen van honden behorende tot de ‘hoogrisicorassen’ aangewezen blijft.

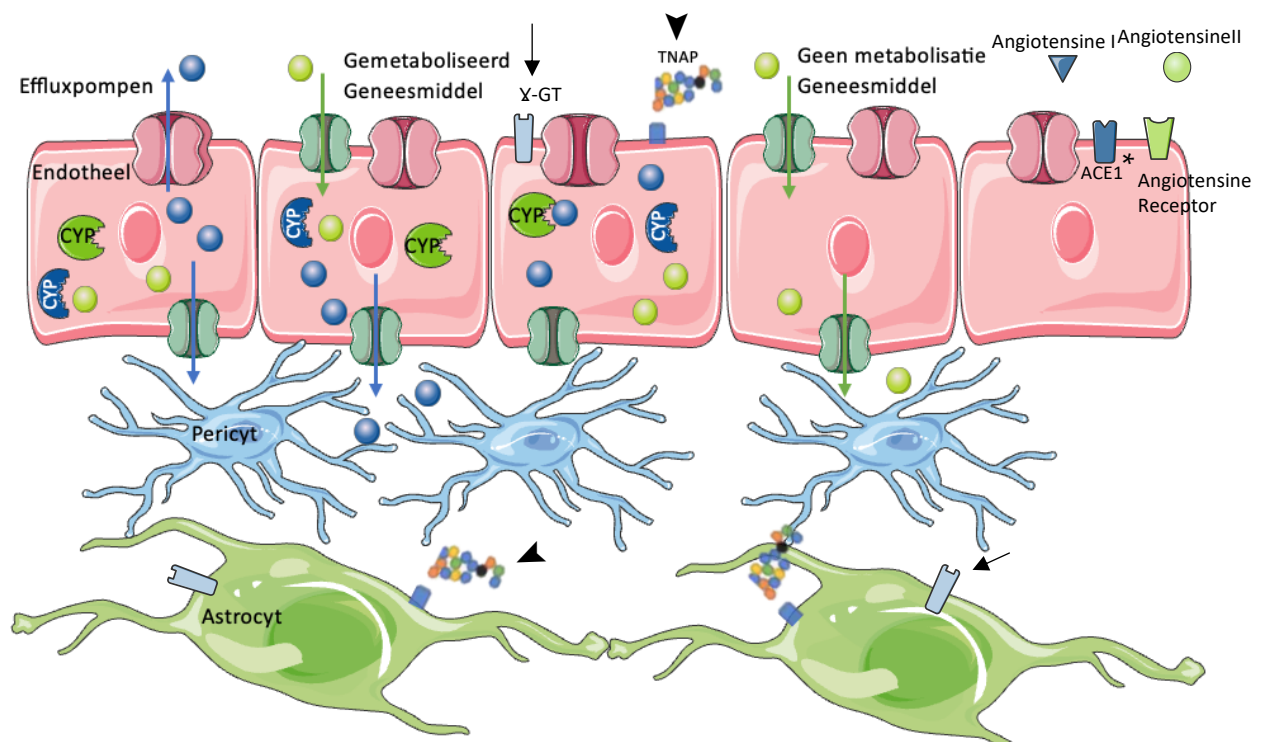
Abstract

A four base pair deletion in the *ABCB1*-gene, also known as multidrug resistance gene, results in a truncated P-glycoprotein (P-gp). P-gp functions as an important efflux-transporter in the body. The transporter is widely distributed throughout the body – the epithelium of the intestine, the hepatocytes, the epithelium of the kidney, and the endothelium in the blood-brain barrier (BBB). P-gp plays a key role in the protection of the body against a wide range of harmful substances, such as endo- and exotoxins. The 4-bp deletion has been described extensively in the collie lineage. Following administration of a P-gp substrate, such as ivermectine and loperamide, neurological signs were reported in dogs which are homozygous for the variant allele. In normal circumstances pharmaceuticals passing the BBB are transported back into the bloodstream by P-gp. Logically, a dysfunctional efflux-transporter compromises the protective mechanism, thus accumulation of a wide variety of pharmaceuticals may occur. Reported clinical signs include ataxia, lethargy, and even death. As no effective treatment is available, warily use of these P-gp substrates in the ‘high-risk dog breeds’ is necessary. The aim of this thesis was to elucidate the risks associated with the use of these P-gp substrates in the general clinic population. The prevalence of the mutation was obtained by testing leftover blood samples (n=150), acquired from the small animal practice (faculty veterinary sciences, Ghent University), using biomolecular techniques. The dogs included were representative for the Belgian dog population – thus, extrapolation was possible. The variant allele was not present in the clinical population, an allelic frequency for the variant allele of 0%. Additionally, the results obtained by the routinely performed genetic tests by the laboratory for animal genetics were considered. The routinely tested dog population consisted of a large amount of ‘high-risk breeds’. A discrepancy was observed between the frequency of the variant allele in the clinical population (vt% 0%) and the routinely tested population (vt% 21,6%). Therefore, the advice of testing these ‘high-risk breeds’ remains.

Literatuurstudie

1. Bloed-hersenbarrière

De bloed-hersenbarrière (BHB) is een anatomische structuur met een belangrijke functie in het neurologisch stelsel. Ieder hoger organisme met een goed ontwikkeld centraal zenuwstelsel (CZS) beschikt over een BHB. In het CZS zijn er 3 belangrijke oppervlakken waar het bloed en de hersenen in contact staan, nl. de bloed-hersenbarrière, de bloed-cerebrospinaal vocht barrière (BCSVB) en de arachnoïdea mater. Deze laatst vernoemde barrière maakt echter geen groot aandeel uit van de locaties waar bloed en hersenen met elkaar stoffen zullen uitwisselen. De 3 barrières zijn telkens opgebouwd uit dezelfde componenten om hun functie te kunnen verwezenlijken – een fysische component mede mogelijk gemaakt door de tight-junctions, een barrière gevormd door transporters en een metabolische barrière bestaande uit enzymen (Abbott et al., 2010). De metabolische component van de BHB wordt weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1. De metabolische component van de bloed-hersenbarrière (BHB). Een groot deel van de enzymen behoren tot de CYP450-familie. De CYP-enzymen vervullen een belangrijke functie in de metabolisatie van geneesmiddelen, een geneesmiddel kan hierdoor geactiveerd of gedeactiveerd worden. Verder worden weefsel non-specifiek alkalisch fosfatase (TNAP, aangeduid met een zwarte pijlpunt) en gamma-glutamyltransferase (γ -GT, aangeduid met een zwarte pijl) op het endotheel en de astrocyten tot expressie gebracht (Ghosh et al., 2011; Gosselet et al., 2021). Angiotensineconverterend enzym (ACE, aangeduid met een asterisk), een centrale speler in het proces dat de bloeddruk reguleert, wordt teruggevonden aan de luminale zijde van de endotheelcellen (Meyer et al., 1990).

Een groot aandeel van deze enzymen behoren tot de cytochroom P (CYP) enzymen, meer specifiek CYP450. De CYP-enzymen oefenen een cruciale functie uit in de metabolisatie van diverse farmaca (Ghosh et al., 2011; Gosselet et al., 2021). Verder worden gamma-glutamyltransferase (γ -GT) en alkalisch fosfatase (AF) eveneens in hoge concentraties teruggevonden aan de luminale zijde van het endotheel dat de hersencapillairen aflijnt. Beide enzymen worden frequent gelinkt aan het transport van moleculen. Het γ -GT zou een rol spelen in het transport van aminozuren doorheen het endotheel. Conjugatie door γ -GT zorgt ervoor dat aminozuren in een vorm omgezet worden die beter getransporteerd kan worden. Een belangrijk aminozuur in het centraal zenuwstelsel is glutathion (GSH), als antioxidant oefent dit nutriënt een beschermende functie uit (Dwivedi et al., 2020). Het AF fosforyleert moleculen, zoals hexose, wat het transport ervan kan faciliteren. Bijkomend zou AF als (de-)activator optreden voor bepaalde enzymen in de BHB, hierdoor kunnen pro-inflammatoire pathways tegengegaan worden (Allt en Lawrenson, 2000; Li et al.,

2022; Meyer et al., 1990). Angiotensineconverterend enzym (ACE), een centrale speler in het proces dat de bloeddruk reguleert, wordt teruggevonden aan de lumenale zijde van de endotheelcellen. ACE zal door activatie van angiotensine I en deactivatie van bradykinine – een molecule die dilatatie van de bloedvaten veroorzaakt – de bloeddruk doen stijgen. Het voorkomen van ACE is niet specifiek voor de BHB aangezien het enzym voorkomt op elke locatie waar zich endotheel bevindt (Meyer et al., 1990; Xia en Lazartigues, 2008).

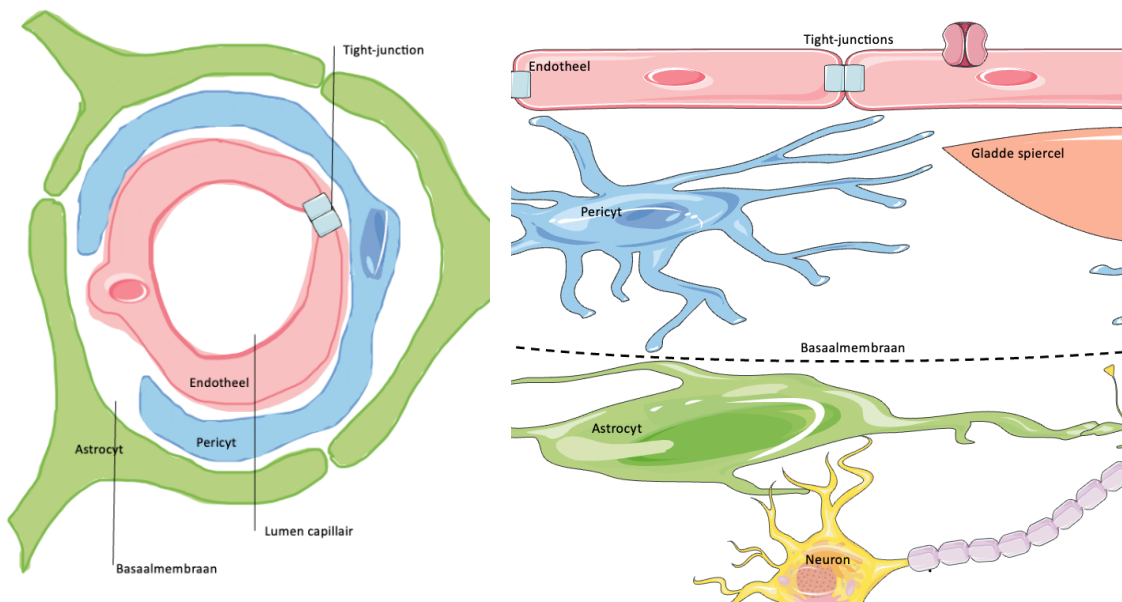
1.1. Functie

Dergelijke barrières tussen het centraal zenuwstelsel en het bloed kennen enkele belangrijke functies. Een eerste taak bestaat eruit de ionen te reguleren met behulp van ion kanalen en transportkanalen. Dit zal meehelpen om een stabiel milieu te behouden, wat op zich een optimale ionensamenstelling is voor de signalisatie in het CZS. Daarenboven is een barrière nodig om een overvloedige toestroom aan neurotransmitters te beperken – postprandiaal stijgt de plasmaconcentratie van glutamaat, een stimulerende neurotransmitter. Overmatige influx van glutamaat kan op zijn beurt excitatie in de hand helpen en irreversibele schade aan het CZS veroorzaken. Albumine, prothrombine en plasminogeen zijn macromoleculen die deel uitmaken van de normale samenstelling van het plasma. Echter, het cerebrospinaalvocht (CSV) kent een samenstelling met aanzienlijk minder proteïnen, sterker nog, bovengenoemde macromoleculen zijn schadelijk voor het CZS. In het zenuwstelsel zijn factor Xa en weefselplasminogeenactivator aanwezig, respectievelijk om prothrombine in thrombine en plasminogeen in plasmine om te zetten. Bij activatie, door binding op de juiste receptor, worden verscheidene pathways geactiveerd. Dit resulteert in activatie van de gliacellen, verlittekening en celdood. De BHB minimaliseert de influx van de bovenvermelde plasma-eiwitten. Een niet te onderschatten rol van de barrières in het CZS is de beschermende functie tegenover endogene en exogene schadelijke substanties, ook wel neurotoxines genoemd. Door de aanwezigheid van adenosinetrifosfaat (ATP)-afhankelijke effluxpompen, zoals ATP-binding cassette (ABC) transporters, worden neurotoxines die toch doorheen de barrière kunnen, terug in het bloed gepompt. Een laatste functie bestaat eruit de hersenen te voorzien van essentiële nutriënten. Verscheidene wateroplosbare metabolieten en nutriënten kunnen doorheen de BHB door middel van passieve diffusie. Daar de permeabiliteit van de BHB relatief laag is, is er nood aan bijkomende transportsystemen (Abbott et al., 2010).

Het neuronale weefsel kent een lage regeneratiecapaciteit, aldus is het van groot belang dergelijke cellen te beschermen tegen endogene en exogene toxines. Door de aanwezigheid van deze barrières, wat een stabiel micromilieu creëert, kan dit doel bereikt worden (Abbott et al., 2010). Disfunctie van eender welke component die deel uitmaakt van de BHB kan enorme gevolgen hebben op het fysiologisch functioneren van het CZS (Knox et al., 2022).

1.2. Anatomie

De bloed-hersenbarrière bestaat uit een laag endotheelcellen, tussen deze cellen zitten structuren die de cellen stevig tegen elkaar aanduwen, de tight junctions of zonulae occludens (ZO). De ZO's bevinden zich aan de apicale zijde van de cel, verder kunnen eveneens zonulae adhaerens en desmosomen onderscheiden worden. Deze moleculaire structuren bestaan uit een scala aan proteïnen, zoals cadherines. Cadherines overbruggen de intercellulaire ruimte en zitten vast met α , β en γ catenines in het cytoplasma van de cel. Verder vervoegen occludine, claudines, tricellulines en junctie adhesie moleculen zich bij deze structuur (Abbott et al., 2010). De tight junctions verhinderen paracellulaire diffusie van macromoleculen, alsook van ionen. De endotheelcellen die de wand van de capillairen in het centraal zenuwstelsel uitmaken zijn uniek, de cellen beschikken niet alleen over erg stevige tight-junctions, ook bevatten ze transporters die in- en efflux regelen van verscheidene substraten. Daarenboven differentiëren de endotheelcellen in de hersenen zich van de perifere endotheelcellen door een mindere mate aan transcyclair vesiculair verkeer, ook wel transcytose genoemd. Alsook is de expressie van leukocyt adhesie moleculen in de celwand aanzienlijk minder in endotheelcellen van het CZS tegenover de perifere endotheelcellen, deze eigenschap zorgt voor een beperkte influx van immuuncellen in het CZS (Abbott et al., 2010; Langen et al., 2019). De verschillende onderdelen van de BHB worden weergegeven in Figuur 2.

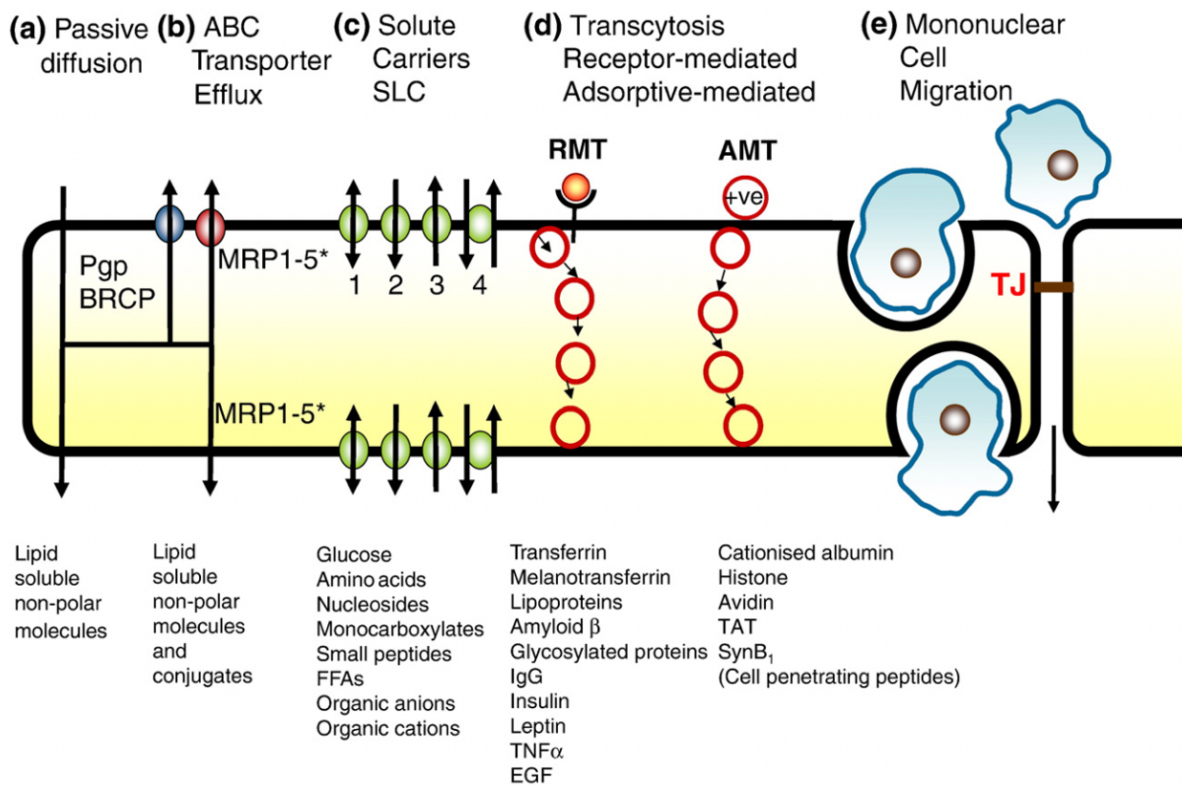


Figuur 2. De opbouw van de bloed-hersenbarrière. De capillairen in het centraal zenuwstelsel worden afgelijnd met een laag endotheelcellen. Tussen de endotheelcellen bevinden zich de tight-junctions of zonulae occludens, zonulae adherens en diverse bijkomende structuren die paracellulaire passage verhinderen. Rondom het endotheel bevinden zich de pericyten. De pericyten zitten in het basaalmembraan ingebed en spelen een belangrijke rol tijdens het ontstaan van de BHB. Verder wordt de integriteit van de BHB versterkt door de uitlopers van de astrocyten. Naar: Abbott et al., 2010.

Rondom deze endotheelcellen, die een eerste laag van de bloed-hersenbarrière vormen, zitten verscheidene cellen en structuren, nl. pericyten, ingebed in het basaalmembraan met daarrond de uitlopers van de astrocyten. Deze laag wordt ook wel de neurovasculaire eenheid genoemd, een scheiding tussen endotheel en de neuronen van het hersenparenchym. Het belang van de pericyten wordt teruggevonden in de regulatie van de BHB-vorming. Door signalisatie tussen pericyten en endotheelcellen worden pericyten aangetrokken en matureren endotheelcellen. Een voorbeeld van dergelijke signalisatie, is de platelet-derived growth factor subunit B (PDGF-B) signalisatieroute. PDGF-B is een proteïne geproduceerd door de endotheelcellen en binding van de platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β) op de pericyten activeert deze cellen. Na activatie migreren de pericyten naar de capillairen en vormt zich een sterke BHB tijdens angiogenese (Armulik et al., 2010; Leveen et al., 1994; Soriano, 1994). De astrocyten vormen met hun cytoplasmatische uitlopers een schede rondom de pericyten en endotheelcellen. In de membranen van deze uitlopers zitten kanalen – aquaporine 4 (Aqp4) en Inwardly rectifying potassium (Kir) 4.1 – die de ion en water homeostase in de ruimte tussen de capillairen en de neuronen reguleren. Aqp4 regelt het grootste deel van de waterinflux (Nagelhus en Ottersen, 2013). Kir 4.1 helpt bij het bufferen van kalium ionen (K^+). Dergelijk mechanisme behoudt de K^+ homeostase, wat protectief is tegen neuronale hyperexcitatie (Ohno et al., 2018). Andere belangrijke functies van de astrocyten bestaan uit de metabolisatie van neurotransmitters, zoals glutamaat, glycine en gamma-aminoboterzuur (GABA), secretie van cytokines en neuroactieve molecules, zoals brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Amiry-Moghaddam et al., 2002; Armulik et al., 2010; Kinboshi et al., 2020; Nagelhus en Ottersen, 2013; Ohno et al., 2018).

1.3. Transport

Transport tussen bloedbaan en hersenen kan plaatsvinden langs verscheidene wegen – passieve diffusie, ABC transporters, solute carriers (SLCs), transcytose en transmigratie van cellen. De diverse transportmechanismen worden in Figuur 3 in beeld gebracht. Naargelang welke moleculen getransporteerd worden, zal een ander type van transport geprefereerd worden (Abbott et al., 2010).



Figuur 3. De 5 belangrijkste types transport die kunnen plaatsvinden in de bloed-hersenbarrière – passieve diffusie, solute carriers (SLCs), ABC transporters en transcytose. (a) Passieve diffusie, een proces dat geen energie vereist, rust op het principe van diffusie van moleculen doorheen de bilipidenlaag van de cel. (b) ATP-afhankelijke cassette transporters maken gebruik van energie verkregen door het verbruik van ATP. (c) Passieve solute carriers hebben eveneens geen nood aan energie. Ze kunnen in tegenstelling tot passieve diffusie moleculen met een bepaalde polariteit transporteren doorheen de cel in de vereiste richting. (d) Transcytose biedt oplossing voor het transport van grotere moleculen. Via receptoren kunnen dergelijk moleculen doorheen de cel getransporteerd worden. (e) Transmigratie van cellen. Naargelang de eigenschappen van een molecule – grootte en polariteit – wordt de voorkeur gegeven aan een van voorgenoemde transportmechanismen. Uit: Abbott et al., 2010.

1.3.1. Passieve diffusie

Passieve diffusie vergt geen energie en kan bevorderd of belemmerd worden door enkele factoren eigen aan een molecule. Het transport gebeurt door diffusie doorheen de bilipidenlaag, aldus hebben substraten met een lage polariteit een voordeel tegenover wateroplosbare moleculen. Daar de omvang van de poriën beperkt is, zal diffusie enkel van toepassing zijn op moleculen kleiner dan 450 Dalton (Da). Alsook zal de vrije fractie van een molecule een invloed hebben op het al dan niet diffunderen doorheen de BHB aangezien een hoge affiniteit voor plasmaproteïnes gepaard gaat met lagere diffusie. Een laatste niet te verwaarlozen eigenschap is de zuurtegraad. De BHB is negatief geladen door de negatief geladen glycolyx en hydrofiële fosfolipenhoofd. Positief geladen basen zullen voordeel hebben ten opzichte van zuren, daar een kation beter de negatief geladen barrière passeert (Abbott et al., 2010).

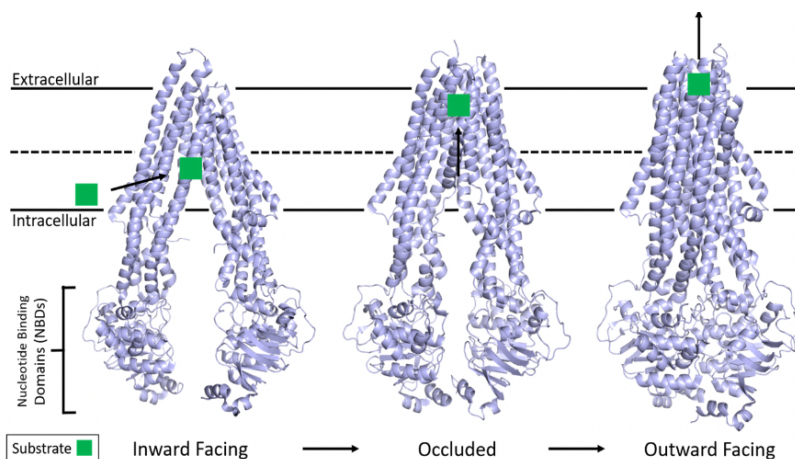
1.3.2. Solute carriers

Elke cel heeft behoefte aan nutriënten zoals glucose en aminozuren (AZn) om in leven te blijven. Echter, de tight-junctions in de barrière verhinderen paracellulair transport van dergelijke substraten. Alsook is de polariteit van een nutriënt veelal eerder hoog waardoor deze moeilijk doorheen de lipofiele celwand geraakt, passieve diffusie solute carriers bieden een oplossing voor dit probleem. SLCs bevinden zich aan de lumenale, abluminale of beide zijdes van het endotheel. Dergelijke polariteit van de cel zal resulteren in enerzijds transport van de bloedbaan naar het CZS of anderzijds transport van het CZS naar de bloedbaan (Abbott et al., 2010).

1.3.3. ATP-afhankelijke cassette transporters

Humaan kunnen 48 superfamilies van proteïnes onderscheiden worden, verder worden deze transporters onderverdeeld in 7 subfamilies (ABCBA-ABCG). ABC-transporters zijn efflux transporters – wanneer een lipofiele molecule de BHB passeren, kunnen dergelijke transporters deze molecule terug de bloedbaan in pompen. Deze effluxpompen hebben de beschermende functie om zowel endogene als exogene neurotoxines buiten het CZS te houden. De belangrijkste transporters in de BHB zijn P-glycoproteïne, de Multidrug Resistance-associated Proteïnes en Breast Cancer Resistance Proteïnes (Abbott et al., 2010). Deze 3 effluxpompen spelen eveneens een hoofdrol in het mechanisme van multidrug-resistentie (Mao en Unadkat, 2015).

Zoals de naam suggereert, gaat het hier om een actief proces waarbij energie vereist is. Structureel bestaat elke ABC-transporter uit 2 types domeinen – nucleotide bindende domeinen (NBDn) en transmembrane domeinen (TMDn). ATP bindt op een NBD-dimeer, gelokaliseerd op de cytoplasmatische zijde van het celmembraan, met hydrolyse tot gevolg. Alsook de TMDn vormen een dimeer, dit domein speelt een rol in de vorming van de weg nodig voor het transport van verscheidene substraten doorheen het celmembraan. De transporter ondergaat een conformatieverandering in het NBD-dimeer bij binding en hydrolyse van ATP, deze verandering zal op zijn beurt een conformatieverandering van het TMD-dimeer teweegbrengen, wat de richting waarin substraten worden gepompt, wijzigt. Het efflux-mechanisme wordt weergegeven in Figuur 4. Een laatste belangrijke structuur die deel uitmaakt van de ABC-transporter, is het substraat bindend proteïne (SBP). Een hoge affiniteit van het substraat voor deze molecule is vereist (Zhang et al., 2016).



Figuur 4. Het efflux-mechanisme van het P-glycoproteïne. De substraten binden op het substraat bindend eiwit. Aan de cytoplasmatische zijde bevindt zich het nucleotide bindend domein – ATP bindt op het domein met als resultaat een conformatieverandering. Het substraat wordt aan lumenale zijde van de endotheelcel uitgescheiden. Uit: Goebel et al., 2021.

P-glycoproteïne

P-glycoproteïne (P-gp), ook wel Multidrug Resistance Proteïne 1 (MDR1) of ABCB1 genoemd, is een eerste belangrijk lid dat deel uitmaakt van de ABC-transporters. P-gp is verspreid over het ganse lichaam – het epitheel van het gastro-intestinaal stelsel, de lever, de nieren, de gonaden en het endotheel van de hersencapillairen. De belangrijkste functie van de effluxpompen is het verhinderen van een overmatige opname van vreemde stoffen en de excretie ervan in lichaamsvloeistoffen, zoals urine en gal (Ambudkar et al., 2003). P-gp kan onder meer absorptie na orale administratie reduceren door het terugpompen van opgenomen farmaca in het darmlumen. Alsook kan de aanwezigheid van P-gp op de hepatocyten en tubuluscellen farmaca vanuit de bloedbaan in respectievelijk de gal en urine uitscheiden. Een laatste belangrijk werkingsmechanisme wordt op locaties waargenomen waar weefsel en bloed in contact komen, waaronder de BHB, placenta en testes. Medicijnen aanwezig in de systemische circulatie worden hierdoor gelimiteerd in opname. Indien de BHB toch gepasseerd wordt, worden vreemde stoffen terug aan de lumenale zijde in het bloed gepompt (Fromm, 2004).

In het verleden werd P-gp voornamelijk in associatie gebracht met chemotherapeutica, meer specifiek de resistentie ertegen. P-gp wordt frequent teruggevonden op neoplastische cellen (Fromm, 2003). Resistentie

tegen individuele cytostatica ontstaat door veranderingen in de bindingsplaats van deze medicatie. Anderzijds is multidrug resistentie een resultaat van verschillende mechanismes en omvat veelal resistentie tegen verschillende farmaca. In het *ABCB1*-gen van de mens komen heel wat mutaties voor, sommigen zullen de aminozuursamenstelling wijzigen, anderen zullen geen veranderingen teweegbrengen. De meeste mutaties bevinden zich in het coderend deel, de exonen, van het gen. Hoewel veranderingen op DNA-niveau in de intronen en promotorregio zijn beschreven in het verleden, is het belang hiervan niet heel duidelijk (Ambudkar et al., 2003).

Substraten van de P-gp zijn neutraal tot licht lipofiel (Chen et al., 2012). Typische substraten bestaan uit chemotherapeutica (vincristine, imatinib, vinblastine en docetaxel), Ca^{2+} blokkers (verapamil, mibefradil), β -adrenerge antagonisten (talinalol), corticosteroïden (dexamethasone, methylprednisolone), immunosuppressiva (cyclosporine A, tacrolimus en sirolimus) en hartmedicatie (digoxine en digitoxine) (Fromm, 2004). Moleculen die binden op P-gp kunnen zowel substraten als inhibitoren zijn. Protonpomp inhibitoren, zoals omeprazole en pantoprazole, zijn inhibitoren. Chemo- en immunotherapeutica, zoals vinblastine, doxorubicine en aldosterone, zijn substraten. Praktisch betekent dit dus ook dat de nodige voorzichtigheid zou moeten genomen worden bij het toedienen van bepaalde medicatie, zoals ivermectine in combinatie met een P-gp inhibitor (Merola en Eubig, 2012).

Bij de hond worden voornamelijk de macrocyclische lactonen (MLn) in acht genomen bij overgevoelighedsreacties, meer specifiek ivermectine. Ivermectine is een antiparasiticum geregistreerd voor verscheidene nematoden, cestoden en trematoden. Bij zoogdieren is het werkingsmechanisme gebaseerd op binding van de MLn op de GABA-receptor. GABA is een inhibitorische neurotransmitter. Aldus zal binding op de receptor chloor-influx veroorzaken en resulteren in een toestand van CZS-depressie. In normale omstandigheden verhindert P-gp de passage van MLn doorheen de BHB en vindt er geen binding op de GABA-receptor plaats. Logischerwijze zal een deficiënte effluxpomp, accumulatie van de toxische moleculen in het CZS veroorzaken. Symptomen als ataxie, lethargie en zelf de dood, kunnen waargenomen worden. Zowel bij homozygoot mutante dieren als bij een overdosis worden klinische afwijkingen gezien (Merola en Eubig, 2012).

Bij oudere honden wordt een gereduceerde expressie van P-gp op de BHB aangetoond. Dergelijke bevinding suggereert een fysiologische toegenomen gevoeligheid voor een ivermectine overgevoelighedsreactie bij oudere honden (Merola en Eubig, 2012).

Het ivermectine overgevoelighedsfenotype bij de hond waar deze thesis zich op focust, is te wijten aan een mutatie in het *ABCB1*-gen. Naast deze genetische oorzaak, kan inhibitie van P-gp echter ook het gevolg zijn van verschillende interacties tussen substraten en bindingsplaatsen. Een eerste belangrijke is die tussen het substraat bindend domein en het substraat. Een geneesmiddel dat bindt op dit domein is verapamil, een Ca^{2+} blokker ingezet bij diverse hart- en vaatziekten. Simultaan toedienen van verapamil en een ander P-gp substraat veroorzaakt competitie tussen beide geneesmiddelen, wat resulteert in een inefficiënte klaring van het P-gp substraat. Een ander mechanisme dat aan de basis kan liggen van P-gp inhibitie is na binding van een geneesmiddel op het ATP-bindend domein of NBD, vanadaat wordt daarom in de geneeskunde gebruikt als ATPase inhibitor. Als laatste kan een geneesmiddel zowel op het substraat bindend domein als op het ATP-bindend domein binden, een substantie die op deze manier P-gp inhibeert is cyclosporine. Door deze complexe werking van P-gp wordt het moeilijk om drug-drug interacties te voorspellen en in kaart te brengen. Zo geldt de inhibitie vaak slechts in één richting – cyclosporine inhibeert de efflux van digoxine, digoxine reduceert de efflux van cyclosporine echter niet. Bijkomend wordt een dosis afhankelijk effect beschreven. Het proces van P-gp interacties tussen diverse substraten wordt opgedeeld in 3 categorieën, nl. competitieve inhibitie, niet-competitieve inhibitie en co-operatieve stimulatie. De eerste categorie beschrijft de interactie tussen 2 componenten met eenzelfde bindingsplaats. Niet-competitieve inhibitie heeft betrekking op de interactie tussen 2 substraten met een andere bindingsplaats. Het proces van co-operatieve stimulatie heeft, zoals de naam doet vermoeden, net een bevorderend effect op P-gp. Een voorbeeld is het simultaan toedienen van flavonoiden en doxorubicine, waarbij de efflux van doxorubicine gestimuleerd wordt. Flavonoiden zijn essentieel in de vitamine C stofwisseling en treden op als antioxidant (Ullah et al., 2020). Tevens kennen de beschreven categorieën geen exacte afbakening, additionele

mechanismen, zoals allosterische veranderingen van de bindingsplaats, maken het nog moeilijker om de al erg complexe wisselwerking bloot te leggen. Een overdreven neurotoxisch effect, vergelijkbaar met het ivermectine overgevoeligheidsfenotype bij de hond, kan geïnduceerd worden door een simultane toediening van loperamide en kinidine – loperamide is een antidiarreïcum en kinidine een anti-aritmicum. In fysiologische omstandigheden wordt de kleine hoeveelheid loperamide die in het centraal zenuwstelsel binnengerakt door P-gp terug in de bloedbaan gepompt, bij co-administratie van kinidine wordt deze beschermende werking van P-gp gecompromitteerd (Lin en Yamazaki, 2003).

Multidrug Resistance-associated proteïnes

Humaan kunnen er 13 verschillende Multidrug Resistance-associated Proteïnes (MRPs) onderscheiden worden. Ook deze moleculen maken deel uit van de ABC-transporters, bestaande uit 2 NBDn en 2 TMDn. Multidrug Resistance Proteïne 1 (MRP1) was na P-gp een van de eerst ontdekte effluxpompen. De pomp wordt tot expressie gebracht op het epitheel van de long, testes, nieren, placenta, macrofagen, hart- en dwarsgestreepte spieren. Daarenboven wordt MRP1 teruggevonden op het epitheel van de plexus choroïdeus, de bloed-cerebrospinaalvochtbarrière (Chen et al., 2012). De belangrijkste MRPs in de BHB zijn ABCC1-6 (Abbott et al., 2010).

Breast Cancer Resistance Proteïnes

Breast cancer resistance protein (BCRP) of ABCG2 heeft zijn naam te danken aan een chemotherapeutica resistente borstkankercellijn. Naast bepaalde geneesmiddelen – mitoxantrone, topotecan, imatinib, azidothymidine en cimetidine – zijn onder meer de endogene stoffen 17β -oestradiol en urinezuur eveneens substraten van BCRP. Daarenboven werden in het verleden tal van BCRP-inhibitoren, die frequent ook P-gp-inhibitoren zijn, geïdentificeerd. De effluxpompen komen tot expressie op de apicale zijde van de hepatocyten, de endotheelcellen van de hersencapillairen, de proximale tubuluscellen en het darmepitheel. Belangrijke functies van de BCRPs omvatten absorptie en eliminatie van exogene en endogene moleculen (Mao en Unadkat, 2015).

1.3.4. Transcytose

Transcytose – het verkeer doorheen de cel – vindt voornamelijk plaats wanneer grotere moleculen moeten getransporteerd worden. Een macromolecule wordt via endocytose opgenomen in de cel na enerzijds te binden op een receptor (receptor gemedieerde transcytose) of anderzijds door interactie tussen een positief geladen molecule – kation – en een bindingsite op het oppervlak van de cel (adsorptie gemedieerde transcytose). Een opmerking die hierbij gemaakt dient te worden is het mechanisme van lysosomale degradatie, in de endotheliale cellen vormt dit echter minder een probleem dan in andere lichaamscellen (Abbott et al., 2010; Broadwell et al., 1988).

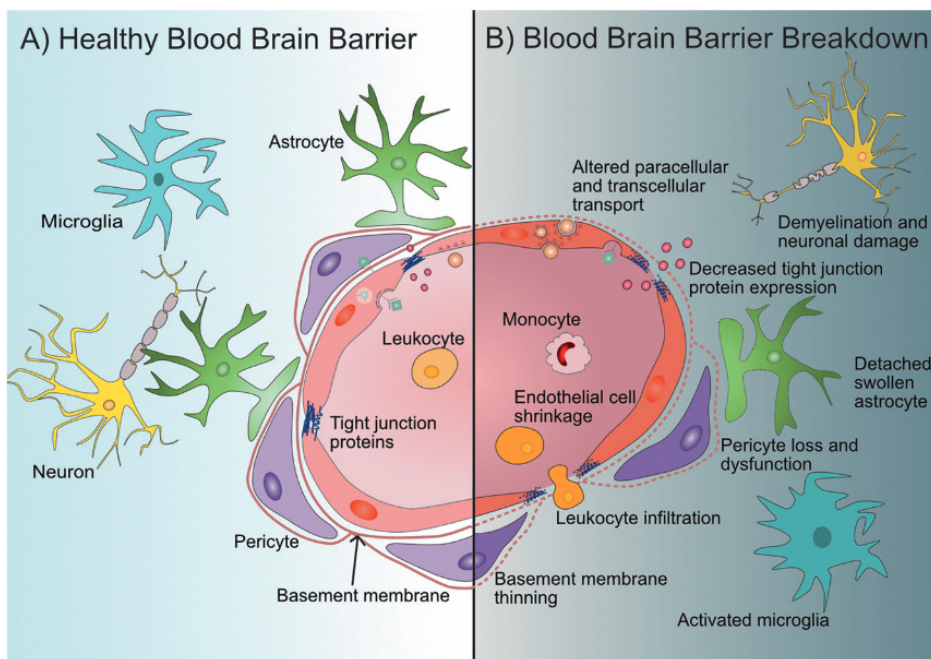
1.3.5. Transmigratie van cellen doorheen de bloed-hersenbarrière

Beenmergcellen afkomstig uit de monocytencellijn migreren tijdens de embryogenese naar de hersenen, hier vormen ze de immuuncellen van het CZS, de microglia (Blanchette en Daneman, 2015). Anderzijds worden eveneens leukocyten, monocytencellen en macrofagen via de bloedbaan aangevoerd bij bepaalde aandoeningen van het CZS en daar voeren ze een gelijkaardige functie als de microgliacellen uit (Davoust et al., 2008). In sommige omstandigheden kunnen neutrofielen evenzeer de BHB passeren en perivascuair zich als cuffs organiseren. Wanneer geactiveerde neutrofielen door ischemie of trauma de BHB beschadigen, kunnen deze immuuncellen zelf de hersenen infiltreren (Scholz et al., 2007).

1.4. Disfunctie van de bloed-hersenbarrière

In de humane geneeskunde is het belang aan onderzoek naar pathologieën van het CZS de laatste decennia aanzienlijk toegenomen. In de pathogenese van verscheidene aandoeningen wordt de rol van een gecompromitteerde functie van de BHB beschreven (Abbott et al., 2010). Een belangrijk gevolg dat gezien wordt bij disfunctie van de BHB is een toename van de permeabiliteit wat extravasatie van plasmacomponenten – en aldus hersenoedeem – in de hand werkt (Wunder et al., 2012). Het is ongekend of disfuncties van de BHB causaal zijn voor de pathologie in kwestie, een gevolg zijn ervan of iets tussenbeide. Bij de mens wordt disfunctie van de BHB in diverse ziekten waargenomen, e.g. multiple sclerose (MS) (McQuaid et al., 2009), de ziekte van Alzheimer (Bell en Zlokovic, 2009; Long en Holtzman, 2019; Tai et al., 2009), Parkinson (Bartels et al., 2008), epilepsie (Kinboshi et al., 2020; Wunder et al., 2012) en glaucoma (Grieshaber en Flammer, 2007). Betere en snelle diagnostische technieken om dergelijke verstoringen in de BHB op te kunnen sporen, zouden mogelijks progressie van de eerder vernoemde aandoeningen van het CZS kunnen tegengaan (Abbott et al., 2010).

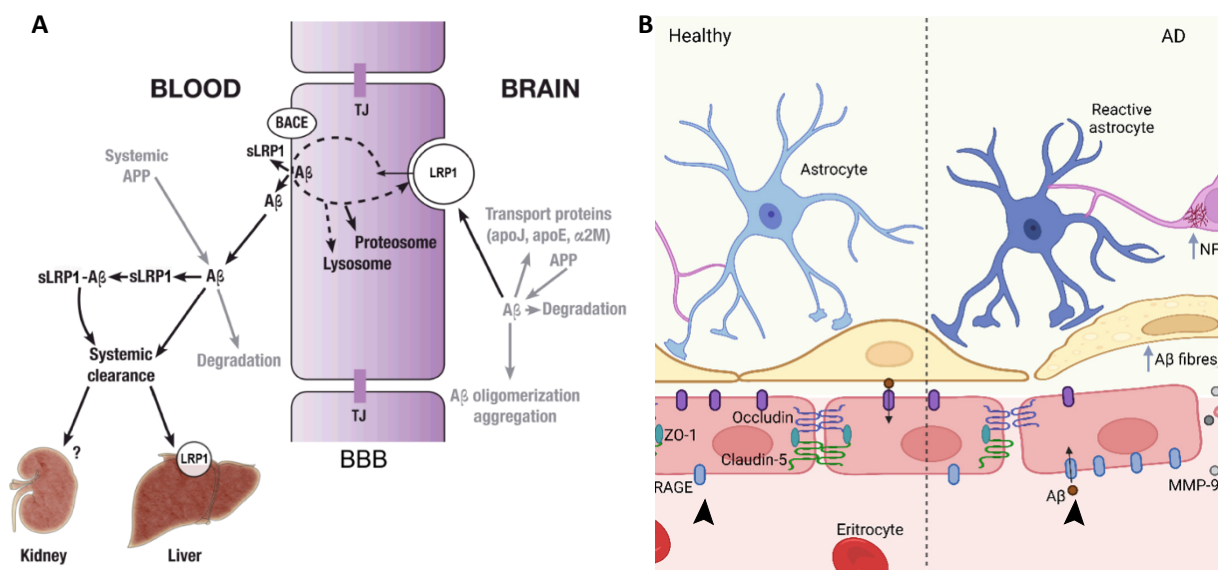
Gewoonlijk worden neurodegeneratieve aandoeningen meer prevalent waargenomen in de oudere populatie. Aansluitend zien we eveneens een toegenomen disfunctie van de BHB naarmate een individu ouder wordt. In een gezond individu zullen structurele veranderingen in de integriteit van de BHB waargenomen kunnen worden naarmate de leeftijd toeneemt. Zoals aangetoond wordt in Figuur 5, zullen deze veranderingen op de verschillende niveaus van de BHB gezien worden (Knox et al., 2022). De BHB vormt een essentiële locatie voor het verkeer van noodzakelijke moleculen zoals glucose. Het verkeer van glucose wordt via GLUT transporters geregeld. Naast een vergroot lekkage vermogen, wordt een verminderde functie van P-gp en GLUT-1 transporters geobserveerd in oudere individuen (Erickson en Banks, 2019). Een afgenomen transport van glucose doorheen de BHB wordt eveneens beschreven bij milde cognitieve stoornissen, wat al dan niet een voorbode kan zijn voor dementie en de ziekte van Alzheimer (Bell en Zlokovic, 2009). Een laatste merkwaardige bevinding die gepaard gaat met het natuurlijk verouderingsproces is een beschreven verandering van een gedaald specifiek receptor-gemedieerd transport naar een stijging in het aspecifiek caveolair transport. Daar iedere molecule een bepaald type transport ondergaat, zal er dus evenzeer een verandering in concentraties van de bijhorende moleculen in het CZS waargenomen kunnen worden (Yang et al., 2020). Integriteitsverlies van de BHB maakt deel uit van het fysiologisch verouderingsproces, desalniettemin wordt dit fenomeen versneld bij een grote verscheidenheid aan neurodegeneratieve aandoeningen (Knox et al., 2022).



Figuur 5. De opbouw van de bloed-hersenbarrière in een fysiologische en een pathologische situatie. (A) De normale anatomie van de BHB. (B) Onder invloed van verscheidene agens (LPS, reactieve oxygen species (ROS), pro-inflammatoire mediators) kan de integriteit van de BHB verloren gaan. Het effect kan gezien worden op elk niveau van de BHB – de paracellulaire permeabiliteit, de werking van de verschillende transporters, transmigratie van immuuncellen en een gereduceerde functie van de pericyten. Uit: Knox et al., 2022.

Alvorens een representatief model voor integriteitsverlies van de BHB kan opgesteld worden, dienen de essentiële etiologieën geïdentificeerd te worden. Een model dat wijdverspreid aangenomen wordt, is het lipopolysaccharide (LPS) model. LPS is een bacterieel pro-inflammatoir endotoxine (Knox et al., 2022). Aan de hand van *in vitro* experimenten werd aangetoond dat de aanwezigheid van LPS leidt tot een toegenomen paracellulaire permeabiliteit, apoptose van de endotheelcellen en verminderde activiteit van onder meer P-gp en SLCs (Varatharaj en Galea, 2017). Naast LPS, kunnen oxidatieve stress en andere pro-inflammatoire mediators een rol spelen in de disruptie van de BHB (Knox et al., 2022).

De ziekte van Alzheimer en neurodegeneratieve aandoeningen worden frequent in dezelfde adem uitgesproken. De histopathologische veranderingen in het CZS zijn erg typerend voor de ziekte van Alzheimer – de accumulatie van amyloïd beta-peptide ($A\beta$) in het hersenparenchym en de bloedvaten als gevolg van een gecompromitteerde opruiming door de neurovasculaire eenheid. Bell en Zlokovic (2009) bestudeerden de rol die de BHB speelt in de pathogenese van Alzheimer. Een continue wisselwerking tussen verschillende receptoren zal balans creëren tussen aanvoer en afvoer van $A\beta$. Bij de ziekte van Alzheimer worden hoge niveaus reactive oxygen species (ROS) gerapporteerd, essentiële eiwitten in de BHB kunnen hierdoor schade ondergaan (Bell en Zlokovic, 2009). Een opregulatie van de receptor for advanced glycation end products (RAGE) die het transport van $A\beta$ van het plasma naar het CZS bevordert, kan bijdragen tot amyloïdaccumulatie. Alsook kan een verlaagde expressie of een afgefunctioneerde/disfunctioneel LRP1, dat als chaperonne-eiwit optreedt voor het verkeer van $A\beta$ van het CZS naar het plasma, hetzelfde resultaat geven (Zlokovic et al., 2010). De interacties tussen $A\beta$ en de betrokken transporteiwitten worden in Figuur 6 voorgesteld. De voortdurende zoektocht naar het compleet pathofysiologisch mechanisme betrokken bij de ziekte van Alzheimer heeft de afgelopen jaren eveneens P-gp als noemenswaardige effluxpomp in de schijnwerper gezet. Storck et al. (2018) bestudeerden een mogelijke link tussen P-gp en LRP1. Zowel LRP1 als P-gp tonen een gereduceerde functie bij patiënten met de ziekte van Alzheimer – de rol van P-gp roept echter vragen op daar deze zich bevindt aan de lumenale zijde van de cel en de meeste P-gp substraten een kleiner moleculair gewicht hebben dan $A\beta$ (Hartz et al., 2010; Storck et al., 2018).



Figuur 6. (A) Het transport van amyloïd bèta-peptide ($A\beta$) in de hersenen. Accumulatie van $A\beta$ is pathognomonisch voor de ziekte van Alzheimer bij de mens. Door het chaperonne-eiwit (LRP1) wordt overtollig $A\beta$ uit het centraal zenuwstelsel de bloedbaan in gepompt. Uit: Zlokovic et al., 2010. (B) Bij een gezond individu (healthy) zal het aantal receptoren (RAGE, hier aangeduid met een zwarte pijlpunt \blacktriangleright), die $A\beta$ in het centraal zenuwstelsel pompen, aanzienlijk minder zijn. Bij een patiënt met de ziekte van Alzheimer (AD) zijn er erg veel receptoren aanwezig, dit zal accumulatie van $A\beta$ in de hand werken. Uit: López-Ornelas et al., 2022.

Neurodegeneratieve ziektes kennen een groot belang in de humane geneeskunde, in de diergeneeskunde is de kennis hieromtrent miniem. Desalniettemin is de kijk op de huisdieren, en het dierenrijk in hun geheel, de afgelopen eeuwen drastisch veranderd. Dieren maken deel uit van het gezin en baasjes willen het summum voor hun geliefde viervoeter. Cognitieve disfunctie bij de hond is een van de neurodegeneratieve ziektes die naar voren wordt geschoven in de diergeneeskundige neurologie. Niet alleen voor het dier, maar

ook humaan zou onderzoek naar de pathogenese betrokken bij het ontstaan van deze aandoening cruciaal kunnen zijn daar gelijkenissen beschreven zijn met de ziekte van Alzheimer. Parallele ziektebeelden zoals amnesie, desoriëntatie en gedragsveranderingen, en histopathologische gelijkenissen zoals de accumulatie van A β in het hersenparenchym, werden waargenomen (Mihevc en Majdic, 2019). Om de bovengenoemde redenen zou P-gp – en de disfuncties ervan – eveneens een rol kunnen spelen in verscheidene pathogeneses betrokken bij neurodegeneratieve aandoeningen bij de mens en de hond.

2. Mutatie

Praktisch elk organisme beschikt over een unieke code, het DNA. Desoxyribonucleïnezuur (DNA) bestaat uit een dubbele helix gevormd door 2 nucleotidestrengen. De nucleobasen – adenine, thymidine, cytosine en guanine – vormen basenparen door middel van waterstofbruggen, wat de typische DNA-structuur doet ontstaan. Hierbij zal telkens een purine en een pyrimidine een paar vormen, respectievelijk adenine-thymidine en guanine-cytosine. Bij RNA wordt de base thymidine vervangen door uracil. De vertaling van DNA wordt grotendeels bepaald door de nucleotidenvolgorde (Pauling en Corey, 1953; Travers en Muskhelishvili, 2015). Naast de basenpaarsequentie, zijn er tevens bijkomende elementen die een invloed hebben op het eindproduct van de DNA-translatie. Een noemenswaardige parameter is het epigenetisch landschap – modificaties die hun invloed uitoefenen door het DNA al dan niet te openen opdat transcriptie kan plaatsvinden. Deze alteraties, zoals methyl en acetylgroepen, kunnen zowel op basenpaarniveau worden geplaatst als op het niveau van de histonen. Daar het DNA bereikbaar moet zijn voor de verschillende enzymen betrokken bij het proces van transcriptie en translatie, kan enkel het open chromatine – euchromatine – afgeschreven worden. Door het plaatsen van chemische groepen op een nucleotide kan euchromatine naar heterochromatine, of vice versa, geconverteerd worden. Eenzelfde resultaat wordt waargenomen bij modificaties van de histonen. Het epigenetisch patroon is, net zoals de nucleotidensequentie van een individu, erfelijk (Hamilton, 2011).

Een gen kan onderverdeeld worden in exonen – het coderende deel van het gen – en intronen. Intronen, die vroeger een onderdeel van het zogenaamde “junk DNA” werden genoemd, omvatten het niet-coderend deel, hun rol is echter niet te onderschatten. Waar in het verleden weinig aandacht werd besteed aan het nut van intronen, werd de laatste decennia duidelijk dat ze een belangrijke rol spelen bij de regulatie van het gen. Buchmant en Berg (1988) ontdekten zo dat de hoeveelheid mRNA hoger was bij intron-bevattende genen (Buchmant en Berg, 1988; Chorev en Carmel, 2012).

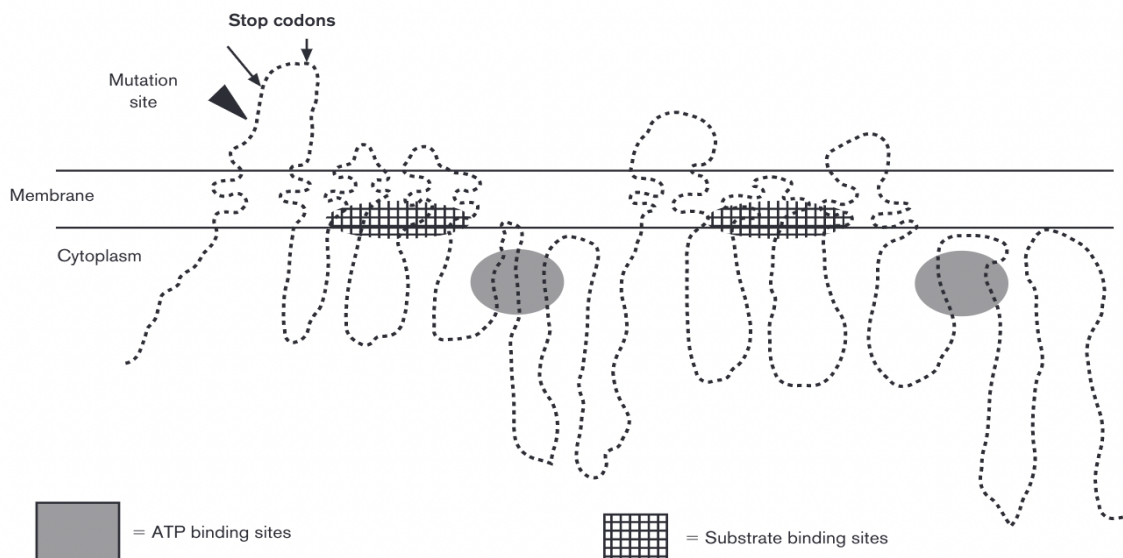
Om de genetische code om te zetten in essentiële moleculen zijn er twee hoofdrolspelers – transcriptie en translatie. Bij transcriptie van het DNA wordt er messenger RNA (mRNA) gevormd. Voorgenoemd proces vindt plaats in de celkern, er wordt van de matrijsstreng een complementaire mRNA streng gemaakt met behulp van het RNA-polymerase enzym. Typisch initieert het enzym transcriptie door binding met de promotorregio van het gen. Eens een mRNA streng gevormd is, zal dit via de kernporiën zich naar het cytoplasma van de cel begeven. Eens in het cytoplasma, zal translatie van het mRNA plaatsvinden. Om de basensequentie om te zetten in aminozuren, is een ribosoomcomplex en transfer-RNA (tRNA) nodig. Door binding van het codon met het anti-codon – gelegen op het tRNA – wordt een aminozuur gesynthetiseerd (Hershey et al., 2012; Webster en Weixlbaumer, 2021). Meestal zal een opeenvolging van 3 nucleotiden – een codon – coderen voor een specifiek aminozuur, er bestaan echter stopcodons die het eindpunt voor de translatie markeren. Daarenboven is er een specifiek codon (AUG) – het startcodon – dat als bindingsplaats voor het ribosoom complex fungeert, aldus essentieel om translatie te initiëren, alsook codeert dit codon voor methionine (Travers en Muskhelishvili, 2015). Het belang van dergelijke sequenties bestaat erin het leesraam, ook wel open reading frame (ORF) genoemd, vast te leggen. De definitie hieromtrent is niet steeds even duidelijk, er wordt aangenomen dat het aantal basenparen een veelvoud van 3 moet zijn en het te vertalen stuk begrensd wordt door een start- en stopcodon (Sieber et al., 2018).

Een gans spectrum aan mutaties kan voorkomen in het DNA en RNA zoals puntmutaties, deleties/inserties, duplicaties, inversies en translocaties. Puntmutaties kunnen verder onderverdeeld worden in substituties en inserties/deleties van 1 base. Hoewel een mutatie van deze aard banaal lijkt, kan het een hoop veranderingen met zich meebrengen. Zo kan een substitutie van 1 enkele base een ander codon genereren

en mogelijks tot een ander aminozuur leiden, dit is echter niet steeds het geval – er zijn meer codon combinaties dan aminozuren. Daarenboven kan de nieuwe sequentie een stopcodon genereren. Wanneer een insertie of deletie van 1 enkele base plaatsvindt, zal de impact aanzienlijk zijn aangezien er een leesraamverschuiving zal optreden. Zoals in bovenstaande paragraaf aangegeven wordt, wordt het mRNA per 3 basenparen vertaald naar een bijhorend aminozuur, wanneer 1 additionele base in het DNA wordt ingebouwd, zullen alle volgende codons op het mRNA gewijzigd zijn – er wordt een verkort of gewijzigd eiwitproduct gevormd. Bijgevolg mag de locatie waar de mutatie plaatsvindt niet onderschat worden – indien dit in het begin van het gen is, zal de impact groter zijn dan wanneer deze zich op het einde van het gen bevindt (Gray et al., 1982). Zowel mutaties in exonen als intronen kunnen desastreuze gevolgen hebben. Dergelijke mutaties kunnen spontaan of geïnduceerd – onder invloed van mutagene factoren – ontstaan, alsook overgedragen worden van ouderdier op nakomeling (Rogozin en Pavlov, 2003). Bij de mutatie die aan de basis ligt van ivermectine overgevoeligheid, is geen duidelijke oorzaak gevonden voor de genetische verandering (Mealey et al., 2001). Door mutaties die voorkomen op bepaalde plaatsen in het gen gelegen op het chromosoom, ontstaan verschillende allelen, zo kan een hond een wild type allel bezitten – zonder de 4-bp deletie – en een mutant allel bezitten.

In het organisme wordt het hele proces van transcriptie, translatie en replicatie nauw gecontroleerd.

Het genoom van de hond bestaat uit 78 chromosomen – 38 paar autosomen en 2 geslachtschromosomen. Het gen betrokken bij het ivermectine overgevoeligheidsfenotype is gelegen op chromosoom 14 (Breen, 2008). Het *ABCB1*-gen, vroeger ook wel Multidrug Resistance 1 (*MDR1*) gen genoemd, codeert voor P-gp. Mealey et al. (2001) omschreef de mutatie, een 4 basenpaar (bp) deletie, als eerste (NM_001003215.2: c.230_233del) (Mealey et al., 2001). Door het ontbreken van deze basenparen, ontstaat een leesraamverschuiving, wat resulteert in twee vroegtijdige stopcodons. De mutatie bevindt zich, zoals in Figuur 7 te zien is, in het eerste deel van het gen, aldus zal geen functioneel product gevormd worden. Zo mist het onvolledige product verscheidene essentiële domeinen zoals de substraat bindende domeinen, NBD en TMD (Fromm, 2004; Martinez et al., 2008; Mealey en Meurs, 2008). De mutatie kent een autosomaal recessieve overerving – op enkele uitzonderingen na, vertonen uitsluitend de homozygoot variant type honden het overgevoeligheidsfenotype (Mealey et al., 2001).



Figuur 7. Visualisatie van het *ABCB1*-gen. De 4-bp deletie mutatie bevindt zich in het eerste deel van het gen – een leesraamverschuiving genereert verschillende downstream stopcodons, resulterende in een affunctioneel product. De zwarte pijlpunt geeft de locatie van de 4-bp deletiemutatie aan, de twee zwarte pijlen duiden de vroegtijdige stopcodons aan. Uit: Mealey et al., 2001.

Echter, in bepaalde hondenrassen waar de mutatie niet beschreven werd, kan na toediening van ivermectine eveneens een overgevoeligheidsreactie worden waargenomen. De vraag of andere factoren, naast de genetische code van een bepaald dier, een rol spelen bij het ontstaan ivermectine overgevoeligheid, moet gesteld worden. Daarenboven bestaat de mogelijkheid dat andere mutaties aan de basis kunnen liggen van de overdreven reactie op bepaalde farmaca (Merola en Eubig, 2012). Multidruggevoeligheid veroorzaakt door de 4-bp deletie in het *ABCB1*-gen werd reeds in meerdere hondenrassen, voornamelijk collie-achtige lijnen, beschreven (Neff et al., 2004). In enkele rassen, onder meer de Labrador retriever en skyeterriër, waar de deletiemutatie nog niet beschreven werd, werd echter ook een ivermectine-overgevoeligheid vastgesteld. Deze bevinding suggereert een ander mechanisme van hypersensitiviteit tegenover de beruchte farmacologische producten als gevolg van een inadequate werking van de effluxpompen in de bloed-hersenbarrière (Mealey en Meurs, 2008).

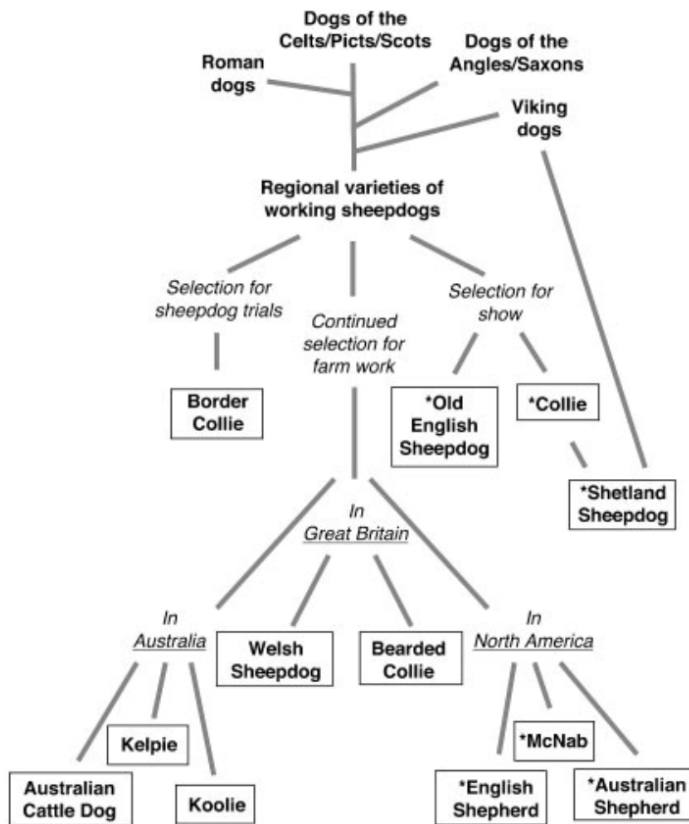
In het *ABCB1*-gen werd niet enkel de alom bekende 4-bp deletie beschreven. Bij de border collie werd een NC_006596.2: g.16692274A>C substitutiemutatie gevonden. De verandering zou potentieel een fenobarbital-resistente idiopathische epilepsie teweegbrengen (Mizukami et al., 2013).

3. Populatieverdeling

Het fenotype vertoont een Mendeliaans overervingspatroon. De 4-bp deletiemutatie in het *ABCB1*-gen concentreert zich in enkele specifieke rassen zoals Australian shepherds, Schotse collies, Swiss shepherds, Shelties, longhaired whippets en bobtails (Erkens et al., 2009; Klintzsch et al., 2010; Neff et al., 2004). In de populatie collies werd de grootste prevalentie van de c.230_233del mutatie opgemerkt (Geyer et al., 2005). Daar de 4-bp deletiemutatie voornamelijk terug te vinden is in bovengenoemde rassen, kon de origine van de mutatie terug getraceerd worden naar een gemeenschappelijke voorouder – een hond in Groot-Brittannië. Hoewel er een duidelijke distributie is in collie-achtige rassen, kon niet direct uitgemaakt worden of de mutatie bij longhaired whippets en silken windhounds identical by descent (IBD) of identical by state (IBS) is. Bij IBD is de mutatie in beide hondenlijnen terug te traceren naar eenzelfde voorouder, bij IBS is dit niet het geval en is de mutatie in beide rassen geïntroduceerd door afzonderlijke gebeurtenissen. Mealey et al. (2001) merkte een palindroom sequentie op in de buurt van het de 4-bp mutatie, wat als mutationale hotspot kan dienen (Mealey et al., 2001), aldus is het terugvinden van de mutatie in deze 2 afzonderlijke lijnen niet onwaarschijnlijk door IBS. De vraag of de mutatie in laatstgenoemde rassen en de typische collie-achtigen dezelfde oorsprong kent, werd beantwoord door Neff et al. (2004). De regio rondom het *ABCB1* gen, gelegen op chromosoom 14, werd in kaart gebracht door radiation hybrid analysis, 4 nabijgelegen merkers werden geselecteerd om aangetaste dieren te genotyperen. Door deze associaties te vergelijken tussen het homozygoot wild type allel en het mutante genotype, werd vastgesteld dat deze associaties sterk geconserveerd waren voor 3 van de 4 loci in zowel de herdershonden als de windhonden, aldus kent de mutatie mogelijks eenzelfde oorsprong. Hoewel de mutatie in beide lijnen afkomstig is van eenzelfde voorouder, is het tijdstip van segregatie in de rassen verschillend. Door gebruik te maken van haplotype – een vaste combinatie van allelen op een chromosoom – analyse werd vastgesteld dat de diversiteit aan mutante haplotypes binnenin de collie-achtigen groter was in vergelijking met de silken windhound en de longhaired whippet, wat bevestigt dat de mutatie slechts later in deze populaties geïntroduceerd werd. Ook zijn duidelijke geografische verschillen op te merken in distributie van de mutante haplotypes – de prevalentie van de verschillende mutante haplotypes tonen duidelijke verschillen tussen de Amerikaanse en Britse collie-achtigen, mogelijks te wijten aan genetisch drift (Neff et al., 2004). De collie-stamboom wordt weergegeven in Figuur 8.

Een populatie van working sheepdogs zou aan de bron liggen van de 4-bp deletiemutatie. Uit voorgenoemde populatie zijn de hedendaagse rassen voortgevloeid. Een eerste belangrijke subpopulatie is de border collie die voornamelijk zijn doel vond als herdershond, in het ras werd de mutatie echter in lage frequentie gezien (Mizukami et al., 2012). Verder werd geselecteerd op uiterlijke kenmerken, wat het ontstaan van de Schotse collie en old English sheepdog in de hand werkte. Het oorspronkelijke doel van de working sheepdogs bestond eruit te helpen op het land. Verdere selectie heeft geleid tot rassen zoals de Welsh sheepdog, bearded collie, McNab, English shepherd, Australian shepherd, kelpie en Australian cattle dog. Vreemd is het niet dat in vele van voorgenoemde rassen de mutatie werd aangetroffen. De recentere introductie van de mutatie in de populatie windhonden zou te wijten zijn aan een eerste kruising tussen

Shetland sheepdogs en longhaired whippets. Later werden borzois en silken windhounds verder ingekruist met de longhaired whippet, mogelijks de oorzaak van de distributie van de mutatie in deze lijnen (Neff et al., 2004).



Figuur 8. De stamboom die hoort bij de spreiding van de 4-bp deletiemutatie in het ABCB1-gen in de populatie collie-achtigen. De hedendaagse rassen zouden uit een populatie working sheepdogs ontstaan zijn. Ten gevolge van selectie op bepaalde kenmerken, werd de deletiemutatie in bepaalde rassen wel verspreid en in andere rassen, zoals de border collie, niet. In de rassen aangeduid met een asterisk (*) werd de 4-bp deletiemutatie beschreven. Uit: Neff et al., 2004.

Om de prevalentie in de populatie te bepalen werden talrijke studies in het verleden uitgevoerd. Hierbij werden doelgericht honden geïncludeerd waarbij de kans groot was om de 4-bp deletie aan te treffen. Over grote geografische gebieden is data beschikbaar omtrent de verspreiding van de mutatie in deze 'hoogrisicorassen' zoals de Schotse collie, Shetland sheepdog, Australian shepherd, old English sheepdog, longhaired whippet, silken windhound en border collie. De waargenomen frequenties van het variant allel in het ABCB1 gen in de bestudeerde rassen zijn over het algemeen vergelijkbaar tussen de studies. Zo liggen de gevonden allelische frequenties voor de Schotse collie tussen 51% en 73%, bij de Australian shepherd tussen 17% en 46%, bij de longhaired whippet tussen 29% en 42%, en voor de silken windhounds tussen 16% en 18%. Hoewel de mutatie in collie-achtigen wijdverspreid is, wordt de deletie in de populatie border collies nagenoeg niet waargenomen (Geyer et al., 2005; Gramer et al., 2011; Mealey et al., 2005; Mealey en Meurs, 2008; Neff et al., 2004; Tappin et al., 2012).

4. Belang in de diergeneeskunde

Hoewel er in humane geneeskunde erg veel onderzoek wordt verricht naar de veiligheid van een product op vlak van het individu, is dit in de diergeneeskunde nog in het beginstadium. Bij de hond worden eveneens verschillen waargenomen in gevoeligheid voor bepaalde farmaca tussen de rassen, daar genetische mutaties beschreven worden (Martinez et al., 2008). In de praktijk wordt de dierenarts menigmaal geconfronteerd met diergeneesmiddelen die verband houden met het al dan niet aanwezig zijn van een functionele effluxpomp. Niet alleen ivermectine, moxidectine en doramectine staan op de lijst van farmaca waar men indachtig moet zijn, ook loperamide, acepromazine, vincristine, doxorubicine en dexamethasone vullen deze lijst aan (Merola en Eubig, 2012).

Eens de mutatie die aan de basis ligt van het overgevoeligheidsfenotype geïdentificeerd was, werd ook onderzoek uitgevoerd naar andere substraten die eveneens substraten zijn van P-gp (Mealey et al., 2001).

Gezien het aanzienlijke gebruik van deze geneesmiddelen, wordt er gestreefd naar een veilig gebruik hiervan. Hoewel de 4-bp deletie voornamelijk in verband wordt gebracht met het bovengenoemde ivermectine overgevoeligheidsfenotype, worden eveneens andere niet-neurologische symptomen gezien bij toediening van P-gp substraten aan de 'hoogrisicorassen'. Afhankelijk van het werkingsmechanisme van het geneesmiddel kunnen diverse ziektebeelden, zoals immunosuppressie, waargenomen worden.

Dieren met twee kopijen van de deletievariant, MDR1-lijdende, krijgen ernstige symptomen bij inname van normale hoeveelheden van deze farmaca. Hetzelfde beeld werd slechts waargenomen bij heterozygote dieren, dragers, wanneer men een dosis van dergelijke farmaca toedient hoger dan de aanbevolen dosis, bijvoorbeeld bij de behandeling van gegeneraliseerde demodicose en microfilariose (Merola en Eubig, 2012). Desalniettemin wordt bij het gebruik van bepaalde chemotherapeutica, zoals vincristine, zowel bij heterozygoot als homozygoot variant type dieren hematologische toxiciteit waargenomen (Mealey et al., 2008). Alsook kunnen er in geval van een overdosis gelijkaardige symptomen bij wild-type dieren vastgesteld worden.

Een overdreven cyclosporine-geïnduceerde immunosuppressie werd bij de hond beschreven als gevolg van de 4-bp deletie. Cyclosporine wordt onder meer ingezet bij de behandeling van auto-immune aandoeningen. Immuun-gemedieerde hemolytische anemie, inflammatoire bowel disease en atopische dermatitis zijn indicaties voor het gebruik van dit specifieke immunosuppressivum. Een recent case-report wees uit dat het gebruik van een dosis cyclosporine, binnenin de normale range, een uitgesproken onderdrukking van de T-cellen in de circulatie teweeg kon brengen bij een MDR1-lijder. Er werden tal van gevolgen waargenomen, onder andere een vertraagde wondheling met secundaire bacteriële infecties. Het is aan te raden dat de dierenarts bij het opstarten van dergelijke therapie rekening houdt met een reactie van deze aard. Het testen op de aanwezigheid van de variant is een mogelijkheid, anderzijds zou in de praktijk geopteerd kunnen worden de dieren, waarbij men vermoedelijk te maken heeft met een MDR1-lijder, intensief te monitoren (Mackin et al., 2020). Bovendien gaat de aandacht de laatste jaren vaker naar alternatieve therapieën. Waar in het verleden breedspectrum immunosuppressiva de norm waren, wordt nu naar een specifiek alternatief gezocht met aldus minder nadelige effecten. Een ontzaglijk probleem bij het gebruik van de alom beschikbare immunosuppressiva is de aspecifieke werking – alle componenten van het immuunsysteem worden stilgelegd. Nauwer inspelen op de bron van de auto-immuunziekte zou doelgericht bepaalde componenten kunnen uitschakelen. Onder meer het gebruik van antistoffen tegen een afgebakend deel van de cel populatie – B-cellen – kan ervoor zorgen dat deze zelf geen antistoffen tegen lichaamseigen partikels meer kunnen genereren. Daarenboven exploreren diverse onderzoeksgroepen het concept van tolerantie als therapeutisch tool in auto-immuunaandoeningen. Door subcutane injectie van de lichaamseigen antigenen, zou langzamerhand tolerantie kunnen optreden (Swann en Garden, 2016).

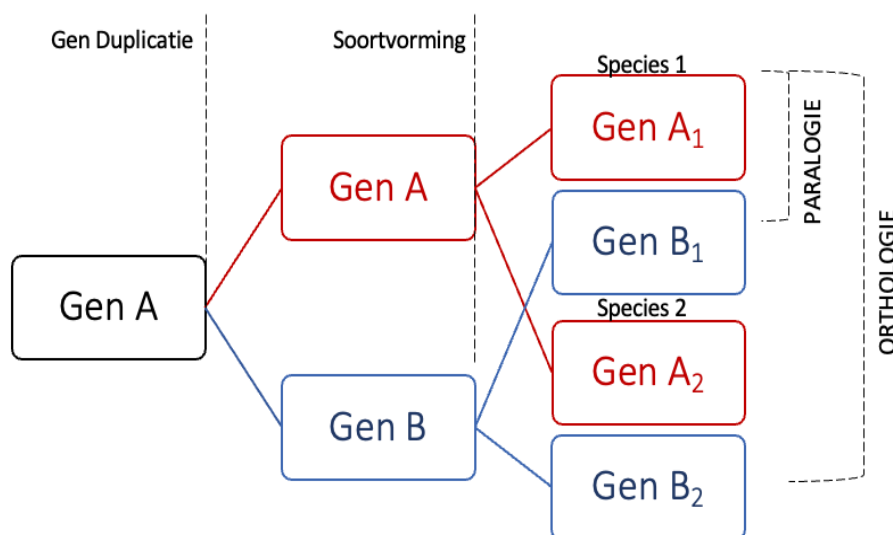
Wanneer men de overgevoeligheid over het hoofd ziet, kan dit desastreuze gevolgen hebben. Een doeltreffende therapeutische behandeling voor de overgevoeligheid is er tot op heden niet. Wanneer de hond slechts recent oraal ivermectine opgenomen heeft, bestaat de mogelijkheid om het dier te doen braken, al dan niet door gebruik te maken van een emeticum. Echter, wanneer de patiënt al neurologische symptomen ontwikkeld heeft, is het gevaar op verslikingspneumonie te groot, aldus wordt braken in dergelijke gevallen niet langer aangeraden. Een andere manier bestaat eruit actieve kool toe te dienen – actieve kool verhindert absorptie door adsorptie van verscheidene farmaca. Indien de hond toch symptomen vertoont, wordt symptomatisch behandelen aangeraden. Vloeistoftherapie en thermoregulatie worden bij elke kritieke patiënt toegepast, alsook kan zuurstoftherapie aangewezen zijn bij honden met ademhalingsdepressie (Merola en Eubig, 2012). Naast deze ondersteunende therapie, kan gebruik gemaakt worden van de intraveneuze lipid emulsion therapy, een techniek die de laatste jaren zijn opmars maakt in de anesthesie. Hoe deze therapie werkt, is tot op heden nog niet volledig ontcijferd. Het meest plausibele werkingsmechanisme is het zinken van de intraveneus toegediende vetbolus, wat zorgt voor het ontstaan van een vetlaagje. De lipofiele farmaca worden als het ware gevangen in dergelijke laag, hetgeen resulteert in een reductie van de vrije concentratie aan de toxische stoffen (Muller et al., 2015). Een probleem hierbij is dat het verwachte resultaat van de therapie niet bij homozygoot mutante honden wordt gezien. Een mogelijke theorie waarom behandeling niet effectief is bij dergelijke dieren, zou te

verklaren zijn door het feit dat de concentratie aan farmaca, zoals ivermectine, in het centraal zenuwstelsel al relatief hoger is in tegenstelling tot honden waar een functionele effluxpomp aanwezig is.

Wanneer het puur om het ivermectine overgevoeligheidsfenotype gaat, zouden er in de toekomst meer specifieke therapieën ter beschikking gesteld kunnen worden. Een alomvattende aanpak is er tot op heden niet, wel werden er positieve resultaten aangetoond met fysostigmine – een acetylcholine-esterase inhibitor. Tijdelijke klinische verbetering van de patiënt kon waargenomen worden. Frequente toediening wordt echter niet aangeraden omwille van de parasymphaticomimetische effecten, zoals speekselen, diarree, polyurie en tremoren. Een andere symptomatische behandeling die in aanmerking komt is flumazenil, een GABA-antagonist. Zoals eerder aangegeven zijn de neurologische effecten, gezien bij de overgevoeligheidsreactie tegenover ivermectine, te wijten aan een binding tussen ivermectine en de GABA-receptor. Bij het toedienen van een GABA-antagonist wordt de binding tussen het macrocyclisch lacton en de receptor verhinderd. In experimentele studies op muizen werd een voordelig effect aangetoond, echter tot op heden zijn er geen concrete resultaten beschreven bij honden met een ivermectine overgevoeligheidsreactie (Merola en Eubig, 2012). Het aloude gezegde: “voorkomen is beter dan genezen”, is in deze situatie dan ook zeer toepasselijk.

5. Over de species heen

De evolutietheorie vormt een fundamenteel element in comparatieve studies. In proces van evolutie vormt duplicatie van genen een belangrijk basiselement, daar telkens bijkomende functies kunnen ontstaan. De ABC-genen creëren een ideaal uitgangspunt om evolutie van genfamilies te bestuderen – de ABC proteïnes omvatten een verscheidenheid aan membraanpompen, bovendien bevat elk meercellig organisme minstens één lid uit het scala aan ABC proteïnes (Annilo et al., 2006). Homologie – een concept in vertebraten evolutie dat overeenkomstigheid van structuren of genen verklaart in verschillende taxa door een gedeelde voorouderlijke soort – kan verder in paralogie en orthologie opgedeeld worden. Paralogie verklaart gelijksoortigheid door duplicatie van genen en meestal gebeurt dit proces binnenin een soort. Orthologie berust op het principe van soortvorming. Een nieuwe soort ontstaat door afsplitsing van een vooroudersoort onder invloed van bijvoorbeeld een verandering in habitat (Damas et al., 2020). De twee concepten, orthologie en paralogie, worden verder verduidelijkt in Figuur 9.



Figuur 9. Het evolutieproces van de vertebraten. Homologie is een principe dat de gelijkaardige structuren en genen verklaart in vertebraten. Paraloge genen zijn genen die verwantschap tonen als gevolg van duplicatie. Een orthologe genen zijn genen die in verschillende verwante species worden gevonden als gevolg van soortvorming. Het ABCB1-gen is terug te traceren naar de eerste vertebrate vissen, ook de mens bezit dit gen (orthologie). Als gevolg van duplicatie is het ABCB4- gen hieruit ontstaan bij de zoogdieren (paralogie) (Annilo et al., 2006).

Met het bovenbeschreven principe in gedachten, is het niet meer dan logisch dat het ABCB1-gen – alsook mogelijke disfuncties – in een diversiteit aan species voorkomt. Bij katten wordt een 2-bp deletiemutatie (NM_001171064.2: c.1930_1931del) beschreven in het ABCB1-gen, wat resulteert in een vroegtijdig stopcodon en aldus een afunctioneel product. Hoewel de 2-bp deletie mutatie significant voorkomt in katten met een overgevoeligheidsreactie tegen macrocyclische lactonen, is het belang van de mutatie tot op heden niet volledig opgehelderd. In contrast met de 4-bp deletie gevonden in een concreet afgebakend

deel van de hondenpopulatie, wordt bij de kat geen specifiek ras naar voren geschoven waarbij de mutatie significant meer beschreven wordt. Vergelijkbaar met het ivermectine overgevoelighedsfenotype bij de hond, worden bij de kat neurologische ziekte tekens waargenomen na toediening van P-gp substraten (Mealey et al., 2023; Mealey en Burke, 2015). Recent onderzoek beschreef de 2-bp deletie in Maine coon katten – toediening van ivermectine resulteert in neurologische symptomen. Analooq met de bevindingen bij de hond werden de klinische tekens slechts in homozygoot variant type dieren waargenomen. Aansluitend op de bevindingen bij de aangetaste Maine coon katten, werden verwante katten gegetotypeerd – de helft van de verwante dieren droeg 1 variant type allel (Nürnberg et al., 2022).

In de humane geneeskunde wordt een overdreven gevoeligheid tegenover de avermectines en bepaalde chemotherapeutica (lenalidomide en irinotecan) waargenomen. Tegelijkertijd worden diverse polymorfismen in het *ABCB1*-gen beschreven. Eén duidelijk causale mutatie zoals de 4-bp deletie bij de hond, is er niet. Uit een casereport werden twee mogelijke mutaties naar voren gebracht bij de mens – NM_000927.4: c.2380C→T en NM_000927.4: c.3053_3056del – waarbij een vroegtijdig stopcodon gegenereerd wordt en aldus een afnunctioneel P-gp wordt gevormd. Bovenstaande polymorfismen in het *ABCB1*-gen van het individu waar neurotoxiciteit na het toedienen van avermectine waargenomen werd, konden beide teruggevonden worden in de patiënt. Daar beide variante allelen in één individu kunnen voorkomen, kunnen mensen compound heterozygoot zijn en toxiciteit vertonen tegenover avermectine zonder homozygotie (Baudou et al., 2020). Compound heterozygotie beschrijft een toestand waarbij een individu 2 verschillende mutant recessieve allelen bezit die in normale heterozygote toestand in een gezond fenotype zou resulteren. In het verhaal van de overgevoelighedsreactie heeft het individu beide variant type allelen afzonderlijk overgeërfd van de ouderdieren, met het overgevoelighedsfenotype tot gevolg. Additioneel worden diverse single nucleotide polymorfismen (SNP's) in het *ABCB1*-gen gerapporteerd, het belang hiervan dient met een kritische blik geëvalueerd te worden (Hoffmeyer et al., 1999). Resultaten uit eerder uitgevoerde studies vertonen vaak enige tegenstrijdigheid. Zo kan een bepaalde SNP in de ene studie met een verhoogde gevoeligheid tegenover P-gp substraten gecorreleerd worden en in een andere studie net gepaard gaan met een ongevoeligheid. Een mogelijke reden voor het tekort aan eenduidigheid omtrent het klinisch belang van deze SNP's is het voorkomen van drug-drug interacties, verschillen in etnische bevolkingsgroepen en het recessief karakter van de mutaties in het *ABCB1*-gen. Het feit dat één wild type allel voldoende is om een sufficiënte werking van P-gp te verkrijgen, zorgt ervoor dat het fenotype uitsluitend in een toestand van homozygoot variant type gezien wordt (Macdonald en Gledhill, 2007). Het recessief overervingspatroon draagt tevens bij aan de oorzaak van het tot uiting komen van de neurologische symptomen in het compound heterozygoot individu – twee verschillende recessieve mutante allelen resulteren in een complete depletie van P-gp. Bijkomend is inteelt en kunstmatige selectie in het dierenrijk geen zeldzaamheid, bij de mens daarentegen wel: het twee maal verkrijgen van hetzelfde (variante) allel door een gemeenschappelijke voorouder komt daardoor veel frequenter voor bij de hond dan bij de mens (Mooney et al., 2021). Bij de honden is een duidelijke ras predispositie beschreven, in sommige rassen komt de 4-bp deletiemutatie ruwweg in 70% van het ras voor (Mealey et al., 2023). Daar de polymorfismen die gepaard gaan met een overgevoelighedsreactie eerder zeldzaam zijn bij de mens, zou een mogelijke hypothese voor de mindere spreiding van deze SNP's een mindere mate van (onbewuste) selectie en fixatie van de variant type allelen zijn.

Recent werd een overgevoelighedsreactie na toediening van doramectine – een lid van de macrocyclische lactonen – eveneens beschreven bij een enkele geit. Het *ABCB1*-gen werd gesequeneerd bij de gevoelige geit, vervolgens werd de sequentie vergeleken met nauw verwante dieren. Slechts één mogelijke single nucleotide polymorfisme werd geïdentificeerd. Daar deze SNP eveneens een toevalsbevinding kan zijn, is verder onderzoek nodig. Bovendien werd er gebruik gemaakt van mRNA als uitgangspunt voor sequenering, aldus kan er geen uitspraak gedaan worden over mogelijke polymorfismen in het niet-coderend DNA. Een etiologie naast de genetische code van het dier voor de neurologische ziekte tekens kan eveneens niet geëxcludeerd worden (Nürnberg et al., 2021).

In een gesloten Murray grey veestapel werden eveneens gevallen beschreven van neurologische ziekte tekens na toediening van avermectine. Initieel vertonen de runderen incoördinatie, doorbuigen van het carpaal gewricht, wiegende gang, afhingende oren, spierfasciculaties, speekselen en blindheid. In een

later stadium kunnen de dieren verlamingsverschijnselen tonen, het besef van hun omgeving verliezen en sterven. De gerapporteerde gevallen maken deel uit van een kudde die al 15 jaar genetisch stabiel is – de afgelopen decennia werden er geen nieuwe dieren in de Murray grey veestapel geïntroduceerd. In andere rundveestapels werd het overgevoeligheidsfenotype tot op heden nog niet beschreven. Gedurende een autopsie uitgevoerd op de overleden dieren werden geen noemenswaardige histopathologische veranderingen gevonden. Additioneel werd de concentratie ivermectine in de hersenen gemeten in een aangetast dier en een klinisch normaal dier – de concentratie van het geneesmiddel was 15 maal hoger in de hersenen van het aangetaste dier. Een disfunctioneel P-gp werd gehypothetiseerd, aangezien er geen DNA sequencering uitgevoerd werd, kan er geen conclusie genomen worden (Seaman et al., 1987).

Muizen vervullen een cruciale rol in de onderzoekswereld, de snelle reproductiecyclus, relatief korte levensduur en mogelijkheid tot inteeltlijnen maken muizen de perfecte *in vivo* modellen (Bryda, 2013). In de populatie wilde muizen is er tot op heden geen onderzoek uitgevoerd naar het natuurlijk voorkomen van een ivermectine overgevoeligheidsfenotype geassocieerd met een gecompriëerde P-gp werking, niettemin wordt in het onderzoek het *ABCB1* knock-in/knock-out model menigmaal gebruikt. Tevens werd een ivermectine overgevoeligheidsreactie beschreven in een subpopulatie muizen van het CF-1 type. Het fenotype komt in ruwweg 25% van deze inteeltlijn voor. Dit subtype proefdieren wordt naast het gebruik in algemene dierproeven eveneens ingezet bij efficaciteit- en veiligheidstesten (Dagenais et al., 2009; Lankas et al., 1997). De mogelijkheid om muizen te gebruiken als modellen voor de mens en andere zoogdieren, heeft de wetenschap te danken aan orthologie (Annilo et al., 2006). Door het ivermectine overgevoeligheidsfenotype bij de muis te induceren, kunnen modellen ontwikkeld worden om de veiligheid van bepaalde therapeutica na te gaan alvorens deze bij de doeldiersoort te gebruiken (Swain et al., 2013). Een belangrijke kanttekening hierbij is dat hoewel er veel gelijkenissen tussen het P-gp van de muis en andere species zijn, niet elke bevinding geëxtrapoleerd kan worden.

Probleemstelling en doelstelling

In de diergeneeskundige praktijk wordt de dierenarts menigmaal geconfronteerd met ontwormingspreparaten (ivermectine), geneesmiddelen tegen kwaaltjes van het maagdarmstelsel (loperamide) en ontstekingsremmers (dexamethasone). Het gebruik van deze farmaca is vanzelfsprekend en in het merendeel van de patiënten zal er geen probleem zijn. Echter, bij bepaalde honden zou er een voetnoot aan het gebruik moeten verbonden zijn. De reden hiervoor is de disfunctionele effluxpomp op de bloed-hersenbarrière, P-glycoproteïne. Het verantwoordelijke gen – *ABCB1* – mist namelijk 4 basenparen dichtbij het 5' uiteinde, wat resulteert in een leesraamverschuiving waardoor een affunctioneel eiwit wordt gevormd. De mutatie werd voor het eerst beschreven in Schotse collies. Later vullen ook Shetland sheepdogs, Australian shepherds, old English sheepdogs en aanverwanten de lijst aan. Waar initieel enkel het ontwormingsmiddel ivermectine gelinkt werd aan een overgevoeligheidsreactie, werden de laatste decennia behoorlijk wat routinematig gebruikte farmaca ontmaskerd als P-gp-substraten. Tot op heden werden er geen prevalentiestudies uitgevoerd in de volledige hondenpopulatie. In contrast hiermee is de toestroom aan informatie over de spreiding van de 4-bp deletiemutatie in de populatie 'hoogrisicorassen' immens – informatie over de prevalentie in de Europese hondenpopulatie is rijkelijk terug te vinden. Een belangrijke vraag hierbij is in welke mate deze mutatie in de Belgische hondenpopulatie verankerd zit, en bijkomend of routinematig testen nodig is?

Het algemeen doel van deze studie was om het risico dat gepaard gaat met het gebruik van P-gp substraten, zoals ivermectine, in kaart te brengen. Gedurende een periode van 4 maanden werden restbloedstalen uit de kliniek kleine huisdieren (faculteit diergeneeskunde, Universiteit Gent) verzameld. Er werden geen specifieke exclusiecriteria vooropgesteld, de gegenotypeerde populatie was representatief voor een alledaagse praktijkpopulatie. De EDTA-reststalen ondergingen een ruwe DNA-extractie en werden vervolgens, naargelang de kwaliteit van het bloedstaal, onderworpen aan enerzijds PCR gevolgd door Sanger sequencing of anderzijds qPCR. Tevens werden de resultaten van de routine genetische testen, uitgevoerd door het laboratorium voor dierlijke genetica, onderzocht. De routinematig gegenotypeerde honden omvatten voor een groot deel 'hoogrisicorassen'. Er wordt verwacht dat de prevalentie die uit deze DNA-testen komt, gelijkaardig is met wat in eerder uitgevoerde prevalentiestudies beschreven werd.

Deze masterthesis zal in de eerste plaats de prevalentie van de 4-bp deletiemutatie in het *ABCB1*-gen in de populatie praktijkhonden blootleggen en bijkomend de gelijkenissen of verschillen met de resultaten uit de routinematige genetische testen benadrukken. Als eindresultaat zou een conclusie genomen kunnen worden omtrent de noodzaak van DNA-testen alvorens een hond ivermectine (en andere bovengenoemde P-gp substraten) toe te dienen.

Materiaal en methode

Bepaling van de steekproefgrootte

Alvorens aan het werkelijk onderzoek te beginnen, werd de benodigde steekproefgrootte bepaald. Dit werd gedaan door rekening te houden met volgende factoren: geschatte allelfrequentie en de waarschijnlijkheid om het variant allel in een oneindige populatie op te sporen. In de literatuur wordt deze allelfrequentie geschat op 20% ($\alpha = 0,2$), daar deze frequentie gebaseerd is op een genetisch geteste populatie, werd de werkelijke frequentie geschat op een waarde met een factor 5 à 10 lager. Aldus bekomen we een geschatte frequentie voor het variant allel van 0,04 tot 0,02. De waarschijnlijkheid om het variant allel te missen werd geplaatst op 1% ($\sigma = 0,01$) wat logischerwijs overeenkomt met een waarschijnlijkheid om het allel te detecteren van 99%. Berustend op de studie van Gregorius (1980), weergegeven in Figuur 10, werd een minimum steekproefgrootte van 265 honden – 530 allelen – bepaald (Gregorius, 1980).

The minimum sample size $N(\alpha, \sigma)$ of genotypes required to ensure that all alleles at a locus with frequencies $\geq \alpha$ are detected with probability $\geq 1 - \sigma$

α	$N(\alpha, \sigma = .05)$	$N(\alpha, \sigma = .01)$	$N(\alpha, \sigma = .001)$
.500	6	8	11
.400	7	10	14
.300	11	15	22
.200	21	28	39
.100	51	66	88
.090	57	74	99
.080	65	84	112
.070	77	99	131
.060	92	119	156
.050	117	149	194
.040	152	192	249
.030	212	265	341
.020	341	422	536
.010	754	916	1146
.009	850	1030	1285
.008	972	1174	1462

Figuur 10. De waarschijnlijkheid om het variant allel te missen werd gezet op 0,01%, wat overeenkomt met een waarschijnlijkheid van 99% om het variant allel op te sporen. Een geschatte allelfrequentie van 3% – gebaseerd op een gecorrigeerde allelfrequentie van 20% – werd gebruikt in de formule. Aldus werd een steekproefgrootte van 265 honden bekomen Uit: Gregorius, 1980.

Staalname

Gedurende de periode november 2021 tot februari 2022 werden er stalen verzameld. Er werd gebruik gemaakt van EDTA-reststalen uit de kliniek kleine huisdieren van de faculteit diergeneeskunde, universiteit Gent. De bloedstalen mochten afkomstig zijn van honden met verschillende leeftijden, rassen en geslacht.

DNA-extractie

Alvorens de werkelijke DNA-testen uit te voeren, dient het erfelijk materiaal geïsoleerd te worden uit de bloedstalen. De erythrocyten zijn kernloos, aldus zijn deze cellen overbodig voor de DNA-test. Het DNA bevindt zich in de leukocyten, het doel van de ruwe DNA-extractie bestaat eruit deze witte bloedcellen te scheiden van de rode bloedcellen.

Gedurende het ganse proces van DNA-extractie werden handschoenen gedragen om zo min mogelijk contaminatie te bekomen. De EDTA-bloedstalen werden gezwenkt alvorens te beginnen met het pipetteerwerk.

Een eerste stap van een ruwe DNA-extractie bestond eruit 100 μ l bloed in een kleiner epje (Eppendorf, 1,5 ml) te pipetteren. Deze stap wordt best uitgevoerd met een 1000 μ l pipet om de contaminatie tussen het pipetteerwerk door te minimaliseren. Eveneens werd de pipet gedecontamineerd tussen de verschillende bloedstalen door, door gebruik te maken van een dettol-oplossing.

Vervolgens werd 500 μ l TE-buffer aan het bloed toegevoegd. De samenstelling van de TE-buffer is terug te vinden in Tabel 1. De testtube werd gesloten, het bloed werd vervolgens met de TE-buffer gevortext aan een middelhoge snelheid. Dergelijke stap zorgt voor een nauw contact tussen de twee materies. Na het vortexen werden de testtubes 30 seconden gecentrifugeerd aan 13200 tpm. Er vormde zich een laagje van

cellen op de bodem van de testtube, de cellplatelet. De bovenste laag van de testtube, het supernatans, werd opgezogen en in een container gedeponeerd. Het toevoegen van TE-buffer, vortexen en centrifugeren werd herhaald tot het supernatans een heldere kleur heeft aangenomen. Meestal was dit een 3-tal keer nodig.

Aan het overgebleven cellaagje werd 100 µl lyse buffer K toegevoegd. Lyse buffer K is samengesteld uit proteïnase K en lyse buffer in een 1:200 verhouding. Proteïnase K is een enzym dat eiwitten af kan breken, het wordt vaak gebruik tijdens de zuivering van DNA om achtergrond te verwijderen.

De testtube werd 45 minuten aan 65°Celsius (°C) opgewarmd, vervolgens 10 minuten aan 95°C. Dergelijke stap zorgt voor een deactivatie van het proteïnase K. De laatste stap van de DNA-extractie bestond uit het centrifugeren van de testtube aan 13200 tpm voor één minuut.

Tabel 1. DNA extractie

TE-buffer (bewaren bij 4°C)	
0,5 ml Tris-HCl (1M) (pH 8)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
0,25 ml EDTA (0,2 M) (pH 8)	Thermo Fischer Scientific
Aanlengen tot 50 ml met H ₂ O (Milli-Q)	Thermo Fischer Scientific
Lyse buffer (bewaren bij 4°C)	
0,5 ml Tris-HCl (1M) (pH 8,3)	Thermo Fischer Scientific
2,5 ml KCl (1M)	VWR International, Radnor, PA, USA
0,25 ml Tween 20	Sigma-Aldrich
Aanlengen tot 50 ml met H ₂ O (Milli-Q)	Thermo Fischer Scientific
Proteïnase K (bewaren bij -20°C)	
250 mg Proteïnase K	Thermo Fischer Scientific
12,5 ml Tris-HCl (10mM) (pH 7,5)	Thermo Fischer Scientific

DNA-testen

Polymerase chain reaction (PCR)

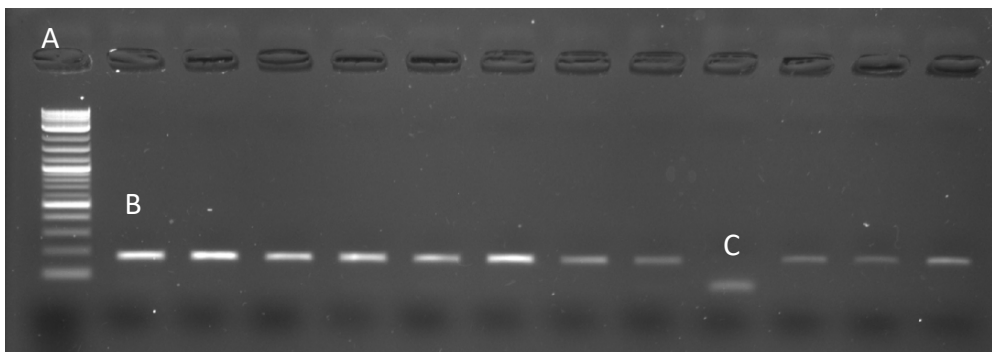
PCR is een DNA-replicatie techniek die werd ontwikkeld in 1983 door nobelprijswinnaar Kary Mullis. De belangrijkste toepassing van PCR bestaat uit het amplificeren van een specifiek stukje op de DNA-streng – een gen of een stuk van een gen. Daarenboven wordt PCR gebruikt bij identificatie van infectieziekten, zeker bij traaggroeiende kiemen zijn alternatieve diagnostische tools voor kweek essentieel. Alsook wint PCR aan belang in de oncologie – meer specifiek bij lymfoma en leukemie – door het opsporen van translocatie specifiek maligne cellen (Rahman et al., 2013).

PCR wordt steeds uitgevoerd volgens dezelfde basisprincipes. Een eerste vereiste is het DNA waarop de te amplificeren regio gelegen is (template), verder zijn twee primers nodig die het begin en einde van de regio aangeven. Een primer is een stuk artificieel DNA, meestal niet meer dan 20 nucleotiden lang, complementair aan de begin- of eindsequentie van het te amplificeren stuk DNA. Taq polymerase is het enzym betrokken bij vermenigvuldiging van het gewenste stuk DNA. Om amplicons – amplificaties van het gewenste stuk DNA – te creëren zijn nucleotiden als bouwstenen van de nieuwe streng nodig, aldus is het nodig deze nucleotiden toe te voegen aan de mix. Finaal is een gepast milieu essentieel om de reactie te voltrekken, hiervoor wordt er gebruik gemaakt van een buffer (Rahman et al., 2013). De verschillende componenten van de PCR-mix kunnen teruggevonden worden in Tabel 2.

PCR bestaat uit een opeenvolging van 20 à 35 cycli, telkens bestaande uit dezelfde 3 stappen – denaturatie, annealing en extensie. Denaturatie wordt bekomen door kortstondig het PCR-product te verhitten, de waterstofverbindingen tussen de twee strengen van het DNA worden verbroken. Voorafgaand aan de eigenlijke PCR wordt vaak een langere periode van verhitting aangehouden, een ‘hot-start’, typisch bij 95°C. Dit is een vereiste stap om het Taq polymerase te activeren. In deze studie werd het PCR-product tot 95°C verhit, dit gedurende 30 seconden. Annealing – de complementaire primers binden op het gewenste stuk

DNA – gaat typisch aan een lagere temperatuur door. Deze temperatuur is eigen aan de gebruikte primers. In deze studie bedroeg de annealing temperatuur 56°C, eveneens gedurende 30 seconden. Na de annealing stap moet het ontbrekende stuk DNA tussen de 2 primers opgevuld worden met behulp van DNA-polymerase aan een temperatuur eigen aan het gebruikte enzym. In deze studie was dit 72°C gedurende 1 minuut. Als basisregel voor de duur van de laatste fase wordt er 1 minuut per 1 kilobasenpaar (kbp) gerekend (Garibyan en Avashia, 2013; Rahman et al., 2013). In Tabel 6 worden de verschillende stappen van de PCR weergegeven.

PCR werd in deze studie uitsluitend gebruikt om het gewenste DNA-fragment te amplificeren. Ter controle werd, aansluitend op de PCR, een agarose gel elektroforese uitgevoerd. De samenstelling van de agarose gel is terug te vinden in Tabellen 3 en 4. Het principe van gel elektroforese is gebaseerd op enkele basiselementen – een elektrische stroom, de poriegrootte bepaald door de agaroseconcentratie en de moleculaire massa. Alvorens het PCR-product in de gel te brengen, werd een ladingsbuffer toegevoegd om het product massa te geven. DNA-moleculen dragen een negatieve lading, het PCR-product wordt aan de zijde van de kathode in de gel gebracht, door de elektrische stroom verplaatsen de moleculen zich in de richting van de anode. Wanneer een fragment een grotere moleculaire massa heeft, zal dit fragment zich na verloop van tijd dichterbij de kathode bevinden. Het tegenovergestelde geldt voor kleinere fragmenten, dergelijke moleculen kunnen verder en efficiënter doorheen de gel migreren op eenzelfde tijdsbestek. In de eerste uitsparing van de gel werd een referentieladder gebracht – hierdoor kan de grootte van het fragment ingeschat worden. De laatste uitsparing werd geladen met een negatieve controle. Indien contaminatie van het PCR-product heeft plaatsgevonden, kan dit via deze weg onderkend worden. De gel is kleurloos op zich, om het DNA zichtbaar te maken dient Ethidiumbromide (EthBr) – een product dat onder Ultraviolet (Uv) licht zichtbaar wordt – aan de agarose gel toegevoegd te worden (Green en Sambrook, 2019). De agarose gel na blootstelling aan Uv-licht is te zien in Figuur 11.



Figuur 11. Agarose gel geladen met PCR-product na blootstelling aan Uv-licht. (A) 1kbp referentie-ladder. (B) geamplificeerde DNA-fragmenten (180bp). (C) primer dimeren – door binding tussen de primers worden er dimeren gevormd.

PCR zorgt ervoor dat het DNA elke cyclus verdubbelt, een exponentiële amplificatie dus van het gewenste fragment. Echter, na een bepaald aantal cycli wordt een eerder lineaire functie aangenomen – er zijn meer primer-template producten dan polymerase. Indien het proces van amplificatie nog verder doorgaat, zal een plateau ontstaan. De vorming van primer dimeren, zoals aangegeven in Figuur 9, zullen eveneens de amplificatie hinderen. Het zijn bindingen tussen de primers – er zal minder amplicon gevormd worden, alsook zullen niet-specifieke DNA-producten ontstaan. In het verleden werden studies uitgevoerd om dit fenomeen beter te begrijpen. Nucleotiden toevoegen aan het inactieve uiteinde (5') van de primer zou dimeervorming reduceren, daar annealing van de primers niet meer plaatsvindt (Brownie et al., 1997). Anderzijds zou de annealing temperatuur een invloed hebben op dimeervorming – een hogere temperatuur zou de vorming ervan onderdrukken. Het gebruik van een 'hot-start' – voorafgaand aan de PCR een periode van hoge temperaturen aanhouden – zou hierbij hulp bieden (Das et al., 1999).

Alvorens sequencering kon plaatsvinden, diende het amplicon gezuiverd te worden. Er werd gebruik gemaakt van ExoAp, een mengsel van exonuclease en shrimp alkaline phosphatase. Het enzym exonuclease zorgt voor de afbraak van primers. Fosfatase verwijdert de fosfaatgroepen van 5' en 3' uiteindes van het DNA, daarenboven worden niet ingebouwde deoxynucleotiden (dNTP's) verwijderd. De compositie van het ExoAp-mengsel is terug te vinden in Tabel 5.

Tabel 2. PCR-mix

5,7 µl H ₂ O (Milli-Q)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
1,0 µl 10x Key buffer	VWR International, Radnor, PA, USA
1,0 µl Primers (5 µM each)	Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA
F: 5'-GATAGGTTGTATATGTTGGTG-3'	
R: 5'-CTAAGATCAGTGCCACAA-3'	
0,2 µl dNTPs (10 mM each)	VWR International
0,1 µl TEMPase Hotstart DNA polymerase (5 U/µl)	VWR International
2,0 µl DNA Template	
10,0 µl Totaal volume PCR-product	

Tabel 3. 1% agarose-gel

0,5 g agarose	Chem-Lab, Zedelgem
50 ml 10x TBE buffer	
10,0 µl Ethidiumbromide	VWR International

Tabel 4. 2L 10x TBE buffer

109,03 g TRIS	Gentaur
55,65 g Boorzuur	VWR International
40 ml EDTA (0,5M) (pH 8,0)	Thermo Fischer Scientific
Aanlengen tot 2l met H ₂ O (Milli-Q)	Thermo Fischer Scientific

Tabel 5. ExoAP

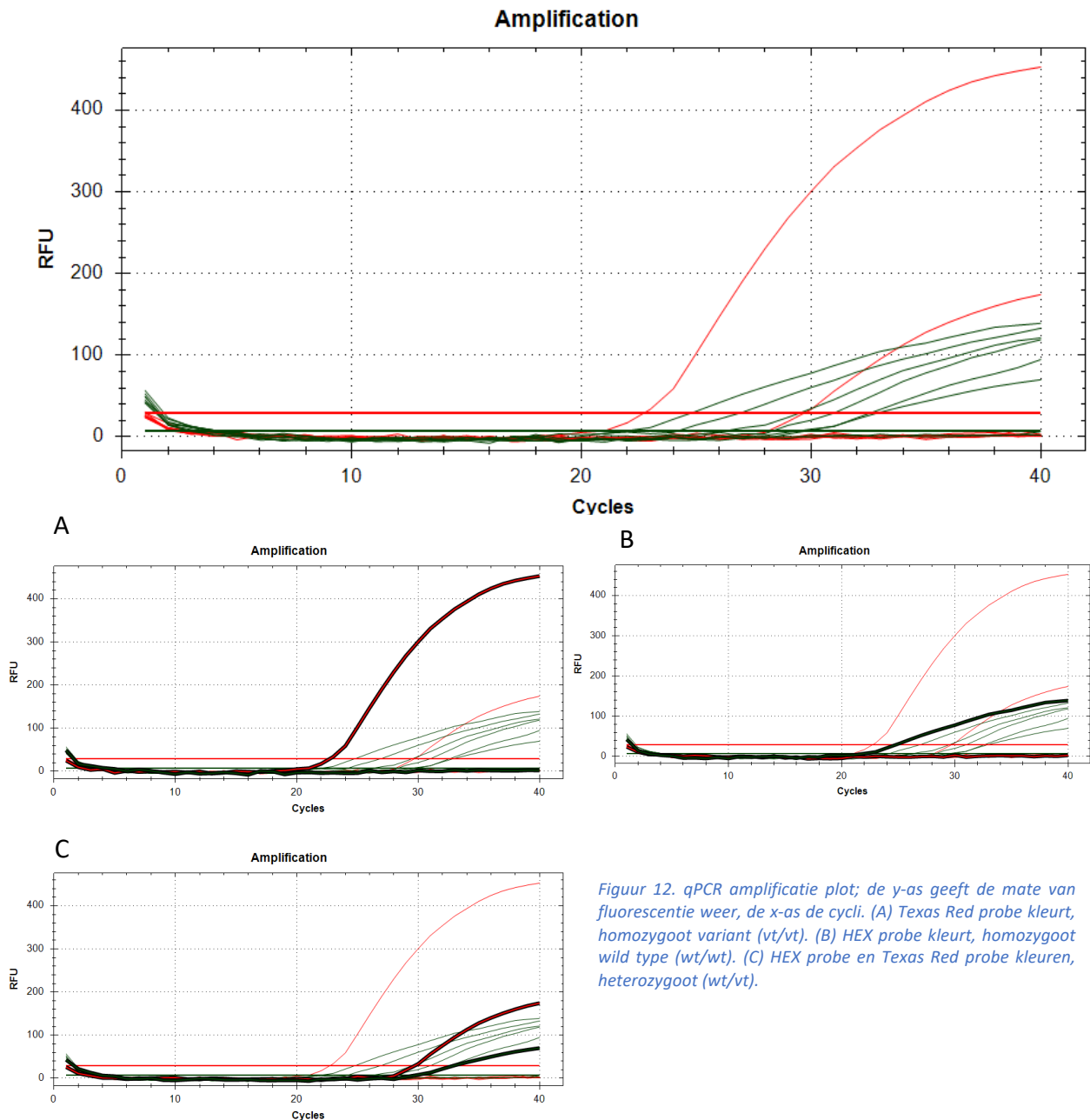
0,2 µl Exonuclease I (20U/µl)	Chem-Lab, Zedelgem
0,4 µl Shrimp alkaline phosphatase (5 U/µl)	New England Biolabs, VS

Tabel 6. PCR/qPCR programma

14'30" - 95°C	Hot start
00'30" - 95°C	Denaturatie
00'30" - 56°C	Annealing
01'00" - 72°C	Extensie
Stappen 2, 3 en 4 worden 29 x herhaald	
04'00" - 72°C	
Hold - 15°C	

Kwantitatieve PCR (qPCR)

Met behulp van PCR wordt slechts amplificatie van het fragment DNA bekomen, bij qPCR wordt er eveneens gedetecteerd hoeveel product er na amplificatie is. De principes waarop PCR rust, worden ook bij qPCR teruggevonden, additioneel zijn er fluorescente probes nodig bij een qPCR (Jalali et al., 2017). De TaqMan probe heeft een quencher en een fluorofoor. De probe bindt op een DNA-fragment, wanneer replicatie door polymerase plaatsvindt, zal de probe degraderen, aldus zal de afstand tussen de quencher en het fluorofoor vergroten. Normaal onderdrukt de quencher het fluorofoor, wanneer deze onderdrukking wegvalt, zal dit tot fluorescentie leiden (Heid et al., 1996). De probes die gehanteerd werden in deze studie zijn de Texas Red (TTGCAAAGCTGTCATGTTCC) probe en HEX (TGCAAAGCTATCTGTCATGTTTC) probe. De HEX probe zal signaal uitzenden wanneer het wild type allel gesynthetiseerd wordt, de Texas Red probe zendt signaal uit bij synthese van het variant type allel, daar deze de deletiemutatie bevat. De probes zijn reverse probes (3' – 5') – het *ABC1*-gen is gelegen op de forward streng. Het resultaat van de qPCR is af te lezen uit de amplificatie plots, weergegeven in Figuur 12. Afhankelijk van de gebruikte probes en het fluorescentiesignaal kan de aan- of afwezigheid van het variant type allel nagegaan worden.



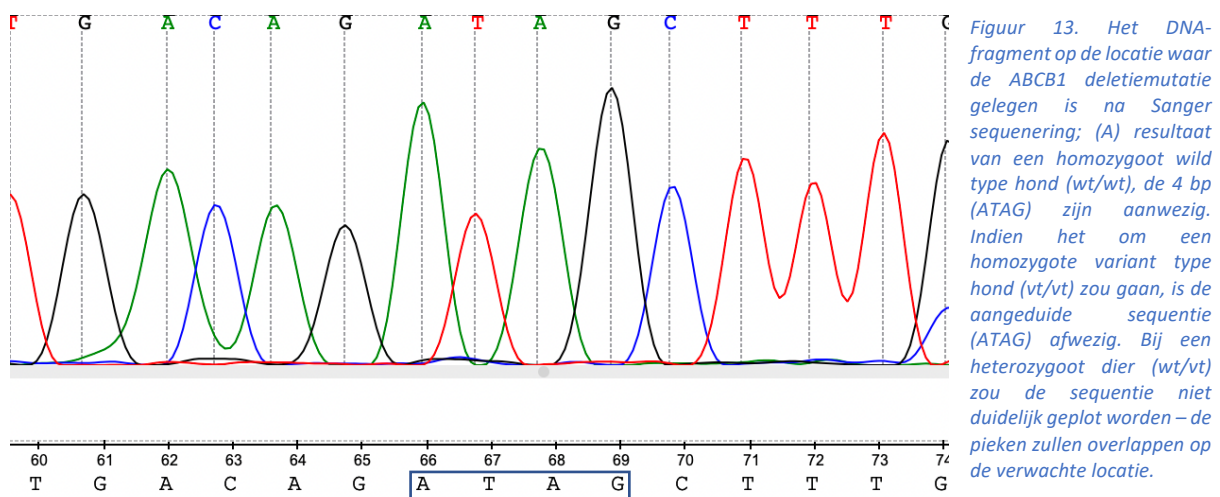
Figuur 12. qPCR amplificatie plot; de y-as geeft de mate van fluorescentie weer, de x-as de cycli. (A) Texas Red probe kleurt, homozygoot variant (vt/vt). (B) HEX probe kleurt, homozygoot wild type (wt/wt). (C) HEX probe en Texas Red probe kleuren, heterozygoot (wt/vt).

Tabel 7. qPCR-mix

5,5 µl H ₂ O (Milli-Q)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
1,0 µl 10x Key buffer	VWR International, Radnor, PA, USA
0,4 µl Primers (5 µM each)	Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA
F: 5'-GATAGGTTGTATATGTTGGTG-3'	
R: 5'-CTAAGATCAGTGCCACAA-3'	
0,4 µl Wt probe (10 µM each)	Integrated DNA Technologies
0,4 µl Vt probe (10 µM each)	Integrated DNA Technologies
0,2 µl dNTPs (10 mM each)	VWR International
0,1 µl TEMPase Hotstart DNA polymerase (5 U/µl)	VWR International
2,0 µl DNA Template	
10,0 µl Totaal volume qPCR product	

Sanger sequencing

Sanger sequencing wordt gezien als “first-generation” DNA sequencing (Rizzo en Buck, 2012). Het principe van Sanger sequencing is gebaseerd op gel elektroforese en gelabelde nucleotiden. Sanger sequencing werd aansluitend op een gewone PCR uitgevoerd. De elementen die essentieel zijn om sequencing via Sanger te bekomen worden opgelijst in Tabel 9 en 10. De Sanger sequencing-mix bestaat uit een sequentie primer, fluorochroom gelabelde dideoxynucleotiden, polymerase en een sequentiebuffer. In het geval van de 4-bp *ABCB1* mutatie was dit de forward primer. De primer bindt op het DNA-fragment, polymerase zorgt voor verdere opbouw van de streng – enerzijds worden normale nucleotiden (2'-deoxynucleotiden) ingebouwd, anderzijds 2',3'-dideoxynucleotiden (ddNTPs). Dideoxynucleotiden missen de 3'-hydroxylgroep die nodig is om fosfodi-esterbinding te vormen tussen de nucleotiden, aldus zal de DNA-synthese eindigen wanneer een ddNTP ingebouwd wordt. Als resultaat worden complementaire fragmenten bekomen met verschillende lengtes, deze stukken DNA kunnen gescheiden met behulp van capillaire elektroforese. De finale stap bij Sanger sequencing bestaat eruit deze gerangschikte fragmenten af te lezen met behulp van een laser – elke ddNTP is gelabeld met een uniek fluorofoor, bij passage doorheen de laser worden de fluoroforen van de ddNTPs geëxciteerd. Een klein deel van de energie gaat verloren, onder meer onder de vorm van warmte-energie. Bij het terugvallen naar de grondtoestand, wordt een fluorescent signaal uitgezonden met een bepaalde golflengte, typisch een langere golflengte door het verlies aan energie. Deze, door de gelabelde ddNTP's gegenereerde, fluorescente signalen zijn af te lezen in een plot. Daar elk ddNTP gelabeld is met een ander fluorofoor, kan de sequentie achterhaald worden (Dey, 2018; Sanger et al., 1977). De plot die hoort bij een homozygoot wild type hond wordt weergegeven in Figuur 13, de 4 basenparen zijn aanwezig.



Hoewel Sanger sequencing tot op heden de meest toegankelijke sequentiemethode is, zijn er toch nadelen verbonden aan de methode – de duur van de sequentie, fragmenten van slechts 500bp tot 1kbp en parallelle sequencing is gelimiteerd tot 96 reacties (Rizzo en Buck, 2012).

Tabel 8. Sanger sequencing-mix

3,0 µl H ₂ O (Milli-Q)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
2,0 µl 10x SEQ-buffer	Thermo Fischer Scientific
1,5 µl Sequencing primer (2 µM)	Integrated DNA Technologies
R: 5'-CTAAGATCAGTGCCACAA-3'	
1,0 µl GC-rich solution	Roche Diagnostics, Mannheim
0,5 µl RR-mix	Thermo Fischer Scientific
2,0 µl DNA Template	
10,0 µl Totaal volume	

Tabel 9. Sanger sequencerings programma

2'00" - 95°C
0'20" - 95°C
0'10" - 55°C
4'00" - 60°C
Stappen 2, 3 en 4 worden 29 x herhaald
Hold – 15°C

Het Sanger sequenceringsproduct werd opgestuurd naar Eurofins Genomics om de sequentie te bekomen. De FASTA-files, behorende bij elk individueel staal, werden beschikbaar gesteld via hun website. Via UGENE kon de sequentie van elk opgestuurde staal nagegaan worden.

Resultaten

In deze masterproefstudie werden 150 honden – 300 allelen – opgenomen. Het geslacht van de geïnculdeerde honden was evenwichtig verdeeld, de populatie telt 74 mannelijke dieren en 76 vrouwelijke dieren. De bestudeerde kliniepopulatie omvatte ‘hoogrisicorassen’ zoals de border collie (n=6), Australian shepherd (n=3), whippet (n=1), German shepherd (n=10), labradoodle (n=2) en een gans scala aan kruisingen (n=21). Verder waren de rassen opgenomen in de studie representatief voor de Belgische hondenpopulatie. Strikt gezien wordt de 4-bp *ABCB1* deletievariant enkel in de bovengenoemde ‘hoogrisicorassen’ beschreven, aldus maakt slechts 28,67% (43/150) van de bestudeerde kliniepopulatie deel uit van de mogelijke rassen waar het overgevoeligheidstype eerder waargenomen werd. In de voor deze masterproef onderzochte kliniepopulatie werd er geen enkele hond met de 4-bp *ABCB1* deletievariant geïdentificeerd, een vt% allelfrequentie van 0% (0/300).

Deze thesis maakt deel uit van het overkoepelend MDR1-project, waarbij enerzijds de prevalentie van de 4-bp deletiemutatie in het *ABCB1*-gen onderzocht werd in de alledaagse praktijkpopulatie en anderzijds deze tegenover de prevalentie uit de routine genetische testen gezet werd. De totale gegenotypeerde populatie praktijkhonden in het project bedroeg 286 honden of 572 allelen. In de gehele gegenotypeerde kliniepopulatie werd 1 heterozygote hond – een Shetland sheepdog – geïdentificeerd. Aldus bedroeg de frequentie van het variant allel 0,17% (1/572). Volgens Hardy-Weinberg evenwicht – gebaseerd op een vt% allelfrequentie 0,17% en een wt% allelfrequentie 99,82% – werden volgende geschatte prevalenties bekomen: homozygoot variant 0,0003%, homozygoot wild type 99,64% en heterozygoot 0,35%.

Hardy-Weinberg evenwicht: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Met wt% allelfrequentie = p (99,82%)
vt% allelfrequentie = q (0,17%)
 $q = 1 - p$

Er werd geen grote selectiebias verwacht daar de populatie honden in de kliniek kleine huisdieren en de populatie honden in de praktijk analoog zijn qua signalement. De verdeling in hondenrassen, de leeftijd en het geslacht waren representatief voor de patiënten in de alledaagse eerstelijnspraktijk.

Uit de routine genetische testen, die voornamelijk op de eerder beschreven ‘hoogrisicorassen’ uitgevoerd werden, bleek de frequentie voor het variant allel 21,6 % (n=599) te bedragen. Dergelijke allelfrequentie is coherent met wat in eerder uitgevoerde studies gevonden werd (9,5% – 61,2%) (Firdova et al., 2016). Er konden 31 rassen onderscheiden worden in de routine gegenotypeerde hondenpopulatie. De border collie, Australian shepherd, Schotse collie, Swiss shepherd en de Shetland sheepdog vormden samen de grootste groep in de studiepopulatie.

Discussie

Hoewel in het verleden prevalentiestudies uitgevoerd werden in de hondenpopulatie, beperkten dergelijke studies zich tot de eerder beschreven 'hoogrisicorassen'. Een studie die de werkelijke prevalentie van de 4-bp deletie in het *ABCB1*-gen in de hondenpopulatie blootlegt, werd tot op heden niet uitgevoerd. Genetische testen die de mutatie oorzakelijk voor het ivermectine overgevoeligheidsfenotype opsporen, worden dan ook voornamelijk aangevraagd voor de rassen waarin de mutatie in hoge mate aanwezig is, zoals de collie-achtigen. Het doel van deze studie was om na te gaan of het al dan niet testen van een hond alvorens bepaalde bovengenoemde geneesmiddelen toe te dienen een vereiste zou moeten zijn. Als algemeen advies wordt het genetisch testen voor de mutatie in 'hoogrisicorassen' aangenomen (Erkens et al., 2009). Een recente studie heeft echter aangetoond dat minder dan de helft van de praktiserend dierenartsen genetische testen aanvraagt (Bogaerts et al., 2022).

Daar de mutatie in het *ABCB1*-gen voornamelijk in bepaalde rassen – Schotse collies, Australian shepherd, Shetland sheepdog, whippets en border collies – wordt gezien, is het vanzelfsprekend dat er geografische verschillen kunnen zijn in de waargenomen prevalentie. Alvorens de bekomen resultaten te extrapoleren naar diverse geografische hondenpopulaties, dient de volgende belangrijke vraag gesteld te worden: is de samenstelling van de Belgische hondenpopulatie vergelijkbaar met andere hondenpopulaties? Daar de verdeling in rassen – in het bijzonder de 'hoogrisicorassen' – in een verscheidenheid van voorheen uitgevoerde studies complementair is aan de populatie bestudeerd in deze studie, werd dit als geen probleem beschouwd (Herzog et al., 2004; Pospischil et al., 2013; Shmalberg en Memon, 2015). Anderzijds was de bekomen prevalentie, voortvloeiend uit het routine genetisch testen van voornamelijk deze 'hoogrisicorassen', gelijkaardig aan de prevalenties gevonden in eerder uitgevoerde studies (Donner et al., 2018; Firdova et al., 2016).

Een eerste deel van de studie omvat het testen van de hondenpopulatie op de aanwezigheid van de deletiemutatie in het *ABCB1*-gen. De studiepopulatie was voldoende representatief voor de hondenpopulatie in België. Gezien deze masterproef deel uitmaakt van een grotere prevalentiestudie, werden de resultaten cumulatief bekeken. In de, voor deze masterproef, bestudeerde populatie honden werd geen enkel variant type allel gedetecteerd. In de eerder gegenotypeerde kliniepopulatie (n=136) werd het mutante allel bij een enkele hond – Shetland sheepdog – teruggevonden. Anderzijds werden de bekomen resultaten uit de kliniepopulatie vergeleken met de resultaten van de routine genetische testen voor de 4-bp deletiemutatie uitgevoerd door het laboratorium voor dierlijke genetica. De prevalentie voor het variant type allel in de routine testen bedroeg 21%, in de kliniepopulatie was dit slechts 0,17%.

Uit deze studie blijkt dat het risico dat gepaard gaat met het niet testen van een individuele hond op de aanwezigheid van de deletiemutatie niet uitermate hoog is. Er dient wel benadrukt te worden dat, hoewel de kans relatief klein is om een aangetaste hond voor u te hebben, de gevolgen van het missen van de mutatie desastreus kunnen zijn. Een mogelijke hypothese waarom er toch erg weinig genetische testen uitgevoerd worden alvorens een dier te behandelen met bepaalde risico medicatie, is het verlagen van de doses. Hierbij verkiest de dierenarts om een lagere dosis te geven ter vervanging van genotypering. Hoewel onderdosering een plausibel alternatief kan zijn, werd aangetoond dat ook deze werkwijze niet zonder problemen is. De vooropgestelde dosissen zijn gebaseerd op vele klinische en toxiciteitsstudies. Een lager dosis toedienen aan een patiënt zou logischerwijs onvoldoende effectief kunnen zijn. Eveneens dient hierbij de vraag gesteld te worden of een lagere dosis alsnog geen toxiciteit zal veroorzaken. Bij het gebruik van macrocyclische lactonen, zoals ivermectine, wordt een dosis van >120 µg/kg bij homozygoot variant type dieren al in associatie gebracht met het waarnemen van neurologische symptomen. Daar de aanbevolen dosis 300-600 µg/kg bedraagt, is het gebruik van ivermectine bij deze homozygoot aangetaste dieren aanzienlijk gecompromitteerd. Alsook dient rekening gehouden te worden met dragerdieren. Een dosis van >300 µg/kg resulteerde eveneens in de typische neurologische ziektekenen, zeker wanneer een meerdaagse therapie ingezet dient te worden, zoals bij demodicose. In contrast met dieren die de 4-bp *ABCB1* deletievariant in homozygote of heterozygote toestand bezitten, kan een wild-type hond een

eenmalige dosis van 2000 µg/kg verdragen. Bovendien kan een veilige meerdaagse therapie (600 µg/kg), essentieel voor de bestrijding van de Demodex mijt bij de hond, ingezet worden (Mealey, 2010).

Informatie omtrent de kennis van de praktiserende dierenarts en de hondeneigenaar over welke geneesmiddelen deel uitmaken van de P-gp substraten, en aldus een overgevoeligheidsreactie kunnen uitlokken, is er niet te voorhanden. Alsook zijn er, voor zover de auteur weet, geen studies uitgevoerd die uitmaken of eigenaars en dierenartsen op de hoogte zijn van welke hondenrassen tot de 'hoogrisicorassen' behoren. Tevens vormen kruisingen een blijvende hindernis in het optimistisch scenario waarbij een identificatie van deze rassen in optima forma zou gebeuren. Er zijn echter geen concrete cijfers te voorhanden die het risico op sterfte weergeven na het nalatig gebruik van P-gp substraten bij een homozygoot variant type hond. Het onderzoek naar veelvoorkomende fouten in de diergeneeskunde bevindt zich in een pril stadium. Preliminare bevindingen brengen fouten in medicatiegebruik, nauw gevolgd door miscommunicatie, naar voren als primaire factor (Wallis et al., 2019).

Een effectieve therapie om de overgevoeligheidsreactie tegen te gaan is er niet ter beschikking. Eens het dier klinische tekens heeft ontwikkeld, is ondersteuning bieden een van de weinige zaken die er gedaan kan worden (Merola en Eubig, 2012). Gezien de enorme verspreiding van de 4-bp deletiemutatie in de welomschreven 'hoogrisicorassen' wordt het moeilijk de hondenpopulatie vrij te maken. De focus leggen op realiseerbare therapieën zou een bevorderlijk alternatief zijn. Bovengemelde lipid emulsion therapy zou, mits verdere optimalisatie, een stap kunnen zijn in de richting naar een therapie met als doel de overgevoeligheidsreactie te inverteren. Verder dient er vermeld te worden dat er bijwerkingen, zoals pancreatitis en ademnood, gerapporteerd zijn na intraveneuze toediening van deze therapie (Levine et al., 2014). Hypothetisch gezien zou het ideale antidotum een P-gp stimulator zijn, dit staat logischerwijze in contrast met de zoektocht naar P-gp inhibitoren in het onderzoeksveld van chemotherapieresistente neoplasieën. Diverse onderzoeksgroepen bestudeerden de rol die bepaalde substraten kunnen uitoefenen als stimulators voor P-gp, zoals onder meer progesteron (Shapiro et al., 1999), prazosin (Shapiro et al., 1999), efavirenz (Silva et al., 2015), extracellulaire acidose (Thews et al., 2010) en bepaalde lipiden (Tran et al., 2023). Potentiële kandidaten zouden niet enkel ingezet kunnen worden als antidotum voor overgevoeligheidsreacties, maar eveneens bijdragen in de therapie voor neurodegeneratieve aandoeningen zoals de ziekte van Alzheimer en Parkinson (Bartels et al., 2008; Hartz et al., 2010; Storck et al., 2018). Een belangrijke kanttekening hierbij is dat extrapolatie van in vitro naar in vivo resultaten niet steeds analoog zijn en dat bijkomend onderzoek naar mogelijke P-gp inductoren vereist is. Tevens wordt een weefselafhankelijk effect aangehaald – bij het toedienen van cyclosporine aan ratten werd een verhoogde expressie van P-gp waargenomen in het epitheel van het maag-darmstelsel, dit effect werd niet gezien in het endotheel dat de hersencapillairen aflijnt (Lin en Yamazaki, 2003).

Op de bijsluiter van milbemax (Novartis) staan aangepaste doseringen voor hondenrassen waar de *ABCB1*-gen mutatie beschreven werd. Daarenboven wordt vermeld dat de toxiciteit bij juveniele dieren die behoren tot deze rassen niet gekend is. Een vraag die hierbij gesteld kan worden is of jonge dieren niet sowieso al gevoeliger zijn aan P-gp-substraten, daar de BHB mogelijk immatuur is. In het verleden werden diverse studies uitgevoerd om de mogelijke toegenomen permeabiliteit in de BHB bij neonatale dieren aan te tonen. Hoewel het een logische vraag is, lijkt de neonatale hond geen bijkomend risico te hebben (Risau en Wolburg, 1990; Saunders et al., 2014; Shah en Mooradian, 1997).

Alvorens een geneesmiddel op de markt te brengen, ondergaan deze potentiële farmaca tal van testen – veiligheidstesten, efficaciteitstesten en kwaliteitstesten. Adequate modellen dienen te voorhanden zijn om correcte conclusies te nemen. Om de efficaciteit en de veiligheid van een nieuw antiparasiticum na te gaan, wordt dit frequent op knaagdiermodellen, en in een later stadium op honden uitgetest. Alsook wordt een onderscheid gemaakt tussen wild-type dieren en homozygoot variant type dieren. Daar het gebruik van homozygoot aangetaste honden niet steeds toegankelijk is, wordt het gebruik van knock-in/knock-out muizenmodellen naar voren geschoven als waardig alternatief. Hierbij worden de muizen ontdaan van hun oorspronkelijke *ABCB1*-gen (knock-out) en wordt het caniene *ABCB1*-gen, onder de controle van de muizenpromotor, in het genoom van de muis gebracht (knock-in). Observaties uit eerder uitgevoerde studies op dergelijke knock-in/knock-out muizenmodellen wijzen op een veelbelovend alternatief. Na

toediening van gekende P-gp substraten zoals ivermectine, moxidectine, doramectine en digoxine aan homozygoot variant type muizen worden gelijkaardige ziektekenen waargenomen als bij de hond (Swain et al., 2013; Zhu et al., 2014). Diverse invalshoeken worden bekeken om het gebruik van dieren te reduceren, bijgevolg wordt de bruikbaarheid van cellijnen intensief bestudeerd. In het verleden werd aangetoond dat er species verschillen zijn bij het gebruik van P-gp substraten. Lang niet elk P-gp substraat bij de mens bindt op P-gp van de hond (Zolnerciks et al., 2011). Mealey et al. (2007) ontwikkelden een cellijn om gekende P-gp substraten uit de humane geneeskunde als potentiële P-gp substraten bij de hond uit te sluiten of te bevestigen, en aldus deze overgebrachte geneesmiddelen met de correcte adviezen omtrent veiligheid in te kunnen zetten. Hiervoor werden Madin-Darby canine kidney (MDCK) cellen, een veelgebruikt celtype in zowel de diergeneeskunde als de humane geneeskunde om efflux-transportsystemen te bestuderen, ingezet (Karlgren et al., 2017). Door gebruik te maken van P-gp inducerende middelen, zoals doxorubicine (Patel en Tannock, 2009), werd de expressie van P-gp in de MDCK-cellen gestimuleerd. Een stabiele P-gp expressie werd via deze methode bekomen. De MDCK-P-gp-cellen kunnen een waardig alternatief voor *in vivo* dierenmodellen bieden om de veiligheid van nieuwe veterinaire geneesmiddelen te testen (Mealey et al., 2017).

Zoals eerder aangegeven komt P-gp niet exclusief in de BHB voor – op het darmepitheel, proximale tubuluscellen en de hepatocyten komt de effluxpomp evenzeer voor. In de eerste plaats beschermen de effluxpompen het lichaam tegen schadelijke substanties. Daar de 4-bp deletiemutatie een afonctioneel product genereert, zou dit repercussie kunnen hebben op het fysiologisch functioneren van meerdere organen. In de literatuur zijn geen studies te vinden die nagaan wat de gevolgen van de mutatie in het maagdarmsstelsel, de lever en de nieren zijn in de ‘hoogrisicorassen’. Humaan worden polymorfismen in het *ABCB1*-gen gecorreleerd met Parkinson en inflammatoire darmziekten, zoals de ziekte van Crohn en ulceratieve colitis (Mealey, 2004). In recente jaren trachten diverse onderzoeksgroepen het belang van P-gp aan te tonen in de darm bij de mens – een opmerkelijke bevinding is de rol die de effluxpomp speelt in immuun modulatie ter hoogte van het intestinaal epitheel. Gelijklopend met de bevindingen in het humane lichaam, werd bij *ABCB1* -/- knock-out muizen spontane ulceratieve colitis waargenomen (Wilk et al., 2005). De samenstelling commensalen – bacteriën die zich in niet-pathologische omstandigheden in het lichaam bevinden – in de darm heeft een invloed op de expressie van P-gp op de luminale zijde van het intestinaal epitheel. Een communicatie in beide richtingen wordt gesuggereerd – een disfunctie van P-gp veroorzaakt eveneens alteraties in de samenstelling van de darmflora door het immunomodulatorisch effect (Foley et al., 2021). Additioneel toonde *in vitro* onderzoek op getransfecteerde *ABCB1* +/+ cellijnen aan dat P-gp een rol speelt in de metabolisatie van cholesterol – getransfecteerde cellen vertonen een toegenomen cholesterol esterificatie. Bijkomend konden *ABCB1*-inhibitoren de metabolisatie van cholesterol verhinderen (Johnstone et al., 2000). Mits nader onderzoek kan een volledig beeld bekomen worden omtrent de pathofysiologische consequenties die voortvloeien uit een disfunctioneel P-gp.

Al sinds het blootleggen van de oorzakelijke mutatie in het *ABCB1*-gen voor het ivermectine overgevoeligheidsfenotype, wordt geadviseerd voorzichtig om te springen met de geneesmiddelen die substraten zijn van P-gp. Hugnet et al. (1996) bestudeerden de toxicologische effecten van alledaagse geneesmiddelen in de hondenpopulatie, hieruit blijkt de mutatie een aanzienlijke rol te spelen daar een onderscheid gemaakt werd tussen de hondenpopulatie in zijn geheel en de collies. De bekomen resultaten weerspiegelen wat eveneens in andere studies waargenomen werd – ivermectine en loperamide zijn belangrijke vertegenwoordigers van de waargenomen neurotoxiciteit bij collies (Hugnet et al., 1996). De vraag of bepaalde diergeneeskundige praktijken een verhoogd risico hebben om in contact te komen met het overgevoeligheidsfenotype, dient gesteld te worden. Doorverwijsklinieken met een focus op diergeneeskundige oncologie komen relatief vaker in contact met chemotherapeutica in vergelijking met de alledaagse praktijken. Er kan gehypothetiseerd worden dat hier een toegenomen risico aan verbonden is.

Er zou kunnen gesteld worden dat enkel de ‘hoogrisicorassen’ testen voldoende is. Dit is echter geen maatregel die tot een nul-risico leidt. Hoewel in deze studie enkel de prevalentie van de alom gekende 4-bp deletiemutatie bestudeerd werd, zijn er mogelijks bijkomende mutaties die eveneens gepaard gaan met een hypersensitiviteit tegenover meerdere geneesmiddelen. Een overgevoeligheidsreactie na toediening

van ivermectine werd eveneens beschreven bij hondenrassen – skyeterriër en Labrador retriever – die de 4-bp deletiemutatie niet bezitten. Het uitsluiten van een andere mutatie in het *ABCB1*-gen is daarom niet mogelijk (Mealey en Meurs, 2008). Additioneel bestaat de mogelijkheid dat de sequentie wild-type is, maar epigenetische veranderingen translatie van het *ABCB1*-gen verhinderen. Daarenboven is de BHB een complexe structuur bestaande uit een diversiteit aan componenten – zowel veranderingen in de fysische integriteit als een gecomprimeerde metabolisatie door de enzymen als de disfunctionele efflux transporters kunnen de beschermende functie van de BHB in het gedrang brengen (Ghosh et al., 2011; Knox et al., 2022). Naast een genetische oorzaak, kan eenvoudigweg een verzadiging van P-gp of drug-drug interacties niet uitgesloten worden (Lin en Yamazaki, 2003; Prueksaritanont et al., 2013). Ondertussen al meer dan 20 jaar geleden werd de 4-bp deletiemutatie voor het eerst beschreven bij de hond, het onderzoek hieromtrent staat niet stil en verdere opheldering van mogelijke etiologieën die het veilig gebruik van geneesmiddelen in het gedrang kunnen brengen, is gaande. Met de komst van innovatieve biomoleculaire technieken, zoals next-generation sequencing, kunnen grote delen van het coderend (en niet-coderend) deel van het genoom zowel op genetisch als epigenetisch vlak geanalyseerd worden. Tevens wordt de aanleg van biobanken sterk aangemoedigd, wat de interpretatie van de bekomen gegevens efficiënter maakt. Samen met de opmars om meer aangepaste therapieën zoals gepersonaliseerde geneeskunde in te zetten, kunnen biobanken de (r)evolutie in de (dier)geneeskunde betekenen. Door dieren met een gelijkaardig genoom samen te groeperen, te stratificeren, kan een specifiek behandelplan voor deze dieren opgesteld worden. In het geval van de 4-bp deletiemutatie kan dit concreet betekenen dat P-gp substraten gemeden worden waar mogelijk.

Farmacogenomica tracht de verschillen in metabolisatie van geneesmiddelen bij individuen toe te wijzen aan genetische polymorfismen. Het is algemeen geweten dat er tussen diverse species verschillen zijn in drugmetabolisatie, binnenin een species is er echter evenzeer variatie te vinden. Zo is de P-gp expressie bij de mens anders dan bij knaagdieren. Bij de mens komt P-gp in mindere mate tot expressie wat extrapolatie van knaagdier naar mens niet eenvoudig maakt. Daarenboven worden verschillen waargenomen in het expressieniveau van P-gp bij volwassenen en kinderen. Jongere individuen zouden P-gp minder tot expressie brengen, dit kan een correcte interpretatie van de bekomen informatie in de toxiciteitsstudies belemmeren. Een oplossing voor deze discrepanties is het corrigeren van de bekomen resultaten door gebruik te maken van een weefselafhankelijk efflux transporter factor, een factor die evenredig is met het expressieniveau van de effluxpompen (Verscheijden et al., 2021). De deletievariant in het *ABCB1*-gen draagt slechts voor een klein deel bij aan de puzzel die deze diversiteit op vlak van drugmetabolisatie verklaart. In de populatie greyhounds wordt bij inductie van anesthesie met propofol eveneens een overdreven gevoeligheid beschreven. Deze reactie wordt toegeschreven aan een gereduceerde metabolisatie van propofol door CYP2B11 – een mutatie in het gen zorgt voor een deficiënt product met een gecompromitteerde hydroxylatie van verschillende substraten, zoals barbituraten en propofol, tot gevolg (Martinez et al., 2020). Gelijkaardig wordt in het beagle-ras een deletiemutatie in het *CYP2D15*-gen beschreven. In normale omstandigheden vervult CYP2D15 een rol in de metabolisatie van niet-steroïdale anti-inflammatoire drugs (NSAIDs), zoals celecoxib. In de beagle populatie zou het aandeel sterke/zwakke metabolizers – het niet/wel bezitten van de deletiemutatie – in evenwicht zijn, 50% bezit de deletievariant (Court, 2013). Een laatste noemenswaardig genetisch polymorfisme bij de hond bevindt zich in het gen dat codeert voor het thiopurine methyltransferase (TPMT) enzym, een enzym dat bij de metabolisatie betrokken is. Azathioprine, een immunosuppressivum dat ingezet wordt in de therapie van auto-immuunaandoeningen, is een substraat dat gemetaboliseerd wordt door TPMT. In bepaalde rassen, zoals de riesenschnauzer, wordt een verminderde activiteit waargenomen met als gevolg een verhoogde gevoeligheid voor beenmergsuppressie na toediening van azathioprine. Bij de Alaskan malamute wordt net een verhoogde activiteit beschreven, wat gepaard zou kunnen gaan met snellere metabolisatie en uitscheiding van het geneesmiddel (Kidd et al., 2004; Mealey, 2010). Om interspecies verschillen aan te tonen, wordt bij de mens een verlaagde gevoeligheid tegenover codeïne geobserveerd. Codeïne heeft een pijnstillend effect dat zich ergens tussen de NSAIDs en morfine bevindt. Een optimaal effect van codeïne bij de mens wordt uitsluitend waargenomen na omzetting van codeïne in morfine door CYP2D6, een pijnstillende component met sterkere bijwerkingen dan codeïne. Polymorfismen in het *CYP2D6*-gen, het ortholoog gen van *CYP2D15* bij de hond, bepaalt of codeïne al dan niet in morfine omgezet kan worden (Wu et al., 2014).

Bijkomend is het opsporen van MDR1-dragers en lijders van groot belang voor de fokkerij. De mutatie op zich is niet levensbedreigend, maar komt wel voor aan een aanzienlijke frequentie in eerder vernoemde rassen. Een hypothese waarom de overgevoeligheid nog steeds in stand wordt gehouden in de populatie, zou kunnen toegeschreven worden aan het feit dat andere genetische kenmerken de voorkeur genieten als einddoel in de hondenfokkerij (Firdova et al., 2016). Een andere denkpiste zou het gebrek aan het systematisch testen op de 4-bp deletie in het *ABCB1*-gen kunnen zijn, waardoor de mutatie onder de radar blijft en deze op dusdanige manier aan de nakomelingen wordt doorgegeven. Dit samen zal de verdere spreiding van het ivermectine overgevoeligheidsfenotype in de hand werken. Daar P-gp expressie zoals voorheen vermeld niet beperkt is tot de BHB, kan de 4-bp deletiemutatie bijkomende – tot op heden ongekende – consequenties hebben. Indien de mutatie gelinkt kan worden met specifieke aandoeningen, zou de mutatie mogelijks aan belang winnen in de fokkerij. Bovendien is de hond de species bij uitstek waar de mutatie zo uitvoerig beschreven wordt. Bij de mens, kat en herkauwers is de zoektocht naar 1 causale mutatie nog steeds aan de gang (Choudhuri en Klaassen, 2006; Kobayashi et al., 2019; Macdonald en Gledhill, 2007; Salvador-Martín et al., 2018; Wada, 2006). Bijgevolg kan het ivermectine overgevoeligheidsfenotype bij de hond in principe volledig geëradiceerd worden. Idealiter wordt de 4-bp deletie in het fokbeleid van de voorheen beschreven ‘hoogrisicorassen’ opgenomen – de ouderdieren worden zodanig gekruist zodat geen homozygoot variant type dieren kunnen bestaan. Opnieuw dient hier opgemerkt te worden dat andere oorzaken aan de basis kunnen liggen van het ivermectine overgevoeligheidsfenotype.

Hoewel deze thesis de gevolgen van een afunctioneel P-gp bespreekt, werd P-gp initieel in verband gebracht met een ongevoeligheid aan bepaalde geneesmiddelen – voornamelijk in de oncologie vormt de effluxpomp een ontzaglijk probleem. De zoektocht naar innovatieve manieren om dit probleem te omzeilen is gaande (Bart et al., 2007; Kannan et al., 2009). In dergelijke omstandigheden kan een disfunctie van P-gp net een opportunistische situatie opleveren. Multidrug-resistentie kent twee belangrijke takken – intrinsieke en extrinsieke of verworven resistentie. Tumoraal cellen kunnen resistentie tegenover een ingezette therapie hebben door diverse mechanismen – sequestratie van het chemotherapeuticum in de cel door enzymen (CYP-enzymen en Glutathion S-tranferase), onderdrukken van celdood, veranderingen in het doelwit van de therapie en overexpressie van effluxpompen. Enkel bij dit laatste type zal intrinsieke resistentie tegenover meerdere chemotherapeutica te zien zijn (Goebel et al., 2021). In kankeronderzoek wordt gebruik gemaakt van P-gp inhibitoren om een efficiënte opname van diverse chemotherapeutica te verkrijgen. De opheldering van drug-drug interacties om kandidaat inhibitoren als complementaire therapie bij de tumorbehandeling te includeren, is volop bezig (Mealey en Fidel, 2015). Daar het werkingsmechanisme achter de effluxpompen – P-gp en BCRP – uitermate complex is, is het gebruik van inhibitoren niet vanzelfsprekend. Sinds het opkomend gebruik van cryo-elektronenmicroscopie kon de driedimensionale structuur van de effluxpompen beter in beeld gebracht worden en aldus op basis van structuur betere inhibitoren ingezet worden. Naast de fysieke inhibitoren wordt er eveneens onderzoek gedaan naar het gebruik van klein interfererend RNA (siRNA) – stukjes RNA van ongeveer 25 nucleotiden lang die een complementaire mRNA streng kunnen verknippen. Deze siRNA's kunnen het mRNA, dat later vertaald wordt in P-gp en BCRP, degraderen opdat deze effluxpompen niet tot expressie kunnen komen. Het grote bijkomend voordeel bij siRNA's is hun reversibele werking. Daarenboven zou het gebruik van efflux-onderdrukkende producten de biologische beschikbaarheid in de darm en centraal zenuwstelsel kunnen verhogen – geneesmiddelen met een toepassing op dergelijke locaties kunnen beter hun doel bereiken (Goebel et al., 2021). Verder worden binnenin de populatie neoplastische cellen verschillen in expressieniveau van de effluxpomp aangetoond – de side population, een populatie cellen met stamcelachtige eigenschappen, vertoont een verhoogde efflux ten opzichte van de major population (Tomiyasu et al., 2013). Naast mutaties in het *ABCB1*-gen, kunnen eveneens epigenetische alteraties een gewijzigde expressie van het gen, en dus al dan niet het multidrug-resistentie fenotype, veroorzaken. In caniene lymfoma – een groep neoplasieën met een grote verscheidenheid aan subtypes – worden veranderingen in het epigenetisch patroon beschreven naargelang een subtype tumor gevoeligheid vertoont tegenover chemotherapeutica. Duidelijke patroonverschillen in hypermethylaties van het DNA en histon acetylaties worden waargenomen tussen enerzijds de chemotherapeutica gevoelige en anderzijds de resistente tumorcellijnen (Tomiyasu et al., 2014). In de humane oncologie is de vraag naar meer specifieke therapieën er – diagnostiek en therapie worden gecombineerd. Daar tumoren zowel inter- als

intratumorale verschillen vertonen, is een enkele therapie voor elke type tumor niet voldoende. Ook hier kan het gebruik van moleculaire technieken – next-generation sequencing en proteomics – als diagnostisch middel ter stratificatie van een bepaalde tumor, een doelgerichte en effectieve behandeling voor een specifiek tumorale subtype betekenen (Klopfleisch, 2015; Klopfleisch et al., 2016).

Conclusie

Uit deze studie zou geconcludeerd kunnen worden dat het testen in de alledaagse kliniepopulatie geen vereiste is. De nadruk dient echter wel gelegd te worden op het contrast tussen de frequentie van het variant allel in enerzijds de kliniepopulatie en anderzijds de routinematig genetisch geteste dieren, daar een verschil van een factor 100 werd geobserveerd. Mits een correcte identificatie van het ras – in het bijzonder de voorheen beschreven ‘hoogrisicorassen’ – zou in principe een veilige therapie ingesteld kunnen worden. In de diergeneeskundige praktijk komen echter met de regelmaat van de klok kruisingen voor, hierbij wordt een efficiënte identificatie van het ras van het dier belemmerd (Mealey en Meurs, 2008). Bijgevolg is de aanpak gebaseerd op ras identificatie geen onfeilbare methode. In de bestudeerde kliniepopulatie (n=286) werd geen enkele homozygoot variant type hond geïdentificeerd, aldus is de kans om neurologische symptomen na toediening van een P-gp substraat waar te nemen algeheel klein.

De gevolgen die voortvloeien uit het gebruik van de beruchte farmaca bij homozygoot variant type dieren, zijn allesbehalve mild. Aangezien het uitsluitend testen van ‘hoogrisicorassen’ nog steeds gekruiste dieren zal missen, dient de problematiek dichterbij de bron aangepakt te worden. De 4-bp deletiemutatie kent een autosomaal recessief overervingspatroon – op enkele uitzonderingen na, vertonen enkel homozygoot variant type dieren neurologische symptomen na toediening van P-gp substraten. Verstandig kruisen van ouderdieren is hier een belangrijke boodschap. Om het datamanagement van verschillende nationale rasverenigingen (nationale kennel clubs) in kaart te brengen werd in het verleden een uitgebreide studie uitgevoerd. Nationale kennel clubs staan in voor het behoud van rasstandaarden. Naast deze organisaties geldt een bepaalde wetgeving omtrent dierenwelzijn (met of zonder rekening te houden met bepaalde rasstandaarden) in de overgrote meerderheid van de Europese landen. In de meeste Europese landen worden stambomen van raszuivere dieren nauwgezet bijgehouden in pedigree databases, helaas geldt dit niet voor alle resultaten die voortkomen uit DNA-testen. Alsook worden verschillen vermeld met betrekking tot de registratie van elk ras – voor bepaalde rassen worden gegevens uitgebreid bijgehouden en gedeeld, voor anderen gebeurt dit in mindere mate (Wang et al., 2018). Wederom worden hierbij enkel de raszuivere honden in acht genomen, kruisingen en dieren afkomstig van onbekende fokkers bevinden zich niet in deze groep honden met een gekende stamboom. Bovendien maakt het excluseren van resultaten uit genetische testen een alomvattende fokaanpak niet steeds eenvoudig.

Bibliografie

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Allt, G., Lawrenson, J.G., 2000. The blood-nerve barrier: Enzymes, transporters and receptors-A comparison with the blood-brain barrier. *Brain Res Bull* 52, 1–12.
- Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z.E., Gottesman, M.M., 2003. P-glycoprotein: From genomics to mechanism. *Oncogene* 22, 7468–7485. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206948>
- Amiry-Moghaddam, M., Otsuka, T., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Haug, F.-M., Froehner, S.C., Adams, M.E., Neely, J.D., Agre, P., Ottersen, O.P., Bhardwaj, A., 2003. An-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 2106–2111.
- Annilo, T., Chen, Z.Q., Shulenin, S., Costantino, J., Thomas, L., Lou, H., Stefanov, S., Dean, M., 2006. Evolution of the vertebrate ABC gene family: Analysis of gene birth and death. *Genomics* 88, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.03.001>
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B.R., Betsholtz, C., 2010. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468, 557–561. <https://doi.org/10.1038/nature09522>
- Bart, J., Nagengast, W.B., Coppes, R.P., Wegman, T.D., Van Der Graaf, W.T.A., Groen, H.J.M., Vaalburg, W., De Vries, E.G.E., Hendrikse, N.H., 2007. Irradiation of rat brain reduces P-glycoprotein expression and function. *Br J Cancer* 97, 322–326. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603864>
- Bartels, A.L., Willemsen, A.T.M., Kortekaas, R., De Jong, B.M., De Vries, R., De Klerk, O., Van Oostrom, J.C.H., Portman, A., Leenders, K.L., 2008. Decreased blood-brain barrier P-glycoprotein function in the progression of Parkinson's disease, PSP and MSA. *J Neural Transm* 115, 1001–1009. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0030-y>
- Baudou, E., Lespine, A., Durrieu, G., André, F., Gandia, P., Durand, C., Cunat, S., 2020. Serious Ivermectin Toxicity and Human ABCB1 Nonsense Mutations. *New England Journal of Medicine* 383, 787–789. <https://doi.org/10.1056/nejmc1917344>
- Bell, R.D., Zlokovic, B. V., 2009. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118, 103–113. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0522-3>
- Blanchette, M., Daneman, R., 2015. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev* 138, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.07.007>
- Bogaerts, E., den Boer, E., Peelman, L., van Nieuwerburgh, F., Fieten, H., Saunders, J.H., Broeckx, B.J.G., 2022. Veterinarians' Competence in Applying Basic Genetic Principles and Daily Implementation of Clinical Genetics: A Study in a University Environment. *Journal of Veterinary Medicinal Education* 49, 799–806. <https://doi.org/10.3138/jvme-2021-0029>
- Breen, M., 2008. Canine cytogenetics - From band to basepair. *Cytogenet Genome Res* 120, 50–60. <https://doi.org/10.1159/000118740>
- Broadwell, R.D., Balin, B.J., Salzman, M., 1988. Transcytotic Pathway for Blood-Borne Protein through the Blood-Brain Barrier. *PNAS* 85, 632–636.
- Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C., Little, S., 1997. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res* 25, 3235–3241.
- Bryda, E.C., 2013. The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. *Mo Med* 110, 207–211.
- Buchmant, A.R., Berg, P., 1988. Comparison of Intron-Dependent and Intron-Independent Gene Expression. *Mol Cell Biol* 8, 4395–4405.
- Chen, Z.S., Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R.J., 2012. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese Anti-Cancer Association* 31, 58–72. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10> 猿
- Chorev, M., Carmel, L., 2012. The function of introns. *Front Genet* 3, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00055>
- Choudhuri, S., Klaassen, C., 2006. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol* 25, 231–259. <https://doi.org/10.1080/10915810600746023>
- Court, M.H., 2013. Canine cytochrome P450 (CYP) pharmacogenetics. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm>

- Dagenais, C., Avdeef, A., Tsinman, O., Dudley, A., Beliveau, R., 2009. P-glycoprotein deficient mouse in situ blood-brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38, 121–137. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.06.009>
- Damas, J., Corbo, M., Lewin, H.A., 2020. Vertebrate Chromosome Evolution. *Annu Rev Anim Biosci* 9, 1–27. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518>
- Das, S., Mohapatra, S.C., Hsu, J.T., 1999. Studies on primer-dimer formation in polymerase chain reaction (PCR). *Biotechnology Techniques* 13, 643–646.
- Davoust, N., Vuailat, C., Androdias, G., Nataf, S., 2008. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol* 29, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.01.010>
- Dey, P., 2018. Sanger Sequencing and Next-Generation Gene Sequencing: Basic Principles and Applications in Pathology, in: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer Singapore, pp. 227–231. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_23
- Donner, J., Anderson, H., Davison, S., Hughes, A.M., Bouirmane, J., Lindqvist, J., Lytle, K.M., Ganesan, B., Ottka, C., Ruotanen, P., Kaukonen, M., Forman, O.P., Fretwell, N., Cole, C.A., Lohi, H., 2018. Frequency and distribution of 152 genetic disease variants in over 100,000 mixed breed and purebred dogs. *PLoS Genet* 14, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007361>
- Dwivedi, D., Megha, K., Mishra, R., Mandal, P.K., 2020. Glutathione in Brain: Overview of Its Conformations, Functions, Biochemical Characteristics, Quantitation and Potential Therapeutic Role in Brain Disorders. *Neurochem Res* 45, 1461–1480. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03030-1>
- Erickson, M.A., Banks, W.A., 2019. Age-associated changes in the immune system and blood–brain barrier functions. *Int J Mol Sci* 20, 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms20071632>
- Erkens, T., Daminet, S., Rogiers, C., Gommeren, K., Lampo, E., vander Donckt, D., van den Broeke, A., van Poucke, M., van Zeveren, A., Peelman, L.J., 2009. Presence of the ABCB1(MDR1) deletion mutation causing ivermectin hypersensitivity in certain dog breeds in Belgium. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr* 78, 256–260.
- Firdova, Z., Turnova, E., Bielikova, M., Turna, J., Dudas, A., 2016. The prevalence of ABCB1: c.227_230delATAG mutation in affected dog breeds from European countries. *Res Vet Sci* 106, 89–92. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.03.016>
- Foley, S.E., Tuohy, C., Dunford, M., Grey, M.J., De Luca, H., Cawley, C., Szabady, R.L., Maldonado-Contreras, A., Houghton, J.M., Ward, D. V., Mrsny, R.J., McCormick, B.A., 2021. Gut microbiota regulation of P-glycoprotein in the intestinal epithelium in maintenance of homeostasis. *Microbiome* 9, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01137-3>
- Fromm, M.F., 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 25, 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.06.002>
- Fromm, M.F., 2003. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur J Clin Invest* 33, 6–9.
- Geyer, J., Döring, B., Döring, D., Godoy, J.R., Leidolf, R., Moritz, A., Petzinger, E., Leidolf, J.R., Moritz, R., Frequency, E., 2005. Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 28, 545–551.
- Ghosh, C., Puvenna, V., Gonzalez-Martinez, J., Janigro, D., Marchi, N., 2011. Blood-Brain Barrier P450 Enzymes and Multidrug Transporters in Drug Resistance: A Synergistic Role in Neurological Diseases. *Curr. Drug Metab.* 12, 742–749.
- Goebel, J., Chmielewski, J., Hrycyna, C.A., 2021. The roles of the human ATP-binding cassette transporters P-glycoprotein and ABCG2 in multidrug resistance in cancer and at endogenous sites: Future opportunities for structure-based drug design of inhibitors. *Cancer Drug Resistance* 4, 784–804. <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.19>
- Gosselet, F., Loiola, R.A., Roig, A., Rosell, A., Culot, M., 2021. Central nervous system delivery of molecules across the blood-brain barrier. *Neurochem Int* 144, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104952>
- Gramer, I., Leidolf, R., Döring, B., Klintzsch, S., Krämer, E.M., Yalcin, E., Petzinger, E., Geyer, J., 2011. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Veterinary Journal* 189, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.012>
- Gray, M.R., Colot, H. V, Guarentet, L., Rosbash, M., 1982. Open reading frame cloning: Identification, cloning, and expression of open reading frame DNA (lacZ gene fusion/frameshift mutant/hybrid protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79, 6598–6602.
- Green, M.R., Sambrook, J., 2019. Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc* 2019, 6–15. <https://doi.org/10.1101/pdb.top100388>
- Gregorius, H.-R., 1980. The Probability of Losing an Allele When Diploid Genotypes are Sampled. *Biometrics* 36, 643–652.

- Grieshaber, M.C., Flammer, J., 2007. Does the Blood-brain Barrier Play a Role in Glaucoma? *Surv Ophthalmol* 52, S115–S121. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2007.08.005>
- Hamilton, J.P., 2011. Epigenetics: Principles and practice. *Digestive Diseases* 29, 130–135. <https://doi.org/10.1159/000323874>
- Hartz, A.M.S., Miller, D.S., Bauer, B., 2010. Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid- β in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 77, 715–723. <https://doi.org/10.1124/mol.109.061754>
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986–994.
- Hershey, J.W.B., Sonenberg, N., Mathews, M.B., 2012. Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, 1–11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011528>
- Herzog, H.A., Bentley, R.A., Hahn, M.W., 2004. Random drift and large shifts in popularity of dog breeds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271, S353–S356. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2004.0185>
- Hoffmeyer, S., Burk, O., Von Richter, O., Arnold, H.P., Brockmöller, J., Johne, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., Brinkmann, U., 1999. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *PNAS* 97, 3473–3478.
- Hugnet, C., Cadore, J., Buronfosse, F., Pineau, X., Mathet, T., Berny, P., 1996. Loperamide Poisoning in the Dog. *Vet Hum Toxicol* 38, 31–33.
- Jalali, Mehdi, Zaborowska, J., Jalali, Morteza, 2017. The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR, in: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier Inc., pp. 1–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1>
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Smyth, M.J., 2000. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci* 25, 1–6.
- Kannan, P., John, C., Zoghbi, S.S., Halldin, C., Gottesman, M.M., Innis, R.B., Hall, M.D., 2009. Imaging the function of P-glycoprotein with radiotracers: Pharmacokinetics and in vivo applications. *Clin Pharmacol Ther* 86, 368–377. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.138>
- Karlgrén, M., Simoff, I., Backlund, M., Wegler, C., Keiser, M., Handin, N., Müller, J., Lundquist, P., Jareborg, A.C., Oswald, S., Artursson, P., 2017. A CRISPR-Cas9 Generated MDCK Cell Line Expressing Human MDR1 Without Endogenous Canine MDR1 (cABCB1): An Improved Tool for Drug Efflux Studies. *J Pharm Sci* 106, 2909–2913. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.018>
- Kidd, L.B., Salavaggione, O.E., Szumlanski, C.L., Miller, J.L., Weinshilboum, R.M., Trepanier, L., 2004. Thiopurine Methyltransferase Activity in Red Blood Cells of Dogs. *J Vet Intern Med* 18, 214–218. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2004.tb00163.x>
- Kinboshi, M., Ikeda, A., Ohno, Y., 2020. Role of Astrocytic Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels in Epileptogenesis. *Front Neurol* 11, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.626658>
- Klitzsch, S., Meerkamp, K., Döring, B., Geyer, J., 2010. Detection of the nt230[del4] MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method. *Veterinary Journal* 185, 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.07.018>
- Klopfleisch, R., 2015. Personalised medicine in veterinary oncology: One to cure just one. *Veterinary Journal* 205, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.004>
- Klopfleisch, R., Kohn, B., Gruber, A.D., 2016. Mechanisms of tumour resistance against chemotherapeutic agents in veterinary oncology. *Veterinary Journal* 207, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.06.015>
- Knox, E.G., Aburto, M.R., Clarke, G., Cryan, J.F., O'Driscoll, C.M., 2022. The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Mol Psychiatry* 27, 2659–2673. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01511-z>
- Kobayashi, T., Miura, M., Abumiya, M., Akamine, Y., Ito, F., Takahashi, N., 2019. Influence of ABCB1 polymorphisms on the pharmacokinetics and toxicity of lenalidomide in patients with multiple myeloma. *Medical Oncology* 36, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12032-019-1280-2>
- Langen, U.H., Aylow, S., Gu, C., 2019. Annual Review of Cell and Developmental Biology Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annu Rev Cell Dev Biol* 35, 591–631. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617>
- Lankas, G.R., Cartwright, M.E., Umbenhauer, D., 1997. P-Glycoprotein Deficiency in a Subpopulation of CF-1 Mice Enhances Avermectin-Induced Neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 143, 357–365.
- Levine, M., Skolnik, A.B., Ruha, A.M., Bosak, A., Menke, N., Pizon, A.F., 2014. Complications Following Antidotal Use of Intravenous Lipid Emulsion Therapy. *Journal of Medical Toxicology* 10, 10–14. <https://doi.org/10.1007/s13181-013-0356-1>

- Lin, J.H., Yamazaki, M., 2003. Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics Clinical Implications. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 59–98.
- Long, J.M., Holtzman, D.M., 2019. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* 179, 312–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
- López-Ornelas, A., Jiménez, A., Pérez-Sánchez, G., Rodríguez-Pérez, C.E., Corzo-Cruz, A., Velasco, I., Estudillo, E., 2022. The Impairment of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease: Challenges and Opportunities with Stem Cells. *Int J Mol Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms231710136>
- Macdonald, N., Gledhill, A., 2007. Potential impact of ABCB1 (p-glycoprotein) polymorphisms on avermectin toxicity in humans. *Arch Toxicol* 81, 553–563. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0193-6>
- Mackin, A.J., Riggs, C., Beatty, T., Mealey, K., Boothe, D., Archer, T., 2020. Excessive Cyclosporine-Associated Immunosuppression in a Dog Heterozygous for the MDR1 (ABCB1-1Δ) Mutation. *J Am Anim Hosp Assoc* 56, 190–195. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-7004>
- Mao, Q., Unadkat, J.D., 2015. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport— an Update. *AAPS Journal* 17, 65–82. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9668-6>
- Martinez, M., Modric, S., Sharkey, M., Troutman, L., Walker, L., Mealey, K., 2008. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 31, 285–300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00964.x>
- Martinez, S.E., Andresen, M.C., Zhu, Z., Papageorgiou, I., Court, M.H., 2020. Pharmacogenomics of poor drug metabolism in Greyhounds: Cytochrome P450 (CYP) 2B11 genetic variation, breed distribution, and functional characterization. *Sci Rep* 10, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56660-z>
- McQuaid, S., Cunnea, P., McMahon, J., Fitzgerald, U., 2009. The effects of blood-brain barrier disruption on glial cell function in multiple sclerosis. *Biochem Soc Trans* 37, 329–331. <https://doi.org/10.1042/BST0370329>
- Mealey, K.L., 2010. Pharmacogenetics in Veterinary Medicine. *CRS Newsletter* 27, 20–22.
- Mealey, K.L., 2004. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 25, 257–264.
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M., Cantor, G.H., 2001. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11, 727–733.
- Mealey, K.L., Burke, N.S., 2015. Identification of a nonsense mutation in feline ABCB1. *J Vet Pharmacol Ther* 38, 429–433. <https://doi.org/10.1111/jvp.12212>
- Mealey, K.L., Dassanayake, S., Burke, N.S., 2017. Establishment of a cell line for assessing drugs as canine P-glycoprotein substrates: proof of principle. *J Vet Pharmacol Ther* 40, 545–551. <https://doi.org/10.1111/jvp.12390>
- Mealey, K.L., Fidel, J., 2015. P-Glycoprotein Mediated Drug Interactions in Animals and Humans with Cancer. *J Vet Intern Med* 29, 1–6. <https://doi.org/10.1111/jvim.12525>
- Mealey, K.L., Fidel, J., Gay, J.M., Impellizeri, J.A., Clifford, C.A., Bergman, P.J., 2008. ABCB1-1Δ polymorphism can predict hematologic toxicity in dogs treated with vincristine. *J Vet Intern Med* 22, 996–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0122.x>
- Mealey, K.L., Meurs, K.M., 2008. Breed distribution of the ABCB1-1Δ (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *J Am Vet Med Assoc* 233, 921–924.
- Mealey, K.L., Munyard, K.A., Bentjen, S.A., 2005. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Vet Parasitol* 131, 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.004>
- Mealey, K.L., Owens, J.G., Freeman, E., 2023. Canine and feline P-glycoprotein deficiency: What we know and where we need to go. *J Vet Pharmacol Ther* 46, 1–16. <https://doi.org/10.1111/jvp.13102>
- Merola, V.M., Eubig, P.A., 2012. Toxicology of Avermectins and Milbemycins (Macrocyclic Lactones) and the Role of P-Glycoprotein in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 42, 313–333. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.12.005>
- Meyer, J., Mischeck, U., Veyhl, M., Henzel, K., Galla, H.-J., 1990. Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 514, 305–309.
- Mihevc, S.P., Majdic, G., 2019. Canine cognitive dysfunction and Alzheimer's disease—two facets of the same disease? *Front Neurosci* 13, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00604>
- Mizukami, K., Chang, H.S., Yabuki, A., Kawamichi, T., Hossain, M.A., Rahman, M.M., Uddin, M.M., Yamato, O., 2012. Rapid genotyping assays for the 4-base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene and low frequency of the mutant allele in Border Collie dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 127–134. <https://doi.org/10.1177/1040638711425591>
- Mizukami, K., Yabuki, A., Chang, H.S., Uddin, M.M., Rahman, M.M., Kushida, K., Kohyama, M., Yamato, O., 2013. High frequency of a single nucleotide substitution (c.-6-180T>G) of the canine MDR1/ABCB1 gene

- associated with phenobarbital-resistant idiopathic epilepsy in Border Collie dogs. *Dis Markers* 35, 669–672. <https://doi.org/10.1155/2013/695918>
- Mooney, J.A., Yohannes, A., Lohmueller, K.E., 2021. The impact of identity by descent on fitness and disease in dogs. *PNAS* 118, 1–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019116118/-/DCSupplemental>
- Muller, S.H., Diaz, J.H., Kaye, A.D., 2015. Clinical applications of intravenous lipid emulsion therapy. *J Anesth* 29, 920–926. <https://doi.org/10.1007/s00540-015-2036-6>
- Nagelhus, E.A., Ottersen, O.P., 2013. Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain. *Physiol Rev* 93, 1543–1562. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013.-Aquaporin-4>
- Neff, M.W., Robertson, K.R., Wong, A.K., Safra, N., Broman, K.W., Slatkin, M., Mealey, K.L., Pedersen, N.C., 2004. Breed distribution and history of canine *mdr1-1*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *PNAS* 101, 11725–11730.
- Nürnbergger, D., Müller, S.F., Hamann, M., Geyer, J., 2021. First Sequencing of Caprine *Mdr1* (*Abcb1*) mRNA Due to Suspected Neurological Adverse Drug Reaction in a Thuringian Goat Following Extra-Label Use of Doramectin. *Front Vet Sci* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.682393>
- Nürnbergger, D., Wagner, L., Müller, S.F., Leiting, S., Leidolf, R., Alber, J., Hamann, M., Geyer, J., 2022. Detection of the ABCB11930_1931del TC Mutation in Two Suspected Ivermectin-Sensitive Cats and Their Relatives by a Novel TaqMan Allelic Discrimination Assay. *Front Vet Sci* 8, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.808392>
- Ohno, Y., Kinboshi, M., Shimizu, S., 2018. Inwardly rectifying potassium channel *kir4.1* as a novel modulator of BDNF expression in astrocytes. *Int J Mol Sci* 19, 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms19113313>
- Patel, K.J., Tannock, I.F., 2009. The influence of P-glycoprotein expression and its inhibitors on the distribution of doxorubicin in breast tumors. *BMC Cancer* 9, 356. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-356>
- Pauling, L., Corey, R.B., 1953. Structure of the Nucleic Acids. *Nature* 171, 346.
- Pospischil, A., Hässig, M., Vogel, R., Salvini, M.M., Fabrikant, S.I., Axhausen, K.W., Schenker, N.S., Erni, D., Guscelli, F., 2013. Hundepopulation und Hunderassen in der Schweiz von 1955 bis 2008. *Schweiz Arch Tierheilkd* 155.
- Prueksaritanont, T., Chu, X., Gibson, C., Cui, D., Yee, K.L., Ballard, J., Cabalu, T., Hochman, J., 2013. Drug-drug interaction studies: Regulatory guidance and an industry perspective. *AAPS Journal* 15, 629–645. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9470-x>
- Rahman, M., Uddin, M., Sultana, R., Moue, A., Setu, M., 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal* 4, 30–36.
- Risau, W., Wolburg, H., 1990. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 13, 174–178.
- Rizzo, J.M., Buck, M.J., 2012. Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prevention Research* 5, 887–900. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0432>
- Rogozin, I.B., Pavlov, Y.I., 2003. Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity. *Mutat Res Rev Mutat Res* 544, 65–85. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00032-2)
- Salvador-Martín, S., García-González, X., García, M.I., Blanco, C., García-Alfonso, P., Robles, L., Grávalos, C., Pachón, V., Longo, F., Martínez, V., Sanjurjo-Sáez, M., López-Fernández, L.A., 2018. Clinical utility of ABCB1 genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan. *Pharmacol Res* 136, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.026>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467.
- Saunders, N.R., Dreifuss, J.J., Dziegielewska, K.M., Johansson, P.A., Habgood, M.D., Møllgård, K., Bauer, H.C., 2014. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: A walk through 100 years of history. *Front Neurosci* 8, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00404>
- Scholz, M., Cinatl, J., Schädel-Höpfner, M., Windolf, J., 2007. Neutrophils and the blood-brain barrier dysfunction after trauma. *Med Res Rev* 27, 401–416. <https://doi.org/10.1002/med.20064>
- Seaman, J.T., Eagleson, J.S., Carrigan, M.J., Webb, R.F., 1987. Avermectin B, toxicity in a herd of Murray Grey cattle. *Aust Vet J* 64, 284–285.
- Shah, G.N., Mooradian, A.D., 1997. Age-related Changes in The Blood-Brain Barrie. *Exp Gerontol* 32, 501–519.
- Shmalberg, J., Memon, M.A., 2015. A Retrospective Analysis of 5,195 Patient Treatment Sessions in an Integrative Veterinary Medicine Service: Patient Characteristics, Presenting Complaints, and Therapeutic Interventions. *Vet Med Int* 2015, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/983621>
- Sieber, P., Platzer, M., Schuster, S., 2018. The Definition of Open Reading Frame Revisited. *Trends in Genetics* 34, 165–167. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.12.015>

- Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R.J., Carvalho, F., De Lourdes Bastos, M., Remião, F., 2015. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: Induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 149, 1–123. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>
- Storck, S.E., Hartz, A.M.S., Bernard, J., Wolf, A., Kachlmeier, A., Mahringer, A., Weggen, S., Pahnke, J., Pietrzik, C.U., 2018. The concerted amyloid-beta clearance of LRP1 and ABCB1/P-gp across the blood-brain barrier is linked by PICALM. *Brain Behav Immun* 73, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.07.017>
- Swain, M.D., Orzechowski, K.L., Swaim, H.L., Jones, Y.L., Robl, M.G., Tinaza, C.A., Myers, M.J., Jhingory, M. V., Buckley, L.E., Lancaster, V.A., Yancy, H.F., 2013. P-gp substrate-induced neurotoxicity in an Abcb1a knock-in/Abcb1b knock-out mouse model with a mutated canine ABCB1 targeted insertion. *Res Vet Sci* 94, 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.10.025>
- Swann, J.W., Garden, O.A., 2016. Novel immunotherapies for immune-mediated haemolytic anaemia in dogs and people. *Veterinary Journal* 207, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.022>
- Tai, L.M., Loughlin, A.J., Male, D.K., Romero, I.A., 2009. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein restrict apical-to-basolateral permeability of human brain endothelium to amyloid-B. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29, 1079–1083. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.42>
- Tappin, S.W., Goodfellow, M.R., Peters, I.R., Day, M.J., Hall, E.J., Mealey, K.L., 2012. Frequency of the mutant MDR1 allele in dogs in the UK. *Veterinary Record* 171, 72. <https://doi.org/10.1136/vr.100633>
- Thews, O., Dillenburg, W., Fellner, M., Buchholz, H.G., Bausbacher, N., Schreckenberger, M., Rösch, F., 2010. Activation of P-glycoprotein (Pgp)-mediated drug efflux by extracellular acidosis: in vivo imaging with ⁶⁸Ga-labelled PET tracer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37, 1935–1942. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1504-3>
- Tomiyasu, H., Goto-Koshino, Y., Fujino, Y., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2014. Epigenetic regulation of the ABCB1 gene in drug-sensitive and drug-resistant lymphoid tumour cell lines obtained from canine patients. *Veterinary Journal* 199, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.10.022>
- Tomiyasu, H., Watanabe, M., Goto-Koshino, Y., Fujino, Y., Ohno, K., Sugano, S., Tsujimoto, H., 2013. Regulation of expression of ABCB1 and LRP genes by mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway and its role in generation of side population cells in canine lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma* 54, 1309–1315. <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.751529>
- Tran, N.N.B., Bui, A.T.A., Jaramillo-Martinez, V., Weber, J., Zhang, Q., Urbatsch, I.L., 2023. Lipid environment determines the drug-stimulated ATPase activity of P-glycoprotein. *Front Mol Biosci* 10, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1141081>
- Travers, A., Muskhelishvili, G., 2015. DNA structure and function. *FEBS Journal* 282, 2279–2295. <https://doi.org/10.1111/febs.13307>
- Ullah, A., Munir, S., Badshah, S.L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B.G., Emwas, A.H., Jaremko, M., 2020. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules* 25, 1–39. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>
- Varatharaj, A., Galea, I., 2017. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun* 60, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- Verscheijden, L.F.M., Koenderink, J.B., de Wildt, S.N., Russel, F.G.M., 2021. Differences in P-glycoprotein activity in human and rodent blood–brain barrier assessed by mechanistic modelling. *Arch Toxicol* 95, 3015–3029. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03115-y>
- Wada, M., 2006. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response. *Cancer Lett* 234, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.06.050>
- Wallis, J., Fletcher, D., Bentley, A., Ludders, J., 2019. Medical errors cause harm in veterinary hospitals. *Front Vet Sci* 6, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00012>
- Wang, S., Laloë, D., Missant, F.M., Malm, S., Lewis, T., Verrier, E., Strandberg, E., Bonnett, B.N., Leroy, G., 2018. Breeding policies and management of pedigree dogs in 15 national kennel clubs. *Veterinary Journal* 234, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.02.018>
- Webster, M.W., Weixlbaumer, A., 2021. The Intricate Relationship Between Transcription and Translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, 1–3. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023426118>
- Wilk, J.N., Bilsborough, J., Viney, J.L., 2005. The mdr1a–/–Mouse Model of Spontaneous Colitis. *Immunol Res* 31, 151–159.
- Wu, X., Yuan, L., Zuo, J., Lv, J., Guo, T., 2014. The impact of CYP2D6 polymorphisms on the pharmacokinetics of codeine and its metabolites in Mongolian Chinese subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 70, 57–63. <https://doi.org/10.1007/s00228-013-1573-x>

- Wunder, A., Schoknecht, K., Stanimirovic, D.B., Prager, O., Chassidim, Y., 2012. Imaging blood-brain barrier dysfunction in animal disease models. *Epilepsia* 53, S14–S21. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03698.x>
- Xia, H., Lazartigues, E., 2008. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: Properties and future directions. *J Neurochem* 107, 1482–1494. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05723.x>
- Yang, A.C., Stevens, M.Y., Chen, M.B., Lee, D.P., Stähli, D., Gate, D., Contrepolis, K., Chen, W., Iram, T., Zhang, L., Vest, R.T., Chaney, A., Lehallier, B., Olsson, N., du Bois, H., Hsieh, R., Cropper, H.C., Berdnik, D., Li, L., Wang, E.Y., Traber, G.M., Bertozzi, C.R., Luo, J., Snyder, M.P., Elias, J.E., Quake, S.R., James, M.L., Wyss-Coray, T., 2020. Physiological blood–brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis. *Nature* 583, 425–430. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2453-z>
- Yang, Z., Wu, D., Bui, T., Ho, R.J.Y., 2008. A novel human multidrug resistance gene MDR1 variant G571A (G191R) modulates cancer drug resistance and efflux transport. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 327, 474–481. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.138313>
- Zhang, X.C., Han, L., Zhao, Y., 2016. Thermodynamics of ABC transporters. *Protein Cell* 7, 17–27. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0211-z>
- Zhu, M., Ming, Y., Swaim, H., Swain, M.D., Myers, M.J., Deaver, C., Wu, X., Jones, Y.L., Yancy, H.F., 2014. Identification of potential biomarkers of P-glycoprotein substrate neurotoxicity in transgenic mice expressing the mutated canine ABCB1 gene. *Am J Vet Res* 75, 1104–1110.
- Zlokovic, B. V., Deane, R., Sagare, A.P., Bell, R.D., Winkler, E.A., 2010. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: A serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer’s amyloid β -peptide elimination from the brain. *J Neurochem* 115, 1077–1089. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07002.x>
- Zolnerciks, J.K., Booth-Genthe, C.L., Gupta, A., Harris, J., Unadkat, J.D., 2011. Substrate- and species-dependent inhibition of p-glycoprotein-mediated transport: Implications for predicting in vivo drug interactions. *J Pharm Sci* 100, 3055–3061. <https://doi.org/10.1002/jps.22566>

Appendix

Ras	Aantal	Ras	Aantal
Alaskan Malamute	1	German Pinscher	1
American Cocker Spaniel	3	German Shepherd	10
American Staffordshire Terrier	2	Golden Retriever	2
Australian Kelpie	1	Greyhound	1
Australian Shepherd*	3	Griffon Bruxellois	1
Barbet	1	Husky	2
Beauceron	3	Irish Setter	1
Beagle	3	Irish Terrier	1
Belgian Tervuren	1	Italian Greyhound	1
Bernese mountain Dog	3	Jack Russell Terrier	5
Bichon Frise	2	Labrador Retriever	5
Boerboel	1	Labradoodle	2
Bolonka Zwetna	1	Malinois	6
Border Collie	6	Maltese dog	1
Bouvier des Flandres	2	Manchester Terrier	1
Boxer	1	Norfolk Terrier	1
Briard	1	Nova Scotia Duck Tolling retriever	1
Cane Corso Italiano	1	Pomerian	3
Canis Vulgaris	21	Portugese Water Dog	1
Cavalier King Charles	4	Rhodesian Ridgeback	1
Chesapeake Bay Retriever	1	Riesenschnauzer	1
Chihuahua	3	Schapendoes	1
Chinese crested dog	1	Sheltie	1
Dachshund	3	Shiba Inu	1
Dobermann Pinscher	2	Shih Tzu	1
English Cocker Spaniel	4	Small Munsterlander	1
English Springer Spaniel	1	Spitz	2
Estrela Mountain Dog	1	Staffordshire Bull Terrier	1
Flatcoated Retriever	1	Vizsla	2
Fox Terrier	1	Weimaraner	2
French Bulldog	5	Whippet	1
Galgo Espanol	3	Yorkshire Terrier	2

*De vetgedrukte rassen behoren tot de rassen waar de 4-bp deletiemutatie in het *ABCB1*-gen in het verleden beschreven werd.