

**Antibakterielle und antivirale Abwehrreaktionen in  
unterschiedlichen Entwicklungsstadien der  
Honigbiene (*Apis mellifera*)**

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**



**vorgelegt von**

**Klara Azzami**

**aus**

**Bad Mergentheim**

**Würzburg 2011**



**Antibakterielle und antivirale Abwehrreaktionen in  
unterschiedlichen Entwicklungsstadien der  
Honigbiene (*Apis mellifera*)**

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Klara Azzami**

**aus**

**Bad Mergentheim**

**Würzburg 2011**

Eingereicht am: .....  
Bei der Fakultät für Biologie

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler, Lehrstuhl für Verhaltensphysiologie und  
Soziobiologie

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Tautz, Lehrstuhl für Verhaltensphysiologie und Soziobiologie

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Hildburg Beier, Lehrstuhl für Biochemie

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Antibakterielle und antivirale Abwehrreaktionen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Honigbiene (*Apis mellifera*)“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

(Klara Azzami)

## Danksagung

**Frau Prof. Dr. Hildburg Beier** (Lehrstuhl für Biochemie) danke ich für die umfassende Unterstützung, für die vielen konstruktiven Gespräche, aber auch für die konstruktive Kritik, die mich weitergebracht hat.

In gleichem Maße danke ich **Herrn Prof. Dr. Jürgen Tautz** (Lehrstuhl für Verhaltensphysiologie und Soziobiologie) für viele interessante Gespräche und für jedwede erteilte Unterstützung, ohne die ich ebenfalls nicht so weit gekommen wäre.

Bei **Frau Prof. Charlotte Förster** und **Herrn Prof. Erich Buchner** möchte ich mich für die Benutzung der Spülküche und des Autoklaven bedanken, denn auch dadurch wurde diese Arbeit möglich. Frau **Dr. Ursula Rdest** danke ich für den *M. flavus*-Stamm, der in vielen Experimenten Verwendung fand.

Sowohl **Herrn PD Dr. Stefan Fuchs und seinen Mitarbeitern des Instituts für Bienenkunde in Oberursel**, als auch **allen Mitgliedern des Fachzentrums Bienen in Veitshöchheim** danke ich für die gute Zusammenarbeit, hauptsächlich für die Bereitstellung von Bienenlarven während der Wintermonate.

**Herrn Dr. Wolfgang Ritter** (CVUA, Freiburg) danke ich für die ABPV-Suspension, die in dieser Arbeit verwendet wurde.

**Herrn Prof. Dr. Hans J. Gross** danke ich für sein stetes Interesse an dieser Arbeit und viele konstruktive Gedanken. Außerdem danke ich ihm für die Möglichkeit der Zusammenarbeit mit **Antonina Fedorova** und **Frau Prof. Dr. Marina Zenkova** (Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk), bei denen ich mich wiederum für die gute Zusammenarbeit bedanken möchte aus der eine Publikation über den Einsatz von künstlichen RNasen im ABPV-Larven-Modell hervorging.

Außerdem möchte ich mich bei **Dr. Jörg Reinders** für die geduldige Sequenzierung vieler Proteine bedanken, bei **Dr. Stefan Albert** für die gute Zusammenarbeit in Bezug auf die Expression des immunspezifischen Proteins IRp30 und bei **Dr. Olaf Gimple**, der mir immer

mit Rat und Tat zur Seite stand. Dank gilt außerdem **Heike Gätschenberger**, zum Einen für die Hilfe bei der Nodulipräparation, zum Anderen aber auch für viele Gespräche, die über das Wissenschaftliche hinausgingen. Nicht zu vergessen alle Mitglieder und ehemaligen Mitglieder der **BEEgroup** (allen voran **Mario Pahl, Hartmut Vierle, Helga Heilmann, Nicole Höcherl, Daniel Michelberger** und **Eva Herter**), denen ich für die erhaltene Unterstützung, aber auch für die willkommene Abwechslung in vielen Momenten danken möchte. **Dirk Ahrens-Lagast** danke ich für die Bereitstellung der Bienenvölker und viele Antworten auf allgemeine Imkerfragen. Darüber hinaus danke ich **Gudrun Grimmer** und **Karin Möller** für die Einführung in und tatkräftige Unterstützung bei einigen Experimenten. Allen Mitgliedern der **Zoologie II** danke ich für das freundliche Miteinander und auch für die Hilfe bei einigen kleineren Problemen.

Dank gilt **meiner Familie**, die zwar nicht immer verstand, warum ich mich den Bienen zugewandt habe, mich aber trotzdem immer unterstützt hat. **Meinem Mann** danke ich dafür, dass er so ist wie er ist und schon seine Anwesenheit mich oft zur Ruhe kommen ließ.

Abschließend möchte ich meine Dankbarkeit gegenüber der **Universität Würzburg** ausdrücken, die mir im ersten Jahr ein Stipendium gewährte, und gegenüber der **Deutschen Forschungsgemeinschaft**, die mir durch Mitgliedschaft im SFB 567 die Möglichkeit zu dieser Arbeit bot.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b><u>1. Einleitung</u></b> .....	1
<b>1.1. Die eusoziale Honigbiene <i>Apis mellifera</i></b> .....	1
1.1.1. Superorganismus Bienenvolk.....	1
1.1.2. Sommerbienen, Winterbienen und der Fettkörper .....	3
1.1.3. Bedeutung für Biodiversität und Wirtschaft .....	5
<b>1.2. Bienenkrankheiten und Colony Collapse Disorder (CCD)</b> .....	6
<b>1.3. Bienenviren</b> .....	8
<b>1.4. Die angeborene Immunantwort der Honigbiene</b> .....	11
<b>1.5. Antivirale Abwehrmechanismen</b> .....	13
<b>1.6. Aufgabenstellung</b> .....	15
<b><u>2. Material</u></b> .....	16
<b>2.1. Larvenfutter und Material für die <i>In-vitro</i>-Aufzucht</b> .....	16
<b>2.2. Antikörper</b> .....	16
<b>2.3. Enzyme und künstliche RNase</b> .....	16
<b>2.4. Längenstandards für Protein- und DNA-Gele</b> .....	17
<b>2.5. Verwendete Elizitoren</b> .....	17
<b>2.6. Verwendete Bakterienstämme</b> .....	17
<b>2.7. Medien für die Bakterienkultur</b> .....	18
<b>2.8. Chemikalien</b> .....	18
<b>2.9. Puffer und Lösungen</b> .....	20
<b>2.10. Sonstige Materialien</b> .....	21
<b>2.11 Geräte</b> .....	22
<b><u>3. Methoden</u></b> .....	23
<b>3.1. Die <i>In-vitro</i>-Aufzucht von Larven</b> .....	23

3.1.1. Larvenfutter und Gefriertrocknung des Gelée Royales.....	23
3.1.2. Beschreibung der <i>In-vitro</i> -Aufzucht von Larven .....	24
<b>3.2. Bienenmaterial für Versuchszwecke .....</b>	<b>25</b>
3.2.1. Sammeln von Bienenpuppen und Haltung im Labor .....	25
3.2.2. Sammeln und eventuelle Markierung von Jungbienen .....	26
3.2.3. Sammeln von Ammen-, Honigraum-, Flugbienen und Pollensammlerinnen .....	27
3.2.4. Sammeln von Winterbienen .....	27
3.2.5. Haltung von Königinnen im Labor .....	27
<b>3.3. Infektion von Larven, Puppen und Bienen.....</b>	<b>27</b>
3.3.1. Vorbereiten der Glaskapillaren .....	27
3.3.2. Vorbereiten der Lösungen zur Injektion .....	28
3.3.3. Injektion von Lösungen in Larven, Puppen und Bienen.....	29
<b>3.4. Herstellung von Kopfextrakten.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5. Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese.....</b>	<b>30</b>
3.5.1. Entnahme von Hämolymphe aus Bienenlarven und Bienen .....	30
3.5.2. Entnahme und Verarbeitung der Hämolymphe aus Puppen .....	31
3.5.3. Gewinnung von Hämozyten aus Hämolympfproben .....	31
<b>3.6. Auftrennung von Proteinen durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....</b>	<b>32</b>
3.6.1. Laemmli-Puffersystem (Laemmli, 1970).....	34
3.6.2. Tricine-Puffersystem (Schägger und Jagow, 1987) .....	35
<b>3.7. Zwei-dimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2DE) .....</b>	<b>35</b>
3.7.1. Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	35
3.7.2. Zweite Dimension – Gelelektrophoretische Auftrennung .....	37
<b>3.8. Proteinbestimmung nach Bradford (1976) .....</b>	<b>38</b>
<b>3.9. Färben der Polyacrylamidgele mittels Coomassie Blau G250 .....</b>	<b>40</b>
<b>3.10. Massenspektrometrische (MS) Analyse von Proteinen .....</b>	<b>40</b>
<b>3.11. Western-Blot und Immunodetektion.....</b>	<b>41</b>
3.11.1. Übertragung von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Semi-Dry Blot) .....	41
3.11.2. Immunodetektion .....	43
3.11.3. Ablösen der Antikörper des Western-Blots („stripping“) .....	44
<b>3.12. RNA-Aufreinigung .....</b>	<b>45</b>
<b>3.13. Reverse Transkription (RT) und PCR .....</b>	<b>46</b>
<b>3.14. Agarosegele zum Auftrennen von DNA-Fragmenten .....</b>	<b>48</b>
<b>3.15. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten im Hämocoel .....</b>	<b>50</b>
<b>3.16. Hemmhof-Test .....</b>	<b>50</b>

<b>3.17. Nodulipräparation bei adulten Bienen.....</b>	<b>51</b>
<b>3.18. Inaktivierung von ABPV durch die künstliche RNase Dp12F6.....</b>	<b>51</b>
<b><u>4. Ergebnisse</u> .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Von der Larve über die Puppe zur Jungbiene .....</b>	<b>53</b>
4.1.1. Unterschiede im allgemeinen Hämolymp- Proteinmuster .....	53
4.1.2. Unterschiedliche Expression von immunspezifischen Peptiden bzw. Proteinen bei Larven, Jungbienen und Puppen .....	55
4.1.3. Die Auswirkung verschiedener Elizitoren auf das humorale Immunsystem von Larven und Jungbienen .....	60
<b>4.2. Alters- bzw. aufgabenspezifische Unterschiede im Hämolymp- Proteinmuster .....</b>	<b>63</b>
4.2.1. Ein Vergleich zwischen Jungbienen und Pollensammlerinnen.....	63
4.2.2. Das Hämolymp- Proteom verschiedener Arbeitsgruppen des Bienenvolkes und Veränderungen mit steigendem Alter .....	64
4.2.3. Proteinexpression in den Köpfen von Jungbienen, Ammenbienen, Nektar- und Pollensammlerinnen .....	66
<b>4.3. Expression der immunspezifischen Proteine IRp30 und Carboxylesterase1 (CE1). 68</b>	<b>68</b>
4.3.1. Der zeitliche Verlauf der Expression von IRp30 und CE1 in Jungbienen.....	68
4.3.2. Wo wird IRp30 exprimiert? .....	69
4.3.3. Expression von immunspezifischen Proteinen in Sammel- und Winterbienen ...	70
4.3.4. Kastenübergreifende Expression von IRp30 und CE1 .....	74
<b>4.4. Zelluläre Immunantwort .....</b>	<b>76</b>
4.4.1. Abnahme bakterieller, koloniebildender Einheiten in Jungbienen .....	76
4.4.2. Abnahme bakterieller, koloniebildender Einheiten in älteren Bienen .....	77
4.4.3. Puppen reagieren anders als adulte Bienen auf Bakterieninfektion .....	78
<b>4.5. Merkmale der verwendeten Akuten Bienen Paralyse Virus (ABPV)-Suspension....</b>	<b>81</b>
4.5.1. Organisation und Prozessierung der Capsidproteine .....	81
4.5.2. Reinheit der verwendeten ABPV-Suspension.....	83
<b>4.6. Auswirkungen einer ABPV-Infektion auf Larven .....</b>	<b>84</b>
4.6.1. Konzentrationsabhängige Unterschiede - alles oder nichts.....	85
4.6.2. Keine wesentlichen Unterschiede zwischen einer ABPV-Infektion in Arbeiterinnenlarven und Drohnenlarven.....	87
4.6.3. Der zeitliche Verlauf der viralen Vermehrung von ABPV in Larven.....	88
<b>4.7. Auswirkungen einer ABPV-Infektion auf adulte Bienen .....</b>	<b>92</b>
4.7.1. Jungbienen haben eine andere LD <sub>50</sub> als Larven .....	92
4.7.2. Die virale Vermehrung ist in Jungbienen langsamer als in Larven .....	94
4.7.3. Hämozyten als Ort der Virusvermehrung?.....	98
<b>4.8. Unterschiedliche virale Vermehrung in 8d-alten Bienen, Sammel- und Winterbienen .....</b>	<b>99</b>

<b>4.9. Doppelinfektion mit ABPV und <i>E. coli</i></b> .....	<b>104</b>
4.9.1. Doppelinfektion von Larven .....	105
4.9.2. Doppelinfektion von Jungbienen .....	107
4.9.3. Auswirkungen einer ABPV-Infektion auf die Nodulation.....	108
<b>4.10. Reaktion von Puppen auf eine ABPV-Infektion.....</b>	<b>110</b>
<b>4.11. Die Behandlung von ABPV mit einer künstlichen RNase (aRNase) führt zu einer Inaktivierung des Virus.....</b>	<b>112</b>
4.11.1. Toxizitäts-Test an Larven.....	112
4.11.2. Wirksamkeit der künstlichen RNase Dp12F6.....	114
<b><u>5. Diskussion</u>.....</b>	<b>118</b>
<b>5.1. Aufbau und Prozessierung des Polyproteins ORF2 von ABPV .....</b>	<b>119</b>
<b>5.2. Reaktionen von Larven.....</b>	<b>120</b>
5.2.1. Auswirkungen einer Bakterieninfektion .....	120
5.2.2. Auswirkungen einer ABPV- oder SBV-Infektion .....	121
<b>5.3. Reaktionen während des Puppenstadiums .....</b>	<b>124</b>
5.3.1. Auswirkungen einer Bakterieninfektion auf das Puppenstadium .....	125
5.3.2. Auswirkungen einer ABPV-Infektion auf das Puppenstadium.....	126
<b>5.4. Reaktionen von adulten Bienen .....</b>	<b>128</b>
5.4.1. Auswirkungen einer Bakterieninfektion auf adulte Bienen .....	128
5.4.2. Auswirkungen einer ABPV-Infektion.....	134
<b>5.5. Vorteile des ABPV-Larven-Modells zum Überprüfen der Wirksamkeit künstlicher RNasen .....</b>	<b>138</b>
<b><u>6. Zusammenfassung</u>.....</b>	<b>140</b>
<b><u>7. Summary</u>.....</b>	<b>143</b>
<b><u>8. Literaturverzeichnis</u> .....</b>	<b>146</b>
<b><u>9. Anhang</u> .....</b>	<b>155</b>
Tabelle S28.....	155
Tabelle S29.....	156
Tabelle S31.....	158
<b><u>10. Publikationen</u>.....</b>	<b>159</b>
<b><u>11. Lebenslauf</u>.....</b>	<b>161</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

% (v/v)	Volumenprozent (,,volume per volume“)
% (w/v)	Gewichtszent (,,weight per volume“)
$A_x$	Absorption bei der Wellenlänge x nm
ad	auf das angegebene Volumen mit dem angegebenen Lösungsmittel auffüllen
Abb.	Abbildung
ABPV	Akutes Bienen Paralyse Virus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aRNase	Künstliche RNase („artificial RNase“)
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BQCV	Black Queen Cell Virus
BSA	Albumin aus Rinderserum („bovine serum albumin“)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
d	Tag(e)
Da	Dalton
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
DWV	Deformed Wing Virus
<i>E.c. 682</i>	<i>Escherichia coli 682</i>
g	Gramm
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
IAPV	Israelisches Akutes Paralyse Virus
K	Kilo-, 10 <sup>3</sup>
kb	Kilobasen
KBE	Koloniebildende Einheiten
KBV	Kashmir Bienen Virus

kDa	Kilodalton
L	Lysozym
m	Milli-, $10^{-3}$
M	molar
$\mu$	Mikro-, $10^{-6}$
ml	Milliliter
mm	Millimeter
<i>M. flavus</i>	<i>Micrococcus flavus</i>
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht
n.i.	nicht-infiziert
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> e <u>l</u> elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $H^+$ -Konzentration
PAA	Polyacrylamid
p.i.	Nach der Injektion („post-injection“)
PTU	Phenylthioharnstoff („Phenylthiourea“)
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde(n)
SBV	Sackbrut Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat („Sodiumdodecylsulfate“)
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
$T_m$	Schmelztemperatur
Tricine	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt
y	Jahr („year“)

# **1. Einleitung**

## **1.1. Die eusoziale Honigbiene *Apis mellifera***

### **1.1.1. Superorganismus Bienenvolk**

Schon 1911, vor genau 100 Jahren, beschrieb Wheeler am Beispiel von Ameisenkolonien warum Insektenkolonien als eigene Organismen bezeichnet werden sollten. Den Begriff „Superorganismus“ prägte er allerdings erst 1928. In seiner Arbeit von 1911 definiert er einen „Organismus“ als System von Aktivitäten. Die Basis-Aktivitäten beschreibt er als Nahrung (Aufnahme oder Suche), Fortpflanzung und Schutz (vermutlich Selbstschutz). Schon die einfachsten Zellaggregate weisen diese Eigenschaften auf. Spezialisierte Tiere können sich zu Sozietäten zusammenschließen, deren Leitmotiv die Reproduktion ist. Solche Sozietäten können sehr komplexe Strukturen annehmen, wobei er den Menschen als Beispiel anführt. Ausgehend von dieser Arbeit sprechen im Wesentlichen zwei Gründe dafür, Insektenkolonien als Organismen zu bezeichnen: 1. Die Individualität der Kolonie: sie verhält sich als einheitliches Ganzes, was auch im Charakter des Nestaufbaus gesehen werden kann, denn jedes Nest ist einzigartig und widersetzt sich einem Zusammenschluss mit einem anderen Nest. 2. Eine Kolonie besteht aus einer Keimbahn, d.h. der Königin, den jungfräulichen Königinnen und Männchen, und dem Soma, d.h. den sterilen Arbeiterinnen, die sich um die Aufzucht des Nachwuchses und alle anderen Aufgaben kümmern.

Während alle Ameisen- und Termitenarten eusozial sind, befinden sich viele Bienen- und Wespenarten noch am Anfang oder in einem Zwischenstadium der Kolonieevolution (Hölldobler und Wilson, 2009, S. 13). Honigbienen allerdings haben schon den Sprung zur echten Eusozialität geschafft und können daher zu Recht als „Superorganismus“ bezeichnet werden. Ein Bienenvolk besteht aus einer Königin und im Sommer bis zu 50.000 sterilen Arbeiterinnen (Tautz, 2007, S. 13). Während der fortpflanzungsfähigen Zeit im Frühjahr werden zudem mehrere Jungköniginnen und einige Tausend Drohnen großgezogen. Beim Schwärmen kommt es zur Teilung des Bienenvolkes. Die alte Königin verlässt dabei mit ca. 70 % der Arbeiterinnen den alten Nistplatz und sucht sich einen Neuen (Tautz, 2007, S. 41). Die Jungkönigin übernimmt den alten Nistplatz und die zurückgebliebenen Arbeiterinnen und fängt mit dem Eierlegen an sobald sie vom Jungfernflug zurückkehrt, auf dem sie sich mit mehreren Drohnen paart (Page und Peng, 2001). Ihre einzige Aufgabe besteht von nun an darin Eier zu legen. Im Sommer legt die Königin 1000 bis 2000 Eier pro Tag, je eines in eine

leere, saubere Wabenzelle. Aus befruchteten Eiern entwickeln sich Arbeiterinnen und Königinnen, aus unbefruchteten Eiern Drohnen. Alle drei Kasten der Honigbiene, d.h. Königin, Arbeiterin und Drohne, durchlaufen eine Metamorphose vom Ei bis zur Imago. Allerdings unterscheidet sich die Dauer der Metamorphose der drei Kasten deutlich und ist zudem abhängig von Temperatur, Ernährung und Bienenrasse. Das Embryonalstadium im Ei dauert im Durchschnitt 3 Tage für alle Kasten. Dem schließt sich das Larvenstadium an, das bei Königinnen durchschnittlich 4,6 Tage dauert, bei Arbeiterinnen ca. 5,5 Tage und bei Drohnen ca. 6,3 Tage (Winston, 1987, S. 48-49). Während des Larvenstadiums kommt es zu einer gewaltigen Gewichtszunahme. Zudem wird über die Menge und Qualität des von den Ammenbienen produzierten Futtersaftes entschieden, ob sich aus einem befruchteten Ei eine Arbeiterin oder eine Königin entwickelt. Am Ende des Larvenstadiums wird die Wabenzelle von den Ammenbienen mit einem Wachsdeckel versehen. Es beginnt das Präpuppenstadium. Die Larven entleeren ihren Darm und spinnen sich einen Kokon. Anschließend gehen sie über ins Puppenstadium. Während diesem bilden sich die körperlichen Merkmale einer adulten Biene aus. Anhand der Augenfarbe, die langsam zutage tritt und dunkler wird, und anhand der Färbung der Kutikula kann das Alter der Puppen definiert werden. Das Präpuppen- und Puppenstadium dauert bei Königinnen insgesamt ca. 7-9 Tage, bei Arbeiterinnen ca. 11-14 Tage und bei Drohnen ca. 12-15 Tage. Am Ende des Puppenstadiums kauen sich die Tiere mithilfe ihrer Mandibeln einen Weg durch den Wachsdeckel ihrer Wabenzelle. Die komplette Entwicklungszeit von der Eiablage bis zum Erscheinen der Imago dauert insgesamt bei Königinnen durchschnittlich 16 Tage, bei Arbeiterinnen 21 Tage und bei Drohnen 24 Tage (Winston, 1987, S. 49-51). Eine Besonderheit der Honigbienen ist die altersabhängige Arbeitsteilung (Abb. 1). Interessant ist hierbei, dass die zeitlichen Abläufe der Arbeitsteilung die zeitlich unterschiedliche Entwicklung der Drüsen der Biene widerspiegeln. So wird Futtersaft in den Hypopharynxdrüsen von jungen Bienen produziert, während in mittelalten Bienen die Wachsdrüsen aktiver sind. In älteren Bienen produzieren die Hypopharynxdrüsen dann Enzyme, um Nektar in Honig umzuwandeln. Ab einem Alter von ca. 21 Tagen beginnen die Bienen auszufliegen, um Nektar und Pollen zu sammeln.

Während die allgemeine Abfolge der Arbeiten für alle Bienen relativ stabil ist, so gibt es doch eine enorme Varianz auf der Ebene der einzelnen Biene. Manche Bienen üben eine Tätigkeit nur sehr kurz oder gar nicht aus, während sich andere mehrere Tage damit beschäftigen (Seeley, 1995, S. 29-31). Die hohe Flexibilität der Arbeitsteilung erlaubt es der Kolonie auf unterschiedliche innere und äußere Gegebenheiten zu reagieren und sich so anzupassen, dass ihre Bedürfnisse erfüllt werden (Winston, 1987, S. 102).

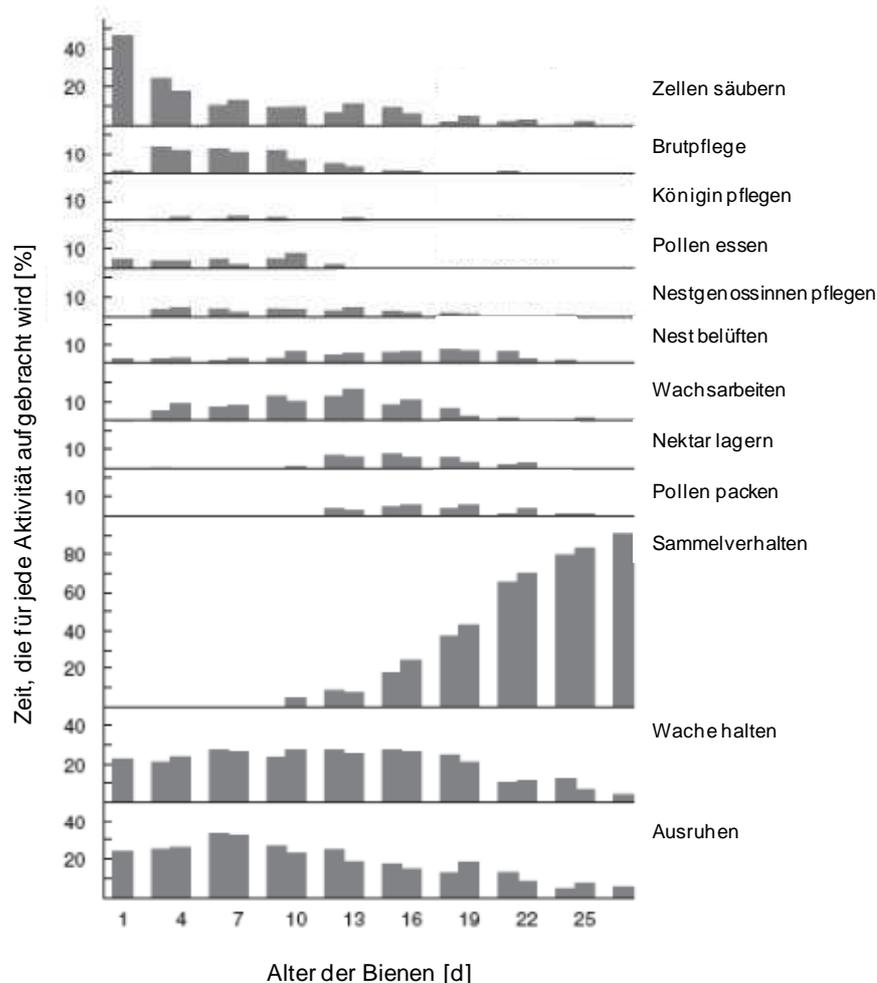


Abb. 1: Altersabhängige Arbeitsteilung der Honigbiene (Seeley, 1995).

### 1.1.2. Sommerbienen, Winterbienen und der Fettkörper

Während der kalten Jahreszeit rotten sich die Winterbienen zu einer annähernd kugelförmigen Wintertraube, mit der Königin in der Mitte, zusammen und halten sich durch Muskelzittern warm (Tautz, 2007, S. 25). Sobald die Tage länger werden fangen die Winterbienen in ihrer Wintertraube an die Temperatur auf ein Brutoptimum zu erhöhen und die Königin legt wieder verstärkt Eier. Mit der Zeit wächst die Kolonie immer schneller. Während der Phase des größten Koloniewachstums werden auch Jungköniginnen und Drohnen zur Reproduktion der Kolonie großgezogen (Seeley, 1995, S. 36). Zur Hochsaison kann ein Volk aus bis zu 50.000 Bienen bestehen, während es im Winter lediglich aus bis zu 20.000 Individuen bestehen kann (Tautz, 2007, S. 13). Ab Spätsommer/Herbst geht die Anzahl an Bienen langsam zurück und es werden immer mehr Bienen produziert, die zwar äußerlich keinerlei Unterschiede aufweisen, sich in ihrer Physiologie aber von den kurzlebigeren Sommerbienen

unterscheiden. Diese langlebigen Winterbienen können 170 Tage und älter werden, während Sommerbienen durchschnittlich nur ca. 20-35 Tage alt werden (Fluri, 1993). Wie es zu diesen Unterschieden zwischen Sommerbienen und Winterbienen kommt, wo doch beide Gruppen die gleichen genetischen Voraussetzungen erfüllen, ist noch nicht vollständig geklärt. Wesentliche Rollen spielen die Bienenrasse, die Nahrungsverfügbarkeit, die Art der durchgeführten Aktivitäten, aber auch saisonale Faktoren. Es ist hier anzumerken, dass Königinnen, die sich von normalen Arbeiterinnen deutlich in ihrer Anatomie und Physiologie unterscheiden, im Allgemeinen 1-3 Jahre alt werden können (Winston, 1987, S. 55-56).

Während das Verhalten und die Physiologie der Sommerbienen relativ gut erforscht sind, gibt vor allem die Physiologie der Winterbienen noch einige Rätsel auf. Ein wichtiger anatomischer Unterschied zwischen Sommerbienen und Winterbienen betrifft die Größe des Fettkörpers. Bei Winterbienen ist er viel stärker ausgeprägt als bei Sommerbienen (Imdorf et al., 2008). Die Fettkörperzellen von Insekten kontrollieren die Synthese und den Verbrauch von Energiereserven wie Fette und Glykogen, synthetisieren und sekretieren gleichzeitig aber auch große Mengen an Lipophorinen, die verantwortlich sind für den Lipidtransport, und an Speicherproteinen, die während der Metamorphose als Aminosäurequelle dienen. Auch antimikrobielle Peptide werden im Fettkörper gebildet. Einige metabolische Prozesse sind abhängig vom Entwicklungsstadium. Während in Larven vorwiegend Speicherproteine synthetisiert werden, so sind es in adulten Tieren große Mengen an Vitellogenin, einem wichtigen Protein für die Eireifung (Arrese und Soulages, 2010). Bei Bienen ist Vitellogenin nicht nur das Hauptprotein der Hämolymphe von Königinnen, sondern auch von Ammenbienen und Winterbienen. Während es bei Königinnen wohl in erster Linie tatsächlich der Eireifung dient, so sehen Amdam und Omholt (2002) das in großen Mengen vorhandene Speicherprotein Vitellogenin als Hauptgrund für die Langlebigkeit in Winterbienen. Sie zeigen, dass nach dem Schlupf zwischen Tag 3 und 10 der Vitellogenin-Titer rapide ansteigt. Gleichzeitig steigt die Menge an Proteinen in den Hypopharynxdrüsen, die während der Ammenphase zu Futtersaft verarbeitet werden. Eines dieser Proteine ist Vitellogenin, denn Amdam et al. (2004a) fanden, dass sich radioaktives  $C^{14}$  aus Vitellogenin in den Köpfen von injizierten Arbeiterinnen akkumuliert und innerhalb von 12 h auch in Futtersaft, Larven und anderen, nicht-injizierten Bienen finden lässt. Fängt die Biene mit dem Sammeln an sinkt der Vitellogenin-Titer sehr schnell, innerhalb von vier Tagen, bis auf Null. Winterbienen, die weder Brutpflegetätigkeit noch Sammeltätigkeit inne hatten, zeigen einen extremen Anstieg an Vitellogenin, stärker noch als Ammenbienen. Dieser hohe Vitellogenin-Titer hält sein Niveau für ca. 3 Monate, bevor er zum Frühjahr hin langsam absinkt.

Es gibt mehrere Arbeiten, die versuchen die Frage zu beantworten, auf welche Art und Weise Vitellogenin zur Langlebigkeit in Bienen beiträgt. Amdam et al. (2004b) zeigten, dass ein Mangel an Zink in Zellkulturen zu einem Absterben an Hämocyten führt. Da Vitellogenin als Haupt-Zinkträger in Honigbienen fungiert, ist es wohl aus einem einfachen Grund für die Langlebigkeit verantwortlich: je mehr Vitellogenin, desto mehr Zink, desto mehr Hämocyten, desto stärker die zelluläre Immunantwort. Kurzlebige Sammelbienen z.B. können nur geringe Mengen an Hämocyten vorweisen (Bedick et al., 2001). Allerdings fanden Schmid et al. (2008), dass es wohl doch nicht so einfach zu sein scheint, da ein temporärer Rückgang an Hämocyten nicht allein Sammlerinnen betrifft, sondern auch in Drohnen und langlebigen Königinnen beobachtet werden kann. So haben Königinnen einen Hämocyten-Tiefpunkt bei einem Alter von ca. 12 Monaten. Gleichzeitig zeigt sich keinerlei Auswirkung auf die Phenoloxidase-Aktivität, einem wesentlichen Bestandteil der Immunantwort. Eine andere mögliche Erklärung der Langlebigkeit besteht darin, dass Vitellogenin vor oxidativem Stress schützt. Es wurde gezeigt, dass die Herunter-Regulierung von Vitellogenin mittels RNAi zu einer erhöhten Sterblichkeit der Bienen nach Injektion von Paraquat führt, einer Substanz, die reaktive Sauerstoff-Spezies induziert (Seehus et al., 2006). Da Altern sehr komplex ist und momentan in vielen Organismen intensiv erforscht wird, sind in den nächsten Jahren sicher noch mehr Arbeiten zu diesem Thema zu erwarten.

### **1.1.3. Bedeutung für Biodiversität und Wirtschaft**

Geschätzte 40 % der Weltwirtschaft basieren auf biologischen Produkten und Prozessen. Vor allem Menschen in Regionen mit geringen Erträgen sind stark abhängig von der genetischen Diversität ihrer Umwelt. Der sinnvolle Nutzen dieser Biodiversität ist daher Voraussetzung für nachhaltige Entwicklung. Leider führt gerade menschliches Verhalten dazu, dass Pflanzen- und Tierarten mit einer Geschwindigkeit ausgelöscht werden, die höher ist als die natürliche Aussterberate (UNEP, 2010). Eine wesentliche Grundvoraussetzung für Biodiversität ist Bestäubung, unter anderem durch Honigbienen, Wildbienen, Hummeln, Wespen, aber auch durch Käfer, Motten, Fliegen, Schmetterlinge, Vögel, Fledermäuse und sogar Primaten. In den USA sind allein Honigbienen mit ihrer Bestäubungsleistung verantwortlich für 1/3 der Nahrungsmittel, dazu gehören viele Früchte, Gemüse, Nüsse, aber auch verschiedene Getreidesorten (Johnson, 2010). In der EU ist es ähnlich. Hier gibt es ca. 700.000 Imker, davon sind ca. 97 % Hobby-Imker mit weniger als 150 Völkern. Der Honigertrag allein beläuft sich auf ca. 200.000 Tonnen (European Union, 2010).

## 1.2. Bienenkrankheiten und Colony Collapse Disorder (CCD)

Aufgrund der hohen Bevölkerungsdichte und der nahen Verwandtschaftsverhältnisse ist eine Kolonie ständig von verschiedenen Krankheiten bedroht, deren Verursacher Bakterien, Pilze oder auch Viren sein können. Interessanterweise sind die meisten Krankheiten entweder brutspezifisch oder spezifisch für adulte Bienen. Hinzu kommen einige Parasiten, deren Befall sich ebenfalls stark negativ auf die Volksentwicklung auswirken kann, bis hin zum Tod der Kolonie. Im Folgenden sind einige der wichtigsten Krankheiten aufgeführt.

Die „Amerikanische Faulbrut“ wird vom gram-positiven Bakterium *Paenibacillus larvae* hervorgerufen. Da *Paenibacillus* in Form von Sporen Hitze- und Trockenphasen überstehen kann gilt er als bösartigste Bruterkrankung. Befallene Larven und jüngere Puppen werden durch ein bakterielles Enzym verdaut und enden als schwarze Schuppe am Boden der Zelle. Die „Europäische Faulbrut“ wird von *Streptococcus pluton* (neuer Name: *Melissococcus pluton*) hervorgerufen. Dabei handelt es sich ebenfalls um ein gram-positives Bakterium, das allerdings nicht ganz so gefährlich ist, da es keine Sporen bildet. Es erkranken vor allem jüngere Larven, die dann ebenfalls als schwarze Schuppe am Zellboden enden. Bei der „Kalkbrut“ erscheint die infizierte Brut als feste Klumpen, die an Kalkstücke erinnert, daher der Name. Auslöser ist der Pilz *Ascosphaera apis*. Die „Kalkstücke“ können neben weiß auch grau oder schwarz erscheinen, je nachdem ob *Ascosphaera* gerade Fruchtkörper ausbildet. Hohe Luftfeuchtigkeit und kühle Temperaturen begünstigen einen Befall (Sanford, 1987).

Für adulte Bienen sehr gefährlich werden kann eine Infektion mit *Nosema apis* oder *Nosema ceranae*. Diese Mikrosporidie wird als Spore aufgenommen und vermehrt sich im Mitteldarm (Bailey, 1955). Neben vielen anderen Symptomen ist das Hauptsymptom für Nosemose ein schwerer Durchfall. Die erste Arbeit, die sich mit *N. apis* und dem Krankheitsverlauf beschäftigt, ist schon über 100 Jahre alt (Zander, 1909). Im Gegensatz dazu ist *N. ceranae*, ursprüngliches Pathogen von *Apis cerana*, in Europa noch relativ neu und wurde erst 2005 in Spanien nachgewiesen (Higes et al., 2006). Schon bald stellte sich heraus, dass *N. ceranae* in *Apis mellifera* virulenter ist als *N. apis* (Higes et al., 2007). Klee et al. (2007) konnten eine weltweite Verbreitung von *N. ceranae* nachweisen und vermuten, dass diese erst im letzten Jahrzehnt stattfand. Zudem sieht es so aus, als ob *N. apis* von *N. ceranae* verdrängt wird.

Eine weitere Bienenpest, die vor über 30 Jahren den Sprung von *Apis cerana* auf *Apis mellifera* geschafft hat, ist die *Varroa*-Milbe (Abb. 2).



**Abb. 2:** *Varroa*-Milbe auf Jungbiene. (Foto: Mario Pahl)

Es existieren zwei Arten: *Varroa jacobsoni* und *Varroa destructor*. Von beiden existieren zudem mehrere Haplotypen, von denen es interessanterweise ausschließlich der Korea-Haplotyp von *Varroa destructor* ist, der sich in Europa durchgesetzt hat (Anderson und Trueman, 2000). Inzwischen hat sich die Milbe weltweit verbreitet, mit Ausnahme von Australien, und würde ohne regelmäßige Behandlung der Bienenvölker innerhalb von 2-3 Jahren zu deren Kollaps führen. *Varroa* vermehrt sich in den verdeckelten Brutzellen und ernährt sich dort von der Hämolymphe der Puppen. Außerhalb der Brutzellen sitzt die Milbe auf adulten Bienen und ernährt sich von deren Hämolymphe (Rosenkranz et al., 2009). Abgesehen von dieser allgemeinen Schwächung der Bienen durch den Hämolymphverlust gibt es Hinweise darauf, dass *Varroa* das Immunsystem seines Wirtes negativ beeinflusst (Yang und Cox-Foster, 2005). Außerdem scheint ein Milbenbefall das Lernverhalten von Sammelbienen derart negativ zu beeinflussen, dass sie schlechter zum Bienenstock zurückfinden (Kralj et al., 2006). Der schlimmste Nebeneffekt eines *Varroa*-Befalls ist aber wohl die Übertragung von Viren durch die Milbe. Nachgewiesenermaßen übertragen werden das Akute Bienen Paralyse Virus (ABPV; Ball und Allen, 1988), das Deformed Wing Virus (DWV; Bowen-Walker et al., 1999), das Israelische Akute Paralyse Virus (IAPV; Di Prisco et al., 2011) und das Kashmir Bienen Virus (KBV; Shen et al., 2005a). Das Sackbrut Virus (SBV) wurde zwar direkt in *Varroa* gefunden, was eine Übertragung nahelegt, allerdings konnte in Bienenproben aus *Varroa*-befallenen Kolonien keine erhöhte Menge an SBV festgestellt werden, ganz im Gegensatz zu den deutlich erhöhten Mengen an KBV und DWV (Shen et al., 2005a, b).

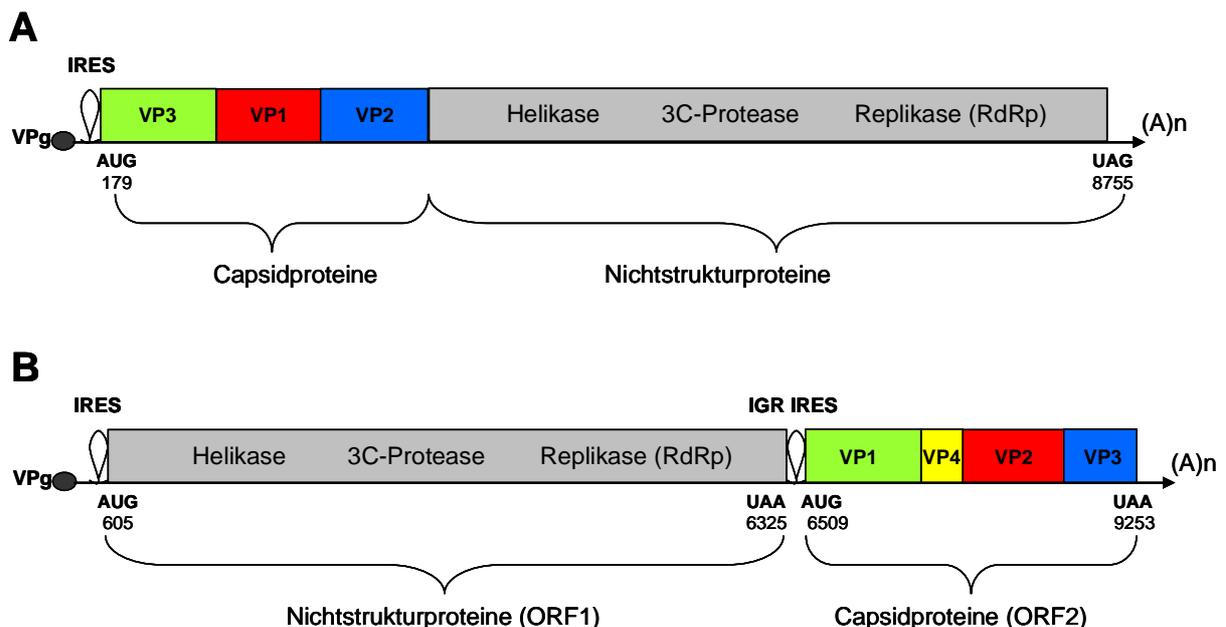
Als ob die *Varroa*-Milbe allein nicht schon ein großes Problem darstellen würde, tauchte 2006 eine neue Bedrohung auf: das Colony Collapse Disorder (CCD) Phänomen.

Schätzungsweise 23 % der Imker in Amerika waren im Winter 2006/2007 betroffen, einige verloren bis zu 90 % ihrer Völker (Stokstad, 2007). Und auch im darauffolgenden Winter führte CCD zu hohen Verlusten. Merkmale des Phänomens: In betroffenen Völkern verschwinden innerhalb kürzester Zeit alle Bienen, allerdings werden keine toten Bienen im Stock oder in dessen Nähe gefunden. Schließlich bleibt nur noch die Königin mit einigen frischgeschlüpften Arbeiterinnen und der verdeckelten Brut zurück. Die üblicherweise gleich auftretende Räuberei der zurückbleibenden Futterreserven erfolgt mit einer deutlichen Verzögerung. Eine großangelegte Untersuchung der Mikroflora von betroffenen Stöcken und Vergleich mit gesunden Stöcken brachte vor allem das bis dahin relativ unbekanntes Israelische Akute Paralyse Virus (IAPV) mit CCD in Verbindung. Zudem sind CCD-betroffene Völker wesentlich häufiger von mehreren Pathogenen gleichzeitig befallen (Cox-Foster et al., 2007). Allerdings wurde das Problem bald komplexer, da eine Infektion mit IAPV in Australien keine stark negativen Auswirkungen zeigt. Wobei das wiederum auch damit zusammenhängen könnte, dass es in Australien keine *Varroa*-Milben gibt, die das Virus übertragen und eventuell das Immunsystem der Bienen schwächen. Eine weitere mögliche Erklärung für CCD liegt im Stress, dem Wandervölker ausgesetzt sind, die im Jahr große Entfernungen zurücklegen (Stokstad, 2007). Auch die CCD-Proben von Cox-Foster et al. (2007) stammen allesamt aus Wandervölkern. Inzwischen geht man davon aus, dass es mehrere Faktoren sind, die vermutlich zusammenspielen. Dazu gehören unter anderem die bereits bekannten Bienenkrankheiten und Parasiten, außerdem Pestizide und Stress, schlechte Wetterbedingungen und Nahrungsmangel bzw. einseitige Ernährung (Ratnieks und Carreck, 2010; vanEngelsdorp und Meixner, 2010).

### **1.3. Bienenviren**

Im Jahr 1913 wurde erstmals ein Virus als Auslöser einer spezifischen Bienenkrankheit ausgemacht. Da infizierte, gestorbene Larven aussahen wie kleine geschlossene Säcke war der Name schnell gefunden: Sackbrut Virus (White, 1913). Seitdem kamen immer mehr Viren hinzu. Bailey und Ball (1991) beschreiben insgesamt 17 *Apis*-spezifische Viren, von denen 3 spezifisch sind für *Apis cerana*. Allen und Ball (1996) zählen hingegen 18 Viren, die weltweit Honigbienen befallen, allerdings wird hier nicht klar wo der Unterschied zwischen dem Deformed Wing Virus (DWV) von *Apis mellifera* und *Apis cerana* liegen soll. Neu hinzugekommen sind inzwischen das Kakugo Virus (KV), das sehr nahe verwandt ist zum DWV (Fujiyuki et al., 2004) und das Israelische Akute Paralyse Virus (IAPV; Maori et al.,

2007). Bis auf zwei Ausnahmen werden alle Bienenviren zur Superfamilie der Picorna-ähnlichen gezählt. Gründe dafür sind das positiv-orientierte, einzelsträngige RNA-Genom mit einem kleinen Protein (VPg) anstelle einer Cap-Struktur am 5'-Ende und zudem die ikosaedrische Struktur der Capsidhülle, mit einem Durchmesser von ca. 17-30 nm (Bailey und Ball, 1991; Chen und Siede, 2007). Durch voranschreitende Sequenzierungen der Genome vieler Insektenviren fand man vor einigen Jahren auch Unterschiede in der Genomorganisation vieler Bienenviren. Die Genome von SBV, DWV, KV und SBPV (Slow Bee Paralysis Virus) sind monocistronisch, d.h. sie besitzen ein für picorna-ähnliche Viren typisches, singuläres offenes Leseraster (ORF), in dem die Capsidproteine am 5'-Ende und die Nichtstrukturproteine am 3'-Ende codiert sind (Abb. 3A). Die Genome von ABPV, KBV, IAPV und BQCV (Black Queen Cell Virus) hingegen weisen zwei offene Leseraster (ORF) auf, die durch eine Intergenomische Region (IGR) voneinander getrennt sind. In diesem dicistronischen Genom sind die Nichtstrukturproteine im ORF1 am 5'-Ende angeordnet, während die Capsidproteine im ORF2 am 3'-Ende codiert sind (Abb. 3B).



**Abb. 3: Monocistronische und dicistronische Genomorganisation von Bienenviren.** (A) Monocistronischer Genomaufbau am Beispiel von SBV, (B) dicistronischer Genomaufbau am Beispiel von ABPV. AUG und UAG bzw. UAA = Startcodon und Stoppcodons mit jeweiliger Nukleotidposition, VP = Capsidprotein, RdRp = RNA-abhängige RNA-Polymerase, VPg = Viral Protein genome-linked, IRES = Interne Ribosomen-Eintrittsstelle, IGR = Intergenomische Region, ORF = Offenes Leseraster.

Aufgrund dieser Unterschiede werden ABPV, KBV, IAPV und BQCV in der Gattung der Cripaviren zusammengefasst und der neuen Familie der *Dicistroviridae* zugeordnet, während SBV, DWV, KV und SBPV in der Gattung der Iflaviren zusammengefasst werden, die noch

keiner Familie zugeordnet sind (Mayo, 2002). Die wichtigsten Merkmale aller bereits sequenzierten Bienenviren, die zufällig alle ca. 30 nm groß sind, finden sich in Tabelle 1.

**Tabelle 1: Merkmale bereits sequenzierter Bienenviren.**

Virus	Genom	Länge (+PolyA)	Genomorganisation	Acc. Number (NCBI)	Aufbau der Hülle
ABPV	+ ssRNA	9.491 Nt	Dicistronisch	AF 150629	4 Strukturproteine (35, 33, 24 und 9,4 kDa)
IAPV	+ ssRNA	9.499 Nt	Dicistronisch	EF 219380	4 Strukturproteine (35, 33, 26, 17 kDa)
KBV	+ ssRNA	9.524 Nt	Dicistronisch	AY 275710	4 Strukturproteine (kleinstes 5,6 kDa)
BQCV	+ ssRNA	8.550 Nt	Dicistronisch	AF 183905	4 Strukturproteine (34, 32, 29 und 6 kDa)
SBV	+ ssRNA	8.832 Nt	Monocistronisch	AF 092924	3 Strukturproteine (29,5, 30,5 und 31,5 kDa)
DWV	+ ssRNA	10.166 Nt	Monocistronisch	AY 292384	4 Strukturproteine (44, 32, 28 und vermutlich 2,3 kDa)
KV	+ ssRNA	10.152 Nt (-PolyA)	Monocistronisch	AB 070959	Vermutlich 3-4 Strukturproteine
SBPV	+ ssRNA	~ 9.500 Nt	Monocistronisch	EU 035616 GU 938761	3 Strukturproteine (46, 29 und 27 kDa)

Literaturquellen: ABPV (Govan et al., 2000), IAPV (Maori et al., 2007), KBV (de Miranda et al., 2004), BQCV (Leat et al., 2000), SBV (Ghosh et al., 1999), DWV (Lanzi et al., 2006), KV (Fujiyuki et al., 2004), SBPV (de Miranda et al., 2010b).

Die Übertragung dieser Viren innerhalb einer Bienenkolonie kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. So wird bei einer vertikalen Übertragung das Virus direkt von der Königin an ihre Nachkommen weitergegeben, wobei das Virus schon in den Eiern nachgewiesen werden kann. Zudem gibt es mehrere Formen der horizontalen Übertragung, wobei das Virus von Biene zu Biene oder Biene zu Larve übertragen werden kann. Eine horizontale Übertragung kann durch gegenseitiges Füttern stattfinden oder durch die Aufnahme von mit Kot verunreinigten Honig- oder Pollenvorräten. Zudem kann es sein, dass die Jungkönigin bei der Paarung von virus-infizierten Drohnen angesteckt wird. Eine weitere Form der horizontalen Übertragung erfolgt durch die *Varroa*-Milbe, die Viren von einer Biene oder Puppe auf die andere übertragen kann (Chen et al., 2006; Chen und Siede, 2007). Blieben Infektionen mit ABPV und KBV vor der weltweiten Verbreitung von *Varroa* meistens unauffällig bzw. unentdeckt (Allen und Ball, 1996), so wurden ABPV, KBV und DWV seitdem immer

virulenter (Genersch und Aubert, 2010). Ein Grund ist wohl die für DWV nachgewiesene Virusvermehrung in den Milben (Gisder et al., 2009), ein Anderer wohl die Suppression des Immunsystems durch *Varroa* (Yang und Cox-Foster, 2005).

#### **1.4. Die angeborene Immunantwort der Honigbiene**

Bei der staatenbildenden Honigbiene erfolgt eine Pathogenabwehr auf verschiedenen Ebenen, zuallererst auf Kolonieebene. Man spricht auch von „sozialer Immunität“. In diese Kategorie fällt z.B. das Hygieneverhalten, das dazu führt, dass kranke Brut erkannt und aktiv entfernt wird (Spivak und Reuter, 2001) oder das bei *Apis cerana* dazu führt, dass ca. 50 % der *Varroa*-Milben aktiv entfernt werden (Rath, 1999). Auf der Ebene der einzelnen Biene gibt es physikalische und chemische Barrieren wie den undurchdringlichen Chitinpanzer oder den Darm, der durch seinen pH und vorhandene Enzyme relativ gut vor Pathogenen geschützt ist. Sind diese ersten Verteidigungslinien durchbrochen, und das Pathogen gelangt in die Leibeshöhle, kommt das angeborene Immunsystem zum Einsatz. Wie alle Insekten besitzt die Honigbiene lediglich ein angeborenes und kein zusätzliches, adaptives Immunsystem, d.h. sie ist nicht in der Lage Gedächtniszellen auszubilden und Antikörper zu generieren und wird daher auch nie im klassischen Sinn gegen eine Krankheit geimpft werden können. Aber allein schon das angeborene Immunsystem erweist sich als sehr effektiv in der Abwehr von eindringenden Pathogenen. Im Falle des Menschen werden schätzungsweise 95 % der Angriffe vom angeborenen Immunsystem abgewehrt und nur 5 % führen tatsächlich zu einer Erkrankung (Heine, 2004). Das angeborene Immunsystem der Honigbiene lässt sich in drei Komponenten aufteilen: in das Prophenoloxidase-aktivierende System, die zelluläre und die humorale Immunantwort (Abb. 4).

Die zelluläre Komponente umfasst verschiedene Arten von Hämozyten, die in der Lage sind zwischen körperfremd und körpereigen zu unterscheiden. Unter Phagozytose versteht man dabei die Einverleibung und Zerstörung kleinerer Eindringlinge wie Bakterien oder Pilzsporen. Bei der Nodulation werden größere Mengen davon in Aggregaten gefangen und somit unschädlich gemacht. Größere Eindringlinge wie eukaryotische Parasiten werden durch Einkapselung aus dem Kreislauf entfernt (Trenczek, 1998).

Bei der humoralen Immunantwort werden bestimmte, evolutionär konservierte, molekulare Muster (PAMPs = „pathogen associated molecular patterns“) von Bakterien, Pilzen oder Viren durch spezifische Rezeptoren (PRRs = „pattern recognition receptors“) erkannt und Signalkaskaden aktiviert (Toll, Imd, JNK, Jak/STAT) an deren Ende die Expression einer

ganzen Reihe von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) und immunspezifischen Proteinen (IRps) steht.

## Angeborenes Immunsystem

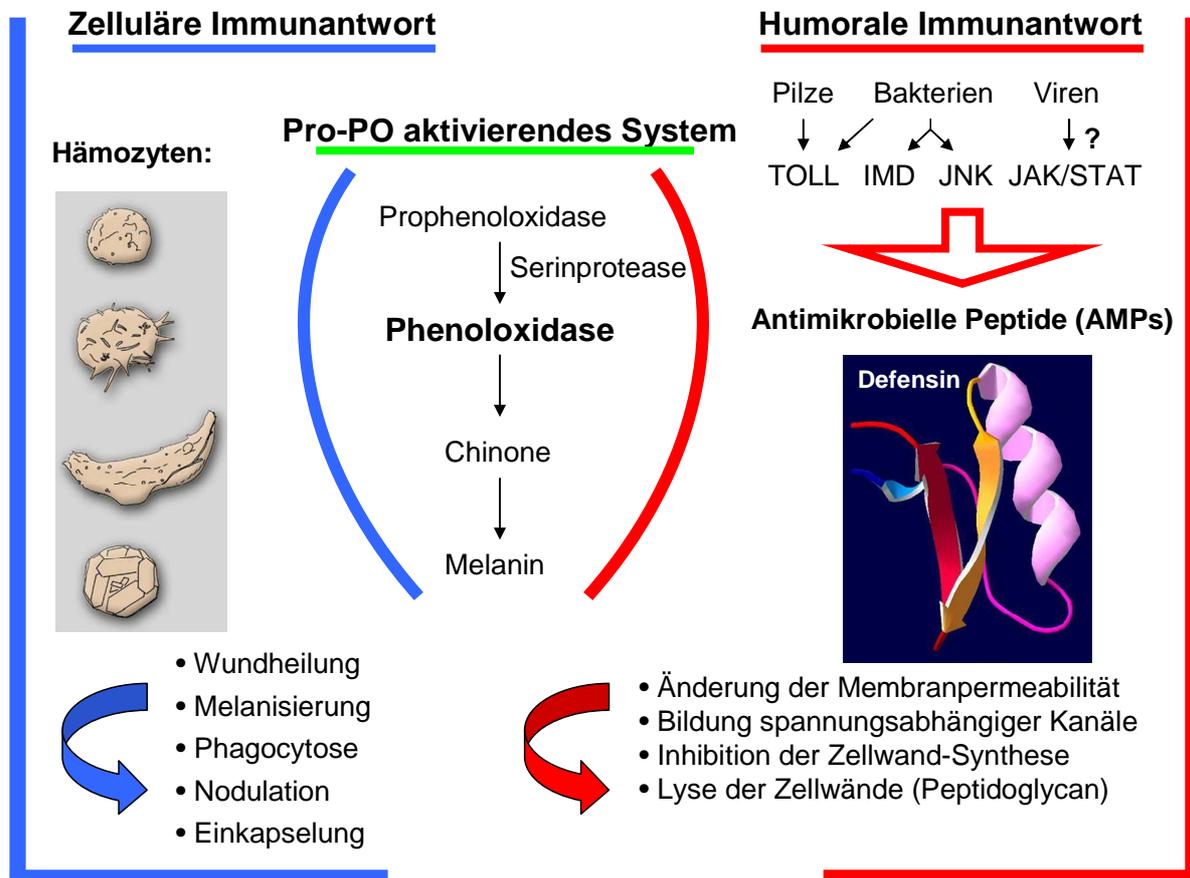


Abb. 4: Die drei Komponenten des angeborenen Immunsystems der Honigbiene.

Immunproteine werden hauptsächlich im Fettkörper gebildet, können aber auch in den Hämozyten, den Epithelzellen der Kutikula, dem Darm, den Speicheldrüsen und dem Fortpflanzungstrakt gebildet werden (Vilmos und Kurucz, 1998). Bekannte AMPs der Honigbiene sind Hymenoptaecin, Defensin1, Abaecin und die Apidaecine. Alle vier Immunproteine der Honigbiene entstehen als inaktive Vorläufer, die durch Prozessierung erst aktiviert werden (Casteels-Josson et al., 1993; Casteels-Josson et al., 1994).

Hymenoptaecin ist ein helikales, ionophores Peptid, das die Membran gram-negativer und gram-positiver Bakterien permeabilisiert und ist somit das einzige Immunpeptid mit lytischer Aktivität. Es ist hitze- und säurestabil, hat eine molekulare Masse von ca. 10.300 Dalton, besteht zu 19 % aus Glycinresten und besitzt im Gegensatz zu allen anderen bienenspezifischen AMPs keinen einzigen Prolinrest (Casteels et al., 1993).

Defensin1 (früherer Name: Royalisin) ist ein basisches, hitzestabiles Peptid mit drei Disulfidbrücken (cysteinreich) und einer molekularen Masse von 5.500 Dalton. Es wirkt schon in geringen Mengen gegen gram-positive Bakterien, darunter auch *Paenibacillus larvae*, allerdings konnte eine wirkliche Lyse noch nicht nachgewiesen werden (Fujiwara et al., 1990; Bíliková et al., 2001). Defensine wurden auch in einer Reihe anderer Insekten und Tiere gefunden (Casteels-Josson et al., 1994). Ausgehend vom polymorphen Gen für Defensin1 wurde ein weiteres Gen gefunden, das für Defensin2 codiert. Das Genprodukt ist zu 55,8 % identisch mit Defensin1 und hat eine molekulare Masse von 4.800 Dalton. Immunregulatorische Elemente weisen darauf hin, dass die Expression von Defensin2 induzierbar sein muss, jedoch wurde es noch nicht in infizierten Bienen nachgewiesen (Klaudiny et al., 2005).

Abaecin ist ein nicht-helikales, kationisches Peptid mit einer molekularen Masse von 3.900 Dalton und 10 Prolinresten. Es wirkt sowohl gegen gram-negative, als auch gegen manche gram-positive Bakterien. Wobei es gegen die meisten gram-negativen Bakterien eine zeitlich verzögerte, geringere Wirkung zeigt als die Apidaecine. Aufgrund seines Aufbaus besitzt Abaecin wahrscheinlich keine lytische Aktivität (Casteels et al., 1990).

Apidaecine waren die ersten bienenspezifischen, hitze- und säurestabilen AMPs, die in großen Mengen entdeckt wurden. Sie wirken gegen eine große Spannbreite pflanzenassoziierter, gram-negativer Bakterien und ebenfalls gegen einige humanpathogene Bakterien, allerdings eher auf bakteriostatische als bakteriolytische Weise. Durch den hohen Gehalt an Prolinresten können sie keine helikale Struktur einnehmen. Mit einer molekularen Masse von 2.100 Da sind sie die kleinsten AMPs, die bis jetzt in Insekten gefunden wurden (Casteels et al., 1989). Ein weiterer wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems in Bienen ist das Prophenoloxidase-aktivierende System. Durch Proteolyse wird die inaktive ProPO in die aktive Phenoloxidase umgewandelt. Bei der folgenden Melanisierung wird der dunkle Farbstoff Melanin zur Aushärtung des Exoskeletts entweder direkt in die Kutikula eingelagert, oder aber Melanin wird direkt an Wunden gebildet um Hämolymphverlust zu vermeiden und um zytotoxische Chinone zur Zerstörung von Pathogenen bereitzustellen (Lourenço et al., 2005).

### **1.5. Antivirale Abwehrmechanismen**

Dass Viruserkrankungen in latenter Form in unauffälligen Bienenkolonien überdauern können ist ein Hinweis darauf, dass Honigbienen eine angeborene Fähigkeit besitzen, eine

Virusvermehrung zu unterdrücken (Chen und Siede, 2007). Ein evolutionär konservierter antiviraler Abwehrmechanismus ist RNA-Interferenz (RNAi). Gelangt doppelsträngige RNA (dsRNA) in eine Zelle, bindet eine spezifische RNase III Endonuklease namens „Dicer“ an eben diese dsRNA und spaltet sie in 20-25 bp lange Fragmente mit Überhängen von 2 Nukleotiden Länge am 3'-Ende, die im nächsten Schritt in einzelsträngige Fragmente umgewandelt werden. Diese kurzen Fragmente werden als „short interfering RNAs“ (siRNAs) bezeichnet. Diese siRNAs werden in einen „RNA-induced silencing complex“ (RISC) eingearbeitet, in dem sie direkt an ein „Argonate“ Protein binden. Der so aktivierte RISC bindet nun an die komplementäre mRNA und schneidet die Ziel-mRNA in der Mitte der komplementären Region (Meister und Tuschl, 2004). Vor allem positiv-orientierte, einzelsträngige RNA-Viren, d.h. fast alle Bienenviren, sollten ein gutes Ziel abgeben, da sie sich über doppelsträngige RNA-Intermediate vermehren. Zudem wurde in Bienen auch schon erfolgreich die Expression von Proteinen mittels RNAi unterdrückt (Beye et al., 2002; Amdam et al., 2003). In *Drosophila* wurde bereits nachgewiesen, dass RNAi wesentlich zur Virusabwehr beiträgt (van Rij et al., 2006). RNAi könnte daher auch der primäre antivirale Abwehrmechanismus in Honigbienen sein.

Es gibt aber Hinweise darauf, dass auch andere Mechanismen als RNAi eine wichtige Rolle in der Virusabwehr bei Honigbienen spielen könnten. Bei *Drosophila* scheint der Toll-Signalweg eine wichtige Rolle in der Abwehr des *Drosophila* X Virus (DXV, *Birnaviridae*) zu spielen (Zambon et al., 2005). Eigentlich führt der Toll-Signalweg vorwiegend nach bakterieller Infektion zur Expression von AMPs, in *Drosophila* zudem auch nach Infektion mit DXV. Die exprimierten AMPs führen jedoch zu keiner erhöhten Resistenz gegen DXV. Ist der Toll-Signalweg allerdings inaktiviert, so führt eine Infektion mit DXV zu einer wesentlich höheren Virusmenge und zu höheren Sterberaten. Unter anderem aufgrund der Tatsache, dass der Toll-Signalweg bei der Reifung von Hämocyten mitwirkt, wird vermutet, dass virusinfizierte Zellen von Hämocyten erkannt und phagozytiert werden. Dostert et al. (2005) fanden mit Jak/STAT einen weiteren Signalweg, der eine Rolle bei der Virusabwehr in *Drosophila* spielt. Nach Infektion mit dem *Drosophila* C Virus (DCV, *Dicistroviridae*) wird über den Jak/STAT-Signalweg die Transkription einiger Gene induziert, die dazu beitragen die Virusmenge in infizierten Fliegen niedrig zu halten, was sich auch in einer besseren Überlebensrate äußert. Im Gegensatz zu einer Infektion mit DXV führt eine Infektion mit DCV zu keiner erhöhten Expression an AMPs. In einer nachfolgenden Arbeit (Hedges et al., 2008) wird gezeigt, dass für die Hochregulierung dreier Reportergene weder doppelsträngige DCV-RNA, noch das DCV-Partikel allein ausreichend sind. Ausschließlich infektiöse Partikel

führen zu einer Hochregulierung der Reportergene und unabhängig davon zu einer erhöhten Sterberate bei infizierten Fliegen. Ein weiterer Signalweg, der eine Rolle bei der Virusabwehr zu spielen scheint ist der Imd-Signalweg. *Drosophila* mit Mutationen im Imd-Signalweg reagierten sensitiver auf eine Infektion mit dem Cricket Paralyse Virus (CrPV, *Dicistroviridae*) als Kontrollfliegen. Allerdings führt auch hier eine Virusinfektion zu keiner Expression von AMPs (Costa et al., 2009).

### **1.6. Aufgabenstellung dieser Dissertation**

Hauptziel dieser Arbeit ist es, vor allem mit Hilfe gelelektrophoretischer Analysen, die unterschiedliche Reaktion der einzelnen Entwicklungsstadien der Honigbiene (Larve, Puppe und adulte Biene) auf Infektion mit dem Akuten Bienen Paralyse Virus (ABPV) zu untersuchen. Genauer betrachtet werden dabei eine mögliche Aktivierung bekannter Bestandteile der angeborenen Immunantwort von Honigbienen, die eventuelle Expression spezifischer, noch unbekannter Proteine in Folge der Infektion und Auswirkung der Virusinfektion auf das äußere Erscheinungsbild. Die unterschiedlichen Reaktionen der einzelnen Entwicklungsstadien werden verglichen mit der Reaktion auf gram-negative *E. coli*-Zellen, die bekanntermaßen sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort effektiv aktivieren, erkennbar an der Expression von AMPs und der Bildung von Noduli. Darüber hinaus soll der zeitliche Verlauf einer ABPV-Vermehrung in Abhängigkeit von der injizierten Partikelzahl untersucht werden, wobei auch hier auf Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien zu achten ist. Mittels einer Doppelinfektion von ABPV und *E. coli* soll die Frage geklärt werden, ob das Virus die angeborene Immunantwort unterdrückt oder aktiviert.

Abgesehen davon wird geprüft, ob ABPV mittels einer künstlichen RNase (Dp12F6) inaktiviert werden kann. Dies trägt zwar nicht zu einem Schutz der Bienen vor diesem Virus bei, hebt aber das leicht zu handhabende Larve-ABPV-Modell als System zum Prüfen möglicher antiviraler Agenzien für die Medizin hervor.

## **2. Material**

### **2.1. Larvenfutter und Material für die *In-vitro*-Aufzucht**

Larven der Bienenrasse *Apis mellifera carnica*

#### **Larvenfutter (pH 4)**

(Peng et al., 1992)

14,4 ml deionisiertes, autoklaviertes H<sub>2</sub>O

4,2 g gefriergetrocknetes Gelée Royale

0,6 g Glucose

0,6 g Fructose

0,2 g Bacto-Yeast-Extract

Σ16 ml → 20 – 30 min rühren lassen

Gelée Royale

Biozentrum GmbH & Co. KG, Butzbach

Mikrolöffelspatel / Umlarvlöffel

Hartenstein, Würzburg

24-Napf-Platten

greiner bio-one, Frickenhausen; Art.-Nr. 662160

Thermolux-Wärmematte

Witte+Sutor GmbH, Murrhardt

### **2.2. Antikörper**

Primärantikörper IRp30

ImmunoGlobe, Himmelstadt; ID6184

Primärantikörper Carboxylesterase1

ImmunoGlobe, Himmelstadt; IG-1110

Sekundärantikörper α-Rabbit IgG

Sigma, München; Art.-Nr. A 6154

Peroxidase

### **2.3. Enzyme und künstliche RNase**

SuperScript™ III First-Strand Synthesis

Invitrogen, Darmstadt; Art.-Nr. 18080-051

AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase

Applied Biosystems, Darmstadt; Art.-Nr.

(5 U/μl)

4311806

Künstliche RNase Dp12F6 (25 μM)

Institute of Chemical Biology and Fundamental  
Medicine, Novosibirsk (Russland)

## **2.4. Längenstandards für Protein- und DNA-Gele**

### Protein-Gele:

Protein Test Mixture 4 (29-97.4 kDa)	Serva, Heidelberg; Art.-Nr. 39208
Protein Test Mixture 5 (6.5-29 kDa)	Serva, Heidelberg; Art.-Nr. 39209
Insulin $\beta$	Sigma, München; Art.-Nr. I6383-5MG
Serva Unstained SDS PAGE Protein (6.5–200 kDa)	Serva, Heidelberg; Art.-Nr. 39215.01
Protein Molecular Weight Marker (14.4–116 kDa)	Fermentas, St. Leon-Rot; Art.-Nr. SM0431

### Western-Blot:

PageRuler Prestained Protein Ladder (10-170 kDa)	Fermentas, St. Leon-Rot; Art.-Nr. SM0671
Prestained SDS-PAGE standards	Bio-Rad, München; Art.-Nr. 161-0318

### DNA-Gele:

GeneRuler 100 bp DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot; Art.-Nr. SM0241
-----------------------------	--

## **2.5. Verwendete Elizitoren**

Lipopolysaccharid ( <i>E. coli</i> 0111:B4), aufgereinigt durch Phenolextraktion	Sigma, München; Art.-Nr. L2630
Lipopolysaccharid ( <i>E. coli</i> 0111:B4), aufgereinigt durch Gelfiltrations- chromatographie (pure)	Sigma, München; Art.-Nr. L3012
Peptidoglycan ( <i>M. luteus</i> )	Sigma, München; Art.-Nr. 53243
Laminarin ( <i>Laminaria digitata</i> )	Sigma, München; Art.-Nr. L9634

## **2.6. Verwendete Bakterienstämme**

<i>Micrococcus flavus</i>	Dr. Ursula Rdest (Lehrstuhl für Mikrobiologie)
<i>Escherichia coli</i> 682, DSM-Nr. 682	Deutsche Sammlungen von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DMSZ)

**2.7. Medien für die Bakterienkultur**

<b>NB-Medium</b>	Bacto Peptone	5 g
	Nutrient Broth	5 g
	<u>Natriumchlorid</u>	<u>10 g</u>
	H <sub>2</sub> O, deionisiert	ad 1000 ml
<b>LB (Luria Bertani)-Medium:</b>	Bacto-Tryptone	10 g
	Bacto-Yeast-Extract	5 g
	<u>Natriumchlorid</u>	<u>10 g</u>
	H <sub>2</sub> O, deionisiert	ad 1000 ml
<b>LB-Agar-Platten:</b>	Bacto-Tryptone	8 g
	Bacto-Yeast-Extract	4 g
	Natriumchlorid	8 g
	<u>Bacto-Agar</u>	<u>8 g</u>
	H <sub>2</sub> O, deionisiert	ad 800 ml
<b>NB-Agar-Platten:</b>	Bacto-Peptone	4 g
	Nutrient Broth	4 g
	Natriumchlorid	8 g
	<u>Bacto-Agar</u>	<u>8 g</u>
	H <sub>2</sub> O, deionisiert	ad 800 ml

Nach Autoklavieren (120 °C, 20 min) und Abkühlen auf ca. 75 °C das Medium in Petrischalen gießen und über Nacht bei Zimmertemperatur abkühlen lassen. Dann Petrischalen mit Schwung umdrehen und im Dunkeln bzw. abgedeckt lagern.

**2.8. Chemikalien**

$\alpha$ -D(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr.6780.1
Agarose	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 2267.2
30 % Acrylamid (Rotiphorese A)	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 3037.1
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 9592.2

Ampuwa-Wasser	Apotheke
Aprotinin	Sigma, München; Art.-Nr. A4529-10MG
Apifonda	Südzucker AG, Mannheim
Apiinvert	Südzucker AG, Mannheim
2 % Bisacrylamid (Rotiphorese B)	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 3039.1
Bacto-Agar	BD GmbH, Heidelberg; Art.-Nr. 214010
Bacto-Tryptone	BD GmbH, Heidelberg; Art.-Nr. 211705
Bacto-Yeast-Extract	BD GmbH, Heidelberg; Art.-Nr.212750
Bacto-Peptide	BD GmbH, Heidelberg; Art.-Nr. 0118-17-0
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 4227.1
Bromphenolblau (BPB)	Riedel-deHaën, Seelze; Art.-Nr. 32712
Chloroform	AppliChem, Darmstadt; Art.-Nr. A0900
DeStreak Rehydration Solution	GE Healthcare, München, Art.-Nr. 17-6003-19
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Riedel-deHaën, Seelze; Art.-Nr. 60153
1,4-Dithiothreit (DTT)	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 6908.3
ECL-Detektionsreagenzien	GE Healthcare Amersham; RPN 2209
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 8040.3
Ethanol absolut	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 9065.1
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. T171.3
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 2218.2
Essigsäure	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 3738.2
D(-)-Fructose	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 4981.1
86 % Glycerin	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 4043.1
Glycin	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 3908.2
Glycogen	Boehringer, Mannheim; Art.-Nr. 901393
Iodacetamid	GE Healthcare Amersham; RPN 6302
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt; Art.-Nr. A1571
IPG-Puffer (pH 3-11, NL)	GE Healthcare, München; Art.-Nr. 17-6004-40
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 6781.1
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 3904.1
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt; Art.-Nr. 1.05033
Kanamycin	Sigma, München; Art.-Nr. K1876
Laminarin	Sigma, München; Art.-Nr. L9634
Lysozym	Roche, Mannheim; Art.-Nr. 1 243 004

Methanol	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 4627.5
Milchpulver (blotting grade)	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. T145.2
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 3957.2
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. P030.1
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt; Art.-Nr. 1.06329
Nutrient Broth	BD GmbH, Heidelberg; Art.-Nr. 234000
Phenylthioharnstoff (PTU)	Sigma, München; Art.-Nr. P 7629-10G
85 % o-Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 6366.1
Roti®-Blue	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. A152.1
32 % Salzsäure	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. P074.1
SERVA Blue G 250	Serva, Heidelberg; Art.-Nr. 35050.02
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 2326.2
N,N,N',N'-Tetramathylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 2367.3
N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycine (Tricine)	Serva, Heidelberg; Art.-Nr. 37195
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 5429.3
TRIZOL® LS	Invitrogen, Darmstadt; Art.-Nr. 10296-010
Tween 20	Applichem, Darmstadt; Art.-Nr. A1389,0500
Urea (Harnstoff)	Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. X999.2

### 2.9. Puffer und Lösungen

<b>Tris-Puffer:</b>	Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
	Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M
<b>2xSammelpuffer (2xSP)</b>	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 ml
	10 % SDS	2,0 ml
	86 % Glycerin	1,0 ml
	14 M $\beta$ -Mercaptoethanol	0,3 ml
	H <sub>2</sub> O, deionisiert	0,7 ml
	<u>10 % BPB</u>	<u>50 <math>\mu</math>l</u>
	$\Sigma$ 5 ml	

<b>PBS (pH 7,5):</b>	Natriumchlorid	4 g
	Kaliumchlorid	0,1 g
	di-Natriumhydrogenphosphat	0,72 g
	<u>Kaliumdihydrogenphosphat</u>	<u>0,12 g</u>
	H <sub>2</sub> O, deionisiert	ad 500 ml

### 2.10. Sonstige Materialien

DryStrip Cover Fluid	Pharmacia, Freiburg
Faltenfilter	Hartenstein, Würzburg
Federschere	Fine Science Tools, North Vancouver, Canada
Federstahlpinzette	Hartenstein, Würzburg
Immobilon P Transfer Membran (PVDF)	Millipore, Schwalbach
Immobiline DryStrip gel, pH 3-11 NL	GE Healthcare, München
Kolbenhubpipetten	Gilson, Langenfeld; Eppendorf, Hamburg
Lackmarker Edding 750	Schreibwarengeschäft
Metallkästchen (5 x 10 x 7,5 cm)	Werkstatt Biozentrum, Universität Würzburg
Mikro-Küvetten	Hartenstein, Würzburg
Mikrokapillaren PMS (1-2-3-4-5 µl)	Hartenstein, Würzburg
Mikrokapillaren PMS 1 (5/10 µl)	Hartenstein, Würzburg
Mikropistille	Hartenstein, Würzburg
Nicot Versand und Zusetzkäfige	Carl Fritz e. K., Mellrichstadt
Paraffin Histosec® für Wachsschalen	Merck, Darmstadt
Parafilm „M“	American National Can, Greenwich, USA
Petrischalen	greiner bio-one, Frickenhausen
PP-Röhrchen 15ml, 50ml	Hartenstein, Würzburg
Präpariernadeln	Fiebig-Lehrmittel, Berlin
Präzisionstücher KW52	Hartenstein, Würzburg
1,5ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme	Ernst Christiansen GmbH, München
Skalpelloklinge Typ 21	Hartenstein, Würzburg
Silikonschlauch	Hartenstein, Würzburg
Uhrmacherpinzetten	Fine Science Tools, North Vancouver, Canada
Whatman 3 MM Filter-Papier	Hartenstein, Würzburg

**2.11 Geräte**

Analysenwaage AX504 DeltaRange®	Mettler Toledo, Gießen
Apparaturen für die Gelelektrophorese	Eigenbau des Institutes für Biochemie, Würzburg
Binokular-Lampe Schott KL 1500 electronic	Schott, St. Gallen, Schweiz
Binokular Leica WILD MZ8	Leica, Solms
Binokular SZX7 mit UC30 Kamera	Olympus, Hamburg
Brutschrank	Bachofer, Reutlingen
Brutschrank HCP 108	Memmert, Schwabach
Color-Control-Dia-Leuchtplatte	Just Normlicht, Weilheim
Eppendorf Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Ettan IPGphor 3	GE Healthcare, München
Feinwaage Sauter K 1200	Volkmar Gatzki, Niederkalbach
Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-4 LSC	Christ, Osterode
Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100	Pharmacia, Freiburg
Gelschüttler IKA KS 250 basic	Hartenstein, Würzburg
Gelwippe Biometra WT16	Biometra, Göttingen
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
Laser based Micropipette puller P-2000	Sutter Instrument Co., Novato, USA
Magnetrührer	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowelle	Bosch
Minishaker MS1 IKA	Janke & Kunkel, Staufen
Motorhandstück MHX/E für Mikropistillen	Xenox, Niersbach
Panasonic Lumix DMC-LZ3	Panasonic, Hamburg
pH-Meter (pH532 WTW)	Hartenstein, Würzburg
Photometer Novaspec II	Amersham, Freiburg
Wasseraufbereitungssystem TKA-GenPure	Thermo Electron LED, Niederelbert
Spannungsgerät PowerPac 300	Bio-Rad, München
Thermoschüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen

Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Ultrospec Plus Spectrophotometer	Pharmacia, Freiburg
Vakuumpumpe ONF 25L (der Gefriertrocknungsanlage)	Pfeiffer Vacuum, Asslar
Wärmeplatte	Electrothermal, Southend, GB
Werktschlampe	Buran GmbH, Hohenwarsleben
Zentrifuge Microspin FV 2400	Hartenstein, Würzburg

### **3. Methoden**

#### **3.1. Die *In-vitro*-Aufzucht von Larven**

Die Larven werden möglichst jung von der Wabe gesammelt und bis zu ihrer Infektion in 24-Napf-Platten in einem 35°C-Brutschrank bei 70 % Luftfeuchte (HCP108, Memmert) herangezogen. Hauptziel dieser Methode ist es, möglichen Kontakt zu Krankheitserregern, die durch Ammenbienen übertragen werden könnten, zu vermeiden. Ein großer Vorteil ist zudem die einfachere Handhabung im Labor.

##### **3.1.1. Larvenfutter und Gefriertrocknung des Gelée Royales**

Das Larvenfutter wird zubereitet wie von Peng et al. (1992) beschrieben (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Zusammensetzung des Larvenfutters.**

<b>Komponenten</b>	<b>Einwaage</b>	<b>Endkonzentration</b>
Gelée Royale	4,2 g	26,25 % (w/v)
Glucose	0,6 g	0,2 M
Fructose	0,6 g	0,2 M
Bacto-Yeast-Extract	0,2 g	1,25 % (w/v)
H <sub>2</sub> O, deionisiert	ad 16 ml	

Es wird autoklaviertes Wasser verwendet, um mögliche Infektionen und daraus resultierende vorzeitige Immunantworten zu vermeiden. Nach Zugabe der einzelnen Bestandteile wird das Larvenfutter 20-30 min zu einer homogenen, blassgelben Lösung gerührt. Es ist im

Kühlschrank ca. 3 d haltbar. Das dabei verwendete Gelée Royale ist ein feines, trockenes Pulver, das man durch Gefriertrocknung (Lyophilisation) und anschließendem Mörsern des hoch viskosen Gelée Royale erhält. Während des Gefriertrocknens geht das in den Proben vorhandene, gefrorene Wasser direkt in die Gasphase über (Sublimation). Das ermöglicht eine schonende Trocknung, bei der die natürlichen Eigenschaften des Ausgangsmaterials nicht verändert werden.

Das Gelée Royale wird für eine optimale Gefriertrocknung in einer Schichtdicke von maximal 1 cm in Petrischalen gefüllt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Über den Modus „Gefrieren+Warm-up VP“ wird vor Befüllen der Gefriertrocknungsanlage die Stellfläche heruntergekühlt und die angeschlossene Vakuumpumpe aufgewärmt. Für Proben, die bei -20 °C gehalten werden, wird der Sollwert der Stellfläche auf -30 °C eingestellt. Das Gerät kühlt nun langsam auf -30 °C herunter und die Vakuumpumpe läuft sich warm, allerdings wird noch kein Vakuum aufgebaut. Nach 3-4 h beträgt die Stellflächentemperatur ca. -20 °C und die Proben können eingefüllt werden. Vor Umschalten in den „Haupttrocknen“-Modus wird geprüft ob der Abtauwasserhahn und der Belüftungshahn geschlossen sind. Im „Haupttrocknen“-Modus wird der Sollwert der Stellfläche auf +20 °C eingestellt, der Sicherheitsdruck auf 0,63 bar und der Arbeitsdruck auf 0,37 bar. Bei einem Wegfall des Vakuums wird bei Erreichen des Sicherheitsdrucks das Ventil automatisch geschlossen und ein Auftauen der Proben verhindert. Ist innerhalb einiger Stunden der Arbeitsdruck von 0,37 bar erreicht wird umgeschaltet auf den „Nachtrocknen“-Modus, mit einem eingestellten, unerreichbaren Wert von 0,001 bar. Der Druck sinkt weiter, da aber 0,001 bar unerreichbar sind, stabilisiert er sich nach ca. 2-3 h, erkennbar an den erreichten +20 °C der Stellfläche und sehr seltenen Geräuschen des Ventils der Vakuumpumpe. Dann wird auf „Stand-by“ geschaltet und mithilfe des Belüftungshahns ganz langsam das Vakuum gelöst. Die trockenen Proben werden entnommen und sofort mit Mörser und Pistill zu feinem Pulver zermahlen. Sie können im Kühlschrank bei 6-8 °C ca. 3 d gelagert werden.

### **3.1.2. Beschreibung der *In-vitro*-Aufzucht von Larven**

Einige Tage (4-5 d) vor dem geplanten Absammeln der Larven wird die Königin für 1-2 d auf einer weitgehend leeren Wabe gekäfigt. Die Maschen des Käfigs können von den Arbeiterinnen ungehindert passiert werden, allerdings nicht von der größeren Königin, die daher nur auf dieser Wabe Eier legen wird. Am Tag des Absammelns wird die markierte Wabe aus dem Stock genommen. Sie enthält eine sehr große Anzahl nahezu gleichaltriger

Larven, welche in den 24 h zuvor geschlüpft sind. Diese werden nun unter einer Werktschlampe mit eingebauter Lupe und mithilfe eines geeigneten Umlarvlöffels aus den Waben in sterile 24-Napf-Platten übertragen. Jeder Napf enthält dabei 300 µl des Larvenfutters. Während des Umlarvens stehen die Napf-Platten auf einer Wärmematte (Witte+Sutor GmbH), die das Futter auf ca. 35 °C erwärmt. Ist die gewünschte Zahl Larven übertragen, kommt die Wabe zurück in den Stock, die Napf-Platten mit den Larven kommen in einen 35°C-Brutschrank bei 70 % Luftfeuchte (HCP108, Memmert).

Je älter und größer die Larven werden, desto weniger Larven kommen zusammen in einen Napf. Tabelle 3 zeigt die Anzahl der Larven pro Napf am jeweiligen Entwicklungstag.

**Tabelle 3: Larvenanzahl pro Napf am jeweiligen Entwicklungstag.**

Larvalentwicklungstag	1	2	3	4	5
Larven pro Napf	10	6	4	2	1

Alle 24 h werden die Larven vorsichtig auf einer Wärmeplatte (Electrothermal) in angewärmte 24-Napf-Platten mit frischem Larvenfutter übertragen und kommen umgehend zurück in den 35°C-Brutschrank mit 70 % Luftfeuchte. Tote Larven oder solche, welche offensichtlich sehr stark in ihrer Entwicklung zurückbleiben, werden aussortiert.

Im Bienenstock beginnt die Rundmade sich nach dem fünften Tag des Larvalstadiums zu strecken und wird nun als Streckmade bezeichnet. Ungefähr zu diesem Zeitpunkt wird die Zelle von Arbeiterinnen verdeckelt. Spätestens zu diesem Zeitpunkt sind auch im Labor sämtliche Versuchsreihen mit Larven beendet gewesen.

### **3.2. Bienenmaterial für Versuchszwecke**

Alles Bienenmaterial stammt von *Apis mellifera carnica* Völkern der Universität Würzburg.

#### **3.2.1. Sammeln von Bienenpuppen und Haltung im Labor**

Direkt am Bienenstock wird eine Wabe ausgesucht, die viele verdeckelte Zellen aufweist. Mit einer Uhrmacherpinzette wird von einigen Zellen vorsichtig der Wachsdeckel entfernt, um zu prüfen ob sich in der Mehrzahl der Zellen Puppen im gewünschten Stadium (z.B. weißäugig oder rotäugig) befinden. Falls nicht, wird solange gesucht bis eine Wabe mit Puppen im gewünschten Stadium gefunden ist. Diese Wabe wird ins Labor mitgenommen, wo vorsichtig von vielen Zellen der Wachsdeckel und anschließend ebenso vorsichtig der obere Teil der

Zellwand entfernt wird, so dass die Zellwandränder nach Möglichkeit ganz glatt sind, damit die Puppen während des vorsichtigen Herausziehens mittels Federstahlpinzette nicht verletzt werden. Es darf nur soviel Druck mit der Federstahlpinzette ausgeübt werden wie unbedingt nötig, da die Puppen sehr verletzlich sind. Die Puppen werden in sterile 24-Napf-Platten überführt, die auf einer Wärmeplatte stehen und kommen anschließend in einen Brutschrank mit 35 °C und 70 % Luftfeuchte. Während der gesamten Versuchsdauer verbleiben sie in denselben Napf-Platten, um nicht verletzt zu werden. Lediglich zur finalen Hämolymphentnahme werden sie mittels Federstahlpinzette vorsichtig in eine Petrischale mit Parafilm übertragen.

### 3.2.2. Sammeln und eventuelle Markierung von Jungbienen

Direkt am Bienenstock wird eine verdeckelte Wabe gesucht auf der gerade die ersten Jungbienen schlüpfen. Dadurch ist davon auszugehen, dass der Großteil der restlichen verdeckelten Brut ebenfalls Jungbienen enthält, die bald zu schlüpfen beginnen. Diese Wabe wird bei 35 °C über Nacht in einen Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag, noch vor Ablauf von 24 h, sind im Normalfall zwischen 500 und 1000 Jungbienen für Versuche auf der Wabe vorhanden. Da diese Bienen noch keine 24 h alt sind, sind ihre Flügel und ihr Exoskelett noch nicht vollständig ausgehärtet, d.h. sie können weder fliegen noch stechen und daher einfach für den weiteren Versuchsablauf in Metallkästchen überführt werden. Die Metallkästchen sind aus rostfreiem Stahl und haben die Maße 5 cm x 10 cm x 7,5 cm. Sie sind mit einem Schiebe-Deckel mit Lochstanzung versehen, um die Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten. Als Futter erhalten die Bienen *ad libitum* eine Apiinvert/Wasser-Mischung im Verhältnis 1:1, was einer ca. 45 % (w/v) Zuckerlösung entspricht.

Benötigt man für einen Versuch eine hohe Anzahl definiert alter Bienen, so erhalten die geschlüpften Jungbienen mit einem lösemittelfreiem Lackstift Edding 750 eine Farbmarkierung auf dem Thorax und werden in den Stock gesetzt aus dem ihre Wabe stammt. Haben sie das gewünschte Alter erreicht, können sie leicht im Stock erkannt, abgesammelt und ins Labor überführt werden. Ihre weitere Haltung erfolgt wie oben beschrieben.

### **3.2.3. Sammeln von Ammen-, Honigraum-, Flugbienen und Pollensammlerinnen**

Ammen- und Honigraumbienen werden von den Waben des geöffneten Bienenstocks abgesammelt. Ammenbienen werden dabei direkt von den Brutwaben abgesammelt. Es werden Bienen ausgewählt, die direkt bei der Larvenpflege beobachtet werden. Honigraumbienen werden beliebig von Waben aus dem Honigraum abgesammelt. Flugbienen und Pollensammlerinnen werden direkt am Stockeingang abgefangen, wenn sie in den Stock zurückkehren. Alle Gruppen werden im Labor in Metallkästchen bei 35 °C und 70 % Luftfeuchte gehalten. Gefüttert werden sie *ad libitum* mit einer Apiinvert/Wasser-Mischung im Verhältnis 1:1.

### **3.2.4. Sammeln von Winterbienen**

Winterbienen werden direkt aus der Wintertraube abgesammelt und ebenfalls im Labor in Metallkästchen gehalten. Allerdings lediglich bei 26 °C. Gefüttert werden auch sie *ad libitum* mit einer Apiinvert/Wasser-Mischung im Verhältnis 1:1.

### **3.2.5. Haltung von Königinnen im Labor**

Die Königinnen wurden von D. Ahrens-Lagast (Imkermeister, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Ihre Haltung erfolgte bei 35 °C und 70 % Luftfeuchte in kleinen „Nicot Versand und Zusetzkäfigen“. Jeder Käfig enthält nur eine Königin und 5-7 Arbeiterinnen, die die Königin füttern. Als Futter dient Apifonda.

## **3.3. Infektion von Larven, Puppen und Bienen**

### **3.3.1. Vorbereiten der Glaskapillaren**

Die verwendeten Glaskapillaren werden vor ihrer Nutzung mithilfe des „Laser based Micropipette puller P-2000“ ausgezogen, damit sie eine feine zur Injektion notwendige Spitze erhalten. Beim Einspannen in das Gerät ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Kapillare nur an den Enden und keinesfalls an der Stelle angefasst wird, wo der Laser später auftrifft. Ebenso ist darauf zu achten, dass eventuelle Markierungen der Kapillare nicht vom Laser getroffen werden, dafür muss die Kapillare eventuell nicht ganz mittig eingesetzt

werden. Das hier verwendete Programm ist in Tabelle 4 gezeigt. Es wurde mit den verwendeten Glaskapillaren ein im Gerät vorgegebener Ramp-Test durchgeführt, in dem die Kapillare bis zum Schmelzen erhitzt und dann auseinander gezogen wird. Währenddessen misst das Gerät die Zeit und alles andere um erste Grundwerte angeben zu können. Diese Grundwerte wurden nach Gebrauchsanweisung geringfügig modifiziert, um sehr feine Spitzen für die Injektion zu erhalten.

**Tabelle 4: Verwendetes Programm zum Glaskapillaren ziehen.**

Heat	Filament	Velocity	Delay	Pull
410	4	70	200	120

### 3.3.2. Vorbereiten der Lösungen zur Injektion

Von einer Stockkultur des für die Infektion gewünschten Bakterienstamms werden am Tag vor der Infektion 0,3 ml in 45 ml frisches, vorgewärmtes Medium gegeben. *M. flavus* wird in LB-Medium kultiviert, *E. coli* 682 in NB-Medium. Die frisch angesetzten Kulturen kommen bei 37 °C über Nacht auf den Thermoschüttelinkubator. Am nächsten Morgen werden von diesen Kulturen 3 ml in 45 ml frisches, vorgewärmtes Medium gegeben und wieder bei 37 °C unter schütteln inkubiert. Nach ca. 2-3 h erreicht die Absorption bei 550 nm den gewünschten Wert von 0,5. Hier befinden sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase und die Zellzahl liegt ungefähr bei  $10^8$ /ml. Es wird 1 ml der jeweiligen Kultur 5 min bei 5200 UpM zentrifugiert (Eppendorf 5417R). Anschließend werden sofort die Überstände abgossen und das Sediment in 1 ml handwarmem PBS suspendiert. Dieser Waschschrift wird noch zweimal wiederholt. Für eine Zellzahl von  $10^8$ /ml oder niedriger wird das Sediment nach dem dritten Waschschrift in 1 ml PBS suspendiert und dann gegebenenfalls verdünnt. Die Bakterienlösungen sind nun bereit für Infektionszwecke.

Von den verwendeten Eliztioren, wie den beiden Lipopolysacchariden, dem Peptidoglycan und dem Laminarin, wird je eine Stammlösung (1,0 mg/ml) mithilfe von Ampuwa-Wasser hergestellt. Davon ausgehend werden mithilfe von PBS Arbeitslösungen in verschiedenen Konzentrationen erstellt. Diese werden bei -20 °C gelagert.

Die Ausgangssuspension des Akuten Bienen Paralyse Virus ( $5 A_{260}/\text{ml} = 1 \text{ mg/ml}$ ;  $A_{260}/A_{280} = 1,7$ ) wird bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  stabil gelagert. Sie wird erst kurz vor Injektion durch schrittweises Verdünnen mit PBS auf die gewünschte Konzentration gebracht.

### 3.3.3. Injektion von Lösungen in Larven, Puppen und Bienen

Die Larven haben bei ihrer Infektion ein Gewicht von ca. 40 mg und demzufolge ein Alter von ca. 4 d (Randolt et al., 2008). Die Injektion findet auf einer Wärmematte unter einem Binokular statt. Die Larven werden vorher in frische Futterlösung überführt, dann wird die jeweils zu infizierende Larve in eine Petrischale mit Parafilm gelegt. Der Parafilm wird nach Wechseln der Injektionslösung gegen frischen Parafilm ausgetauscht. Für die Injektion werden ausgezogene 5  $\mu\text{l}$ -Glaskapillaren verwendet. Die Skala zeigt 1  $\mu\text{l}$ -Schritte. Über das stumpfe Ende der Glaskapillare wird ein Ende eines passenden 50 cm langen Silikonschlauchs gestülpt, das andere Ende des Silikonschlauchs wird mit einer 200  $\mu\text{l}$  Pipettenspitze versehen, welche als Mundstück fungiert. Die ausgezogene Glaskapillare wird so angebrochen, dass eine lange, scharfe Spitze mit einer feinen Öffnung entsteht. Wird die Spitze zu lang belassen ist sie zu fein, um die Injektionslösung aufnehmen zu können, wird sie zu stumpf abgebrochen werden die Larven zu sehr verletzt. Die Spitze wird nun in die zu injizierende Lösung getaucht und es wird vorsichtig 1  $\mu\text{l}$  angesaugt. Vor der Injektion wird die Spitze der Kapillare in Phenylthioharnstoff (PTU) (10  $\mu\text{g/ml}$ ) getaucht, um die Prozessierung der Pro-Phenoloxidase zur aktiven Phenoloxidase als Antwort auf das Anstecken zu verhindern. Die Injektion erfolgt dorsal-lateral in der Körpermitte. Ein kleiner Rest bleibt in der Kapillare, um keine Luft zu injizieren. Die Larve wird nun wieder in ihren Napf zurückgesetzt. Die Napf-Platte bleibt während der Injektionen auf der Wärmematte. Sind alle auf ihr befindlichen Larven infiziert, kommen sie zurück in den Brutschrank.

Puppen werden ebenfalls auf einer Wärmematte injiziert, allerdings verbleiben sie für die Injektion in ihrem Napf. Der Einstich erfolgt seitlich am Thorax, wobei darauf zu achten ist, dass die Kapillare leicht in den Körper eindringt und sich die Körperhülle unter dem äußeren Druck nicht verformt.

Die Bienen werden auf Eis heruntergekühlt bis sie sich nicht mehr bewegen. Dann wird eine Biene mit Daumen, Zeige- und Mittelfinger der einen Hand so am Thorax genommen, dass das Abdomen frei in der Luft von der Hand weg weist. Königinnen werden aus Sicherheitsgründen zwar genauso gehalten, aber leicht auf eine feste Unterlage gedrückt. Mit

der anderen Hand wird vorsichtig, in einem flachen Winkel, um keine inneren Organe zu verletzen, zwischen dem dritten und vierten Tergit dorsal-lateral injiziert.

### **3.4. Herstellung von Kopfextrakten**

Nach Hämolymphentnahme wird der Kopf abgeschnitten und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Gefäß kommt sofort in flüssigen Stickstoff. Wird es dem Stickstoff entnommen, so werden 25 µl PBS dazugegeben und der Kopf mit einem Motorhandstück mit aufgestecktem Mikropistill gemörsert. Anschließend wird 5 min bei 5200 UpM in der Eppendorf 5417R zentrifugiert und der Überstand in neues Gefäß überführt. Zum Schluss wird das Kopfextrakt mit 25 µl 2xSP versetzt und bei -20 °C gelagert.

### **3.5. Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese**

#### **3.5.1. Entnahme von Hämolymphe aus Bienenlarven und Bienen**

Die einzelnen Larven werden kurz vor der Hämolymphentnahme sanft in einer Petrischale mit Wasser gewaschen und anschließend auf einem Papiertuch gerollt, um sie von Futtersaft zu reinigen. Dann wird die einzelne Larve auf eine mit Parafilm ausgelegte Petrischale gelegt, die sich auf einer Wärmeplatte befindet. Für die Entnahme werden ausgezogene 10 µl-Glaskapillaren verwendet. Die Spitze wird so abgebrochen, dass eine kurze Spitze mit einer etwas größeren Öffnung entsteht. Unter dem Binokular wird die Larve dorsal angestochen, die Spitze wieder herausgezogen und die austretende Hämolymphe mit der Glaskapillare aufgenommen. Die Hämolymphe wird in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Je nach Alter der Larve gewinnt man 20-50 µl Hämolymphe. Direkt nach vollständiger Entnahme wird der Hämolympheprobe eine PTU-Aprotinin-Mischung (je 100 µg/ml) zugegeben. Auf 9 µl Hämolymphe kommt 1 µl der Mischung. Die Konzentration von PTU und Aprotinin in der Probe beträgt somit 10 µg/ml. Die erhaltenen Proben werden im Eisbad gesammelt, am Ende kurz zentrifugiert und dann bei -20 °C gelagert.

Aus Bienen gewinnt man Hämolymphe, indem man sie auf Eis bis zur Bewegungslosigkeit kühlt, sie dann mit zwei an ihrer Taille überkreuzten Nadeln auf einer Wachsschale fixiert und zwischen drittem und viertem Tergit zentral dorsal mit einer Glaskapillare mit abgebrochener Spitze in die Leibeshöhle sticht. Dabei muss auf einen flachen Einstichwinkel geachtet

werden, um die inneren Organe, vor allem den Darm, nicht zu verletzen, da sonst die Probe verunreinigt wird. Nach dem Einstich wird die Glaskapillare leicht zurückgezogen und die Hämolymphe aufgenommen. Pro Biene gewinnt man im Normalfall 5-10  $\mu\text{l}$  Hämolymphe. Die Proben werden ebenfalls mit 1  $\mu\text{l}$  der PTU-Aprotinin-Mischung (je 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf 9  $\mu\text{l}$  Hämolymphe versehen, kurz zentrifugiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.5.2. Entnahme und Verarbeitung der Hämolymphe aus Puppen**

Da sich Puppen mitten in der Metamorphose befinden besteht der Körper vor allem zu Beginn des Puppenstadiums (weißäugig und rotäugiges Stadium) aus einer äußeren Körperhülle, die gefüllt ist mit einer einheitlich trüben, dickflüssigen Substanz in der sich alles in Lösung befindet. Lediglich den Darm kann man als solchen erkennen. Die Puppen werden am Abdomen angestochen und mit einer nicht-ausgezogenen Glaskapillare wird möglichst viel der trüben Substanz entnommen. Pro Puppe sind dies im Normalfall 30-50  $\mu\text{l}$ . Zu den Hämolympfproben wird die gleiche Menge PBS gegeben und für 5 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5200 UpM zentrifugiert (Eppendorf 5417R). Es bilden sich drei Phasen: unten das Sediment, in der Mitte die wässrige PBS/Hämolymphe-Lösung und oben eine lipidhaltige, weiße Schicht. Die wässrige Lösung wird abgenommen und in ein frisches 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt, in das je 4  $\mu\text{l}$  der PTU/Aprotinin-Mischung vorgelegt sind. Die Proben werden kurz durchmischt und es folgt ein zweiter Zentrifugationsschritt für 5 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 10.000 UpM. Wieder bilden sich drei Phasen, wenn auch schwächer ausgeprägt, von denen wieder die wässrige Phase abgenommen und in ein frisches 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt wird. Dies sind die fertigen Hämolympfproben, die direkt auf ein Gel aufgetragen werden können. Trotz ihrer Verdünnung mit PBS sind sie in der Konzentration mit larvaler Hämolymphe vergleichbar.

### **3.5.3. Gewinnung von Hämozyten aus Hämolympfproben**

Um eine ausreichende Menge an Hämozyten pro Probe zu erhalten, wird die Hämolymphe von 5 Bienen vereinigt. Die Proben werden anschließend 15 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 12.000 UpM zentrifugiert (Eppendorf 5417R). Der Überstand wird in ein frisches 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Sediment wird mit 10  $\mu\text{l}$  2xSP versehen und ebenfalls bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.6. Auftrennung von Proteinen durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteingemische anhand der Molekulargewichte der einzelnen Proteine aufgetrennt. Durch Erhitzen in Anwesenheit von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden in den mit Sammelpuffer versetzten Proben die Disulfidbrücken reduziert. Zudem werden die denaturierten Proteine durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) negativ geladen (1,4 g SDS bindet pro g Protein), so dass sie im elektrischen Feld in Richtung Anode wandern. Die Laufgeschwindigkeit in der Gelmatrix wird durch die Größe der Proteine bestimmt, die Laufstrecke der Proteine ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Die Gelmatrix wird durch die Polymerisation der monomeren Bausteine Acrylamid und Bisacrylamid hergestellt. TEMED startet diese Radikalkettenreaktion, indem es zur Bildung von Sulfatradikalen aus dem Ammoniumperoxodisulfat (APS) führt. Auch während der Kettenreaktion wirkt es sich fördernd auf den Vernetzungsgrad aus. Die Porengröße der Gelmatrix kann durch die Acrylamidkonzentration variiert werden, wobei eine hohe Acrylamidkonzentration zu kleinen Poren im Gel führt. Und je kleiner die Poren, desto langsamer wandern die Proteine. 7,5 % Trenngele führen z.B. zu einer guten Auftrennung im stark hochmolekularen Bereich von über 100 kDa, während 10 % Trenngele gut bis zu einer Proteingröße von 40 kDa auftrennen und 15 % Trenngele gut bis ca. 10 kDa. Die Auftrennung von Proteinen lässt sich zudem noch über die Wahl des Elektrophoresepuffers verbessern. Im Aufbau geht dem engporigen Trenngel ein weitporiges Sammeltgel voraus, in dem sich die Proteine schon nach ihrer elektrophoretischen Mobilität ordnen. Würde man die Proteinproben gleich auf ein engporiges Trenngel auftragen, würde dies zu einer teilweisen Aggregation einiger Proteine führen.

Standardgemäß werden Polyacrylamidgele von 1 mm Dicke verwendet, mit Größen des Trenngels von 8,5 x 16 cm bzw. 14 x 20 cm (Tabelle 5). Das darauf gegossene Sammeltgel ist ca. 1,5 cm hoch und enthält die Taschen für das Auftragen der Proben (Tabelle 6).

Vor Zugabe von SDS, APS und TEMED wird die Gellösung 5 min unter vorsichtigem Schwenken im Wasserstrahlvakuum evakuiert. Dadurch werden Sauerstoff, das als stabiles Diradikal die Polymerisation behindern würde, und Kohlendioxid, das wie Sauerstoff während der Polymerisation kleine Luftbläschen zwischen den Glasplatten bilden kann, entfernt.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Trenngel-Lösungen (Gesamtvolumen 30 ml).**

Komponenten	10 % Trenngel	12,5 % Trenngel	15 % Trenngel	17,5 % Trenngel
30 % Acrylamid	10,0 ml	12,5 ml	15,0 ml	17,5 ml
2 % Bisacrylamid	4,0 ml	5,0 ml	6,0 ml	7,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
H <sub>2</sub> O, deionisiert	8 ml	4,5 ml	1,0 ml	-
10 % SDS	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
10 % APS	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Sammelgel-Lösung (Gesamtvolumen 15 ml).**

Komponenten	5 % Sammelgel
30 % Acrylamid	2,5 ml
2 % Bisacrylamid	1,0 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	3,7 ml
H <sub>2</sub> O, deionisiert	7,5 ml
10 % SDS	150 µl
10 % APS	200 µl
TEMED	10 µl

Zunächst wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch eingefettete 1 mm starke Silikon-Abstandhalter separiert und abgedichtet sind. Sofort nach dem Gießen muss das noch flüssige Gel mit deionisiertem H<sub>2</sub>O überschichtet werden. Nach 15 min ist das Trenngel polymerisiert und das überschichtete Wasser wird abgegossen. Die evakuierte und mit SDS, APS und TEMED versetzte Sammelgel-Lösung wird auf das Trenngel gegossen und ein Taschenformer eingesetzt. Es ist darauf zu achten, dass sich keine kleinen Luftbläschen zwischen Taschenformer und Sammelgel befinden. Nach weiteren 10 min ist das Sammelgel polymerisiert und der Taschenformer wird vorsichtig entfernt. Die Taschen werden sofort mit Laemmli-Elektrophoresepuffer (3.6.1.) bzw. mit Kathodenpuffer (3.6.2.) gespült, um die Bildung von feinen Gelhäutchen in den Taschen zu vermeiden, welche ein gleichmäßiges Einlaufen der Proben behindern würden. Nachdem der untere Abstandhalter entfernt und die Glasplatten gesäubert wurden, werden die beiden Glasplatten mit dem Gel und den seitlichen Abstandhaltern in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. In die obere Kammer der Apparatur wird solange der gewünschte Elektrophoresepuffer eingefüllt bis der Puffer ca.

1,5 cm über dem Gel steht. Sollte Puffer zwischen Gel und Abstandhalter nach unten durchlaufen, so wird letzterer leicht in Richtung Gel gezogen, um besser abzudichten. Läuft kein Puffer durch, kann die untere Kammer mit dem gewünschten Elektrophoresepuffer gefüllt werden bis das Gel 1,5-2 cm eintaucht. Unter dem Gel befindliche Luftblasen werden mithilfe einer Spritze mit gebogener Kanüle entfernt. Die Proteinproben werden mit 2xSP versetzt, gut durchmischt, 5 min bei 95 °C hitzedenaturiert, erneut gut durchmischt und kurz zentrifugiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden die Proben vorsichtig in die jeweiligen Taschen eingefüllt. Die äußeren Taschen sollten keine wichtigen Proben enthalten. Die Elektrophorese wird bei 60 V gestartet. Sobald die über BPB sichtbare Pufferfront das Trenngel erreicht hat, wird der elektrophoretische Lauf bei 120 V (Laemmli-Puffersystem) bzw. 25 mA (Tricine-Puffersystem) fortgesetzt. Sobald das BPB unten aus dem Trenngel ausläuft, wird die Elektrophorese beendet.

### 3.6.1. Laemmli-Puffersystem (Laemmli, 1970)

Das für die diskontinuierliche SDS-PAGE standardmäßig verwendete Laemmli-Puffersystem Tris-Chlorid/Tris-Glycin (Tabelle 7) benutzt denselben Elektrophoresepuffer für die obere und untere Kammer der Elektrophoreseapparatur. Die im Puffer enthaltenen Chlorid-Ionen sind sehr mobil und bilden die Leit-Ionen. Die Glycin-Ionen hingegen bilden im Sammelgel die Folge-Ionen, da Glycin im Sammelgel mit seinem niedrigeren pH eine niedrige negative Ladung hat und folglich eine geringe elektrophoretische Mobilität. Das aufgetragene Proteingemisch ordnet sich nach der Mobilität der einzelnen Proteine in dem resultierenden lokalen Feldstärkegradienten zwischen Leit- und Folge-Ionen. Beim Übergang in das Trenngel werden die geordneten Proteine fokussiert. Erreichen die Glycin-Ionen das Trenngel, erhöht sich ihre negative Ladung und sie bilden zusammen mit den Chlorid-Ionen die Leit-Ionen-Front. Proteine im Bereich von etwa 14 bis 200 kDa können mit diesem Puffersystem gut separiert werden.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des Laemmli-Elektrophoresepuffers.**

Komponenten	Laemmli-Elektrophoresepuffer
Glycin	15 g
Tris	5 g
10 % SDS	15 ml
H <sub>2</sub> O, deionisiert	ad 1000 ml

### 3.6.2. Tricine-Puffersystem (Schägger und Jagow, 1987)

Das Tricine-Puffersystem sieht die Verwendung von zwei verschiedenen Elektrophoresepuffern vor, dem Kathoden- und dem Anoden-Puffer (Tabelle 8). Anstelle der Glycin-Ionen des Laemmli-Puffersystems ermöglichen hier Tricine-Ionen als Folge-Ionen mit höherer Wanderungsgeschwindigkeit eine bessere Auflösung für niedermolekulare Proteine im Bereich von etwa 1 bis 12 kDa.

**Tabelle 8: Zusammensetzung der Tricine-Puffer.**

Komponenten	Kathodenpuffer	Anodenpuffer
Tris	12,1 g	24,2 g
Tricine	17,9 g	-
10 % SDS	10 ml	-
H <sub>2</sub> O, deionisiert	ad 1000 ml	ad 1000 ml
pH	pH 8,3 (ohne Einstellung)	mit HCl einzustellen auf pH 8,9

### 3.7. Zwei-dimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2DE)

Bei einer zwei-dimensionalen Gelelektrophorese (2DE) werden die Proteine in zwei Dimensionen aufgetrennt. In der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt mithilfe einer Isoelektrischen Fokussierung (IEF), in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht mithilfe einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Klose, 1975; O'Farrell, 1975). Der dabei von Corbett et al. (1994) eingeführte immobilisierte pH-Gradient verbessert die Reproduzierbarkeit.

#### 3.7.1. Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die IEF macht sich die Eigenladung der Proteine zunutze. Die Eigenladung eines Proteins setzt sich zusammen aus der Summe der Ladungen seiner Aminosäuren und seiner Amino- und Carboxylenden und kann je nach pH der Umgebung positiv, negativ oder gleich Null sein. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins beschreibt den pH, an dem die Eigenladung des Proteins Null ist. In einem pH-Gradienten unter Anlegung eines elektrischen Feldes wird ein Protein solange wandern bis es die Position erreicht hat an der seine Eigenladung Null ist. So kommt es zu einer Fokussierung der Proteine an ihrem jeweiligen pI.

Vor jeder 2DE muss man sich im Klaren darüber sein wie groß der Bereich sein soll, der isoelektrisch fokussiert werden soll, d.h. welche Länge muss das DryStrip Gel bzw. der IPG-Strip mit dem immobilisierten pH-Gradienten (IPG) haben und in welchem pH-Bereich soll aufgetrennt werden. Denn je nachdem müssen unterschiedliche Mengen ( $\mu\text{g}$ ) an Protein eingesetzt werden. Zur Feststellung der Proteinkonzentration der Proben wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Für die hier gezeigten Gele wurden 18 cm DryStrip Gele bzw. IPG-Strips mit einem nicht-linearen pH-Gradienten von 3-11 verwendet. Die eingesetzte Menge an Protein sollte daher ca. 120  $\mu\text{g}$  betragen, was ca. 5-6  $\mu\text{l}$  larvaler Hämolymphe entspricht. Sollte im niedermolekularen Bereich etwas von Interesse sein, kann die Proteinmenge auch bis auf 180  $\mu\text{g}$  gesteigert werden, allerdings ist der obere Bereich dann überladen. Die Probe wird mit IPG-Puffer und DeStreak Rehydration Solution versetzt (Tabelle 9), anschließend wird 3-5 min bei 95 °C denaturiert und die Probenlösung in den Strip-Halter über die gesamte Länge pipettiert.

**Tabelle 9: Reaktionsansatz für IEF.**

Komponenten	Reaktionsansatz
Hämolymphe	x $\mu\text{l}$
IPG-Puffer (pH 3-11, NL)	1,7 $\mu\text{l}$
DeStreak Rehydration Solution	ad 340 $\mu\text{l}$ (bei 18 cm DryStrip Gelen)

Der IPG-Strip wird vorsichtig mit einer Pinzette aus seiner Verpackung genommen und der Plastikstreifen vorsichtig abgezogen, anschließend wird der IPG-Strip mit der Gelseite nach unten in den Strip-Halter auf die Probe gelegt. Beide Male wird am sauren (+) Ende des Strips begonnen, da dieses fester ist als das basische Ende. Beim Einlegen wird auf die korrekte Positionierung des sauren Endes (+) Richtung Anode geachtet. Mit 2 x 950  $\mu\text{l}$  DryStrip Cover Fluid (Mineralöl) wird von links nach rechts pipettierend beschichtet, dann der Deckel aufgelegt und der Strip-Halter vorsichtig in die Apparatur eingesetzt (ETTAN IPGphor 3). Zur aktiven Rehydrierung des IPG-Strips erfolgt der erste Schritt über mindestens 10 h bei niedriger Voltzahl vor der eigentlichen IEF, die dann direkt anschließt (Tabelle 10, Handbook 2D-Electrophoresis).

**Tabelle 10: Laufprogramm für IPG-Strip mit 18 cm Länge.**

	<b>Voltzahl</b>	<b>Dauer</b>
1. Schritt	30 V	12 h
2. Schritt	500 V	1 h
3. Schritt (Gradient)	1000 V	1 h
4. Schritt (Gradient)	8000 V	3 h
5. Schritt	8000 V	1,5 h
		$\Sigma$ 18,5 h

Entweder wird direkt an die IEF die gelelektrophoretische Auftrennung angeschlossen oder aber die IPG-Strips müssen bei -60 °C oder niedriger sofort eingefroren werden.

### 3.7.2. Zweite Dimension – Gelelektrophoretische Auftrennung

Wird mit der gelelektrophoretischen Auftrennung fortgefahren, muss das Gel schon fertig zum Beladen sein sobald die IEF beendet ist. Es ist zu beachten, dass ein sehr großes Gel ca. 45 min braucht bis es auspolymerisiert ist.

Kurz bevor das Programm beendet ist, sollten zudem einige 1,5ml-Reaktionsgefäße mit vorgefertigter Laemmli-Agaroselösung (Tabelle 11) aus dem Kühlschrank bei 95 °C im Thermomixer bereitgestellt werden.

**Tabelle 11: Agaroselösung für 2DE.**

<b>Komponenten</b>	<b>Reaktionsansatz</b>
Laemmli-Elektrophoresepuffer	100 ml
Agarose	0,5 g
1 % BPB	200 $\mu$ l

Sobald das Programm beendet ist, wird der Strip-Halter herausgenommen, auf ein Papiertuch gestellt und der Deckel vorsichtig abgenommen. Der IPG-Strip wird am gellosen Rand mit einer Pinzette angefasst, herausgenommen und in einem Messzylinder mit Laemmli-Puffer kurz gewaschen, dabei gut festgehalten. Beim Herausziehen wird am Rand des Messzylinders mit der Plastikseite der Puffer abgestreift. Anschließend wird der IPG-Strip sofort mit der Gelseite nach oben in den Equilibrierungspuffer überführt.

Der IPG-Strip muss vor der gelelektrophoretischen Analyse mit SDS equilibriert werden. Der dafür benötigte SDS-Equilibrierungspuffer (6 M Urea, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 29 % Glycerol, 2 % SDS und 0,002 % BPB) kann gut vorbereitet und in den benötigten 15 ml-Aliquots bei -20 °C gelagert werden. Zuerst inkubiert der Streifen 15 min in Equilibrierungspuffer (EB) + 1 % DTT, wo er mit SDS gesättigt wird, anschließend 15 min in EB + 2,5 % Iodacetamid, wo die freien -SH-Gruppen alkyliert werden, sodass sie nicht mehr reoxidieren können (Rehm und Letzel, 2010). In der Zwischenzeit kann der Laemmlipuffer angesetzt werden. Nach der Inkubation in EB + Iodacetamid kommt der IPG-Strip sofort aufs Gel. Dafür wird die Wasserschicht abgeschüttet, das Gel schräg gelegt und der IPG-Strip mit der Plastikseite nach unten auf die Glasplatte gelegt. Links und rechts wird überschüssiges Material des IPG-Strips mit dem Skalpell entfernt. Anschließend wird das Gel senkrecht gestellt, wobei der Streifen haften bleibt, und eine Spur heiße Agarose zügig auf das Gel pipettiert. Mit einem Spatel wird der IPG-Strip vorsichtig so in die Agarose geschoben, dass keine Luftblasen zwischen Gel, Glasplatte und IPG-Strip sind. Eventuell vorhandene Luftblasen können oftmals durch leichtes Klopfen entfernt werden. Links und rechts kann mit einem Spatel in die Agaroseschicht gestochen und ein ca. 0,7 cm breites Agarosestück ausgehebelt werden. An diesen Stellen können noch ca. 0,7 cm lange Gelstreifen angebracht werden, die zeitlich parallel zur 18-stündigen IEF entweder mit 7 µl Protein-Marker oder der Hämolympheprobe unter einigen Tropfen DryStrip Cover Fluid (Mineralöl) bei Raumtemperatur inkubierten. Diese kurzen Gelstreifen wurden anschließend in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und inkubierten zeitlich parallel zum IPG-Strip ebenfalls in den beiden Equilibrierungspuffern. Abschließend wird alles dick mit Agarose beschichtet und in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut. Die Apparatur wird dabei stark eingefettet, sodass es oben herausquillt wenn die Glasplatte angelegt wird. Diese Vaseline wird anschließend mit dem Spatel verstrichen, um es richtig abzudichten. Dann wird der Laemmlipuffer eingefüllt, die Luftblasen entfernt und das Gel die erste Stunde bei 60 V einlaufen gelassen. Anschließend wird hochgeschaltet auf 180 V (ca. 50 mA). Im weiteren Gellauf sinkt die Stromstärke, daher muss sie spätestens bei 35 mA konstant gehalten werden.

### **3.8. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford beruht auf der elektrostatischen Bindung des Coomassie Blau G250 an freie NH<sub>2</sub>-Gruppen von Proteinen, hauptsächlich an Arginyl- und Lysylreste. Das führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465

nm nach 595 nm, was an einem Farbumschlag von rötlich-violett nach blau zu sehen ist. Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei 1 µg Protein.

Zunächst wird für eine Verdünnungsreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen die Absorption bei 595 nm ( $A_{595}$ ) gemessen und durch Auftragen der erhaltenen Werte gegen die Proteinkonzentration auf Millimeterpapier eine Eichgerade erstellt (Tabelle 12). Es werden acht Lösungen aus je einem ml Bradfordlösung (Tabelle 13) und BSA-Gehalten von 1 µg bis 20 µg pro Ansatz gemessen. Eine Lösung ohne BSA dient als Referenz. Jeder Ansatz wird nach Zugabe der Bradfordlösung gut durchmischt und inkubiert 5 min bei Raumtemperatur.

**Tabelle 12: Ermittlung der Eichgeraden.**

µl BSA (µg/µl)	ddH <sub>2</sub> O (µl)	Bradfordlösung (ml)	$A_{595}$
1	19	1	0,053
2	18	1	0,110
3	17	1	0,131
5	15	1	0,229
7	13	1	0,325
10	10	1	0,438
15	5	1	0,626
20	-	1	0,733
-	20	1	-

Von den Lösungen, deren Proteinkonzentrationen mittels Bradford bestimmt werden sollen, werden 1:10-Verdünnungen hergestellt und daraus jeweils 2 µl mit 18 µl ddH<sub>2</sub>O und 1 ml Bradfordlösung versetzt. Anhand des gemessenen Absorptionswerts bei 595 nm kann man über die Eichgerade auf den Proteingehalt schließen.

**Tabelle 13: Zusammensetzung der Bradfordlösung.**

Komponenten	Bradfordlösung
Coomassie-Blau G250	10 mg
96 % Ethanol absolut	5 ml
85 % Phosphorsäure	10 ml
H <sub>2</sub> O, deionisiert	ad 100 ml
	→ durch 2 Lagen Filterpapier filtrieren

### **3.9. Färben der Polyacrylamidgele mittels Coomassie Blau G250**

Nach der Elektrophorese wird das Gel zunächst für 30 min in Fixierlösung und anschließend über Nacht in Färbelösung geschüttelt (IKA KS 250 basic, Hartenstein). Aufgrund der hohen Sensitivität von Roti®-Blue mit einer Nachweisgrenze von ca. 30 ng eignet sich diese Färbemethode ausgezeichnet zum Nachweis niedermolekularer Immunproteine. Der Farbstoff bindet mit hoher Spezifität an Proteine und nur minimal an die Gelmatrix, wodurch für eine vollständige Hintergrundentfärbung oft ein einmaliger Wechsel der Waschlösung genügt (Tabelle 14). Zudem eignet sich diese Färbemethode für ein anschließendes Sequenzieren interessanter Banden.

**Tabelle 14: Zusammensetzung der Fixier-, Roti®-Blue-Färbe- und Waschlösung.**

	<b>Komponenten</b>
<b>Fixierlösung</b>	85% ortho-Phosphorsäure, 0,85 % (v/v)
	Methanol, 20 % (v/v)
<b>Roti®-Blue-Färbelösung</b>	Methanol, 20 % (v/v)
	Roti®-Blue, 20 % (v/v) (allmählich zugeben, 2-3 h Rühren)
<b>Waschlösung</b>	Methanol, 25 % (v/v)

### **3.10. Massenspektrometrische (MS) Analyse von Proteinen**

Interessante Proteinbanden werden vorsichtig mit einem Skalpell aus dem jeweiligen Polyacrylamidgel ausgeschnitten, in je ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zur MS-Analyse bei -20 °C gelagert.

Die nano-HPLC/MS einiger Proben und anschließende NCBI-Datenbanksuche wurde von Dr. Jörg Reinders (ehemaliger Mitarbeiter des Lehrstuhls der Pharmazeutischen Biologie, Universität Würzburg) durchgeführt. Alle anderen Proben wurden von der Proteome Factory AG, Berlin, mittels nano-LC-ESI-MS/MS und anschließender NCBI-Datenbanksuche analysiert.

Die Proteine werden entweder ganz zu Beginn der Analyse aus dem Gel eluiert, falls die Proteine komplett in Peptide zerlegt werden, können sie auch erst nach dem Proteaseverdau eluiert werden, um Zeit zu sparen. Verwendet man frischgegossene Polyacrylamidgele sollten die Disulfidbrücken der Proteine vor weiterer Analyse reduziert und die freien –SH-Gruppen alkyliert werden, um ein lineares Vorliegen des Proteins zu garantieren. Spätestens im nächsten Schritt, vor der echten massenspektrometrischen Analyse, werden die Proteine dann in Peptide zerlegt. Dies geschieht in den meisten Fällen mit selektiven Proteasen, wie z.B. Trypsin, Chymotrypsin oder V8 Protease. Trypsin spaltet an der carboxyterminalen Seite von Lysin- und Argininresten, allerdings nicht zwischen Arg-Pro und Lys-Pro. Chymotrypsin spaltet unter milden Bedingungen bevorzugt nach den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Bei längerer Inkubationszeit werden auch die carboxyterminalen Seiten von Leucin, Methionin, Asparaginsäure und Glutaminsäure angegriffen. Die V8 Protease spaltet in Phosphatpuffer auf der carboxyterminalen Seite von Asparaginsäure und Glutaminsäure, in 50 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer oder Ammoniumacetat-Puffer spaltet sie dagegen nur nach Glutaminsäure (Rehm und Letzel, 2010).

### **3.11. Western-Blot und Immunodetektion**

Beim Western-Blot Verfahren werden die auf einem denaturierenden oder nativen Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine adsorbierende Membran transferiert. Bei einer anschließenden Immunodetektion werden die zu untersuchenden Proteine durch spezifische Antikörper identifiziert. Auf diese Weise lassen sich Informationen über das Vorhandensein, das Molekulargewicht und die Expressionsstärke des zu untersuchenden Proteins gewinnen.

#### **3.11.1. Übertragung von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Semi-Dry Blot)**

Während der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel sollten die drei Puffer für den Semi-Dry Blot vorbereitet werden (Tabelle 15). Die Puffer werden bei +8 °C gelagert, allerdings sollten die 10 % Methanol erst vor Verwendung zugegeben werden.

**Tabelle 15: Zusammensetzung der Immobilon P Transfer Puffer.**

	<b>Komponenten</b>
<b>Anodenpuffer I</b> pH 10,4 (HCl)	0,3 M Tris
	10 % Methanol (v/v)
<b>Anodenpuffer II</b> pH 10,4 (HCl)	25 mM Tris
	10 % Methanol (v/v)
<b>Kathodenpuffer</b> pH 9,4 (HCl)	25 mM Tris
	40 mM Glycin
	10 % Methanol (v/v)

Direkt im Anschluss an die Elektrophorese wird das zu blottende Gel mit Klarsichtfolie abgedeckt und zugeschnitten. Die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran und die benötigten 6 Whatman-Filterpapiere werden ebenfalls zugeschnitten. Dann wird die Klarsichtfolie vom Gel entfernt und es für 15 min in Kathodenpuffer geschwenkt. In der Zwischenzeit wird die Membran für 15 s in 100 % Methanol geschwenkt, für 2 min in deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend für 5 min in Anodenpuffer II geschüttelt. Die Membran wird dabei immer vorsichtig mit einer stumpfen Pinzette gehandhabt.

Nun wird die Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) vorbereitet. Auf der unteren Anoden-Elektrodenplatte werden zwei Lagen in Anodenpuffer I getränkte Whatman-Filterpapiere gelegt, darauf kommt ein in Anodenpuffer II getränktes Whatman-Filterpapier, dann folgt die Membran aus dem Anodenpuffer II, das Gel aus dem Kathodenpuffer und zum Abschluss drei Lagen in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere. Mögliche Luftblasen im Aufbau behindern die Elektrophorese, weshalb zum Einen darauf zu achten ist die einzelnen Lagen vorsichtig von links nach rechts aufzulegen, sodass Luftblasen seitlich entweichen können, zum Anderen werden nach dem Aufbau durch vorsichtiges Rollen mit einem Glasstab mögliche weitere Luftblasen entfernt. Die Puffer, die dabei auf die untere Platte laufen und diese befeuchten, werden vorsichtig mit einem Tuch entfernt. Nun kann vorsichtig die Kathoden-Elektrodenplatte aufgelegt werden. Die Dauer des Blottens richtet sich nach der Größe des Gels. Bei einer Gelgröße von ca. 10 x 8 cm wird an die Semi-Dry Transfer Cell für eine Stunde eine Spannung von 20 V angeschlossen, wobei die Stromstärke anfänglich 400 mA, am Ende ca. 110 mA beträgt. Ist die Elektrophorese abgeschlossen und wird der Blot wieder auseinandergebaut, so ist darauf achten, welche Seite der Membran dem Gel zugewandt ist. Diese Seite wird in der Ecke mit einem kleinen Zeichen mit Kugelschreiber markiert. Im Anschluss an den Blot empfiehlt es sich das Gel mit Coomassie Blau G250 zu färben, um die Effizienz des Blots zu überprüfen.

Um alle unspezifischen Proteinbindungsstellen der Blotmembran abzusättigen, wird die Membran sachte über Nacht in 5%igem Blockingpuffer (100 ml TBST + 5 g Milchpulver; Tabelle 16) geschwenkt (Gelwippe Biometra WT16). Am nächsten Morgen wird der Puffer abgeschüttet und sofort mit dem ersten Waschschrift der Immunodetektion fortgeföhren (Tabelle 17).

**Tabelle 16: Zusammensetzung des Blockingpuffers.**

	Komponenten
10 x TBS pH 7,5 (HCl)	100 mM Tris
	9 % NaCl (w/v)
1xTBST	50 ml 10xTBS
	450 ml H <sub>2</sub> O, deionisiert
	250 µl Tween 20

### 3.11.2. Immunodetektion

Der Blot wird mit zwei Antikörpern inkubiert, wovon der Primärantikörper spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichtet ist. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und ermöglicht mittels konjugiertem Farbstoff, Enzym oder radioaktiver Markierung die Protein-Detektion.

In dieser Arbeit wurde ein Sekundärantikörper mit konjugierter Meerrettich-Peroxidase verwendet. Nachdem die Membran über Nacht in Blockingpuffer schwenkte erfolgt die Antikörperbindung (Tabelle 17). Alle Schritte werden bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken auf einer Gelwippe (Biometra WT16) durchgeführt.

**Tabelle 17: Antikörperbindung mit  $\alpha$ -IRp30 oder  $\alpha$ -Carboxylesterase1.**

Schritt	Lösung	Inkubationszeit
Waschen	1xTBST	2 min
1. Antikörper	1:1000 Verdünnung (40 µl AK auf 40 ml TBST)	1 h
Waschen	1xTBST	3 x 5 min
2. Antikörper	1:5000 Verdünnung (10 µl AK auf 50 ml TBST)	30 min
Waschen	1xTBST	3 x 5 min

Im Anschluss an die Antikörperbindung erfolgt die Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Detektion. Die Membran wird im letzten Waschpuffer gelassen und der Gang zur Dunkelkammer vorbereitet.

In der Dunkelkammer wird die Membran auf eine Glasplatte gelegt, alle anschließenden Schritte erfolgen bei Rotlicht. Die beiden ECL-Detektionsreagenzien (RPN 2209, GE Healthcare Amersham) werden im Verhältnis 1:1 gemischt (je 0,6 ml), vorsichtig auf die Membran gegeben und es wird eine Klarsichtfolie über die so beschichtete Membran geschlagen. Dann werden die ECL-Detektionsreagenzien auf der Membran noch einmal mit dem Finger verteilt. Durch die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase wird eine Chemilumineszenz erzeugende Reaktion hervorgerufen. Sie katalysiert die Umsetzung von Luminol in die oxidierte Form, wobei die bei dieser Reaktion entstehende Energie als Licht freigesetzt wird. Bei der ECL-Detektion sind zusätzlich noch chemische Verstärker wie z.B. Phenol zugegen, die die Lichtemission um ein Vielfaches verstärken und verlängern. Durch Auflegen eines Röntgenfilms kann das emittierte Licht nachgewiesen werden. Das Auflegen und Abnehmen des Films sollte so zügig wie möglich erfolgen, um ein verschwommenes Bild zu vermeiden. Die Hintergrundschwärzung kann zusätzlich verringert werden, wenn man während der Filmexposition auch noch das Rotlicht ausschaltet. Die Expositionszeit des 1. Röntgenfilms beträgt eine Minute, die des 2. oder auch 3. Films wird je nach vorhergehendem Ergebnis variiert.

### **3.11.3. Ablösen der Antikörper des Western-Blots („stripping“)**

Möchte man nach einer vorangegangenen Immunodetektion eine weitere Immunodetektion mit einem anderen Primärantikörper durchführen, so müssen die bereits gebundenen Antikörper entfernt bzw. abgelöst werden. Da bei einem solchen Vorgang stets auch etwas Protein von der Membran verlorenght, ist diese Methode nicht beliebig oft anwendbar.

Nach erfolgter erster Immunodetektion wird der Protein-Längenstandard auf der Membran mit Kugelschreiber nachgezeichnet, anschließend wird die Membran vorsichtig von der Glasscheibe in die Schale mit TBST zurückgelegt, um eine Austrocknung zu vermeiden. Der Strippingpuffer (Tabelle 18) wird auf 55 °C vorgewärmt und die Membran darin 30 min bei 55 °C geschüttelt, am Besten in einer gut zu verschließenden Schale. Anschließend wird 2 x 10 min in TBST gewaschen und 1 h in Blockingpuffer inkubiert. Im Weiteren erfolgt eine Immunodetektion wie bereits beschrieben.

**Tabelle 18: Zusammensetzung des Strippingpuffers.**

Komponenten	Reaktionsansatz
100 mM NaOH	80 ml
2 % SDS	20 ml
0,5 % DTT	500 mg (erst in NaOH lösen, dann erst SDS dazugeben)

**3.12. RNA-Aufreinigung**

Ein genügend großes Aliquot der ABPV-Suspension wird um den Faktor  $10^{-2}$  verdünnt, anschließend werden 25  $\mu$ l dieser Verdünnung in ein frisches 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Um das Volumen zu vergrößern werden 25  $\mu$ l PBS hinzugegeben. Es wird weiter verfahren wie in Tabelle 19 beschrieben.

**Tabelle 19: RNA-Aufreinigung aus Viruspartikeln.**

Komponenten	Reaktionsansatz
TRIzol® LS	450 $\mu$ l
5 min bei Raumtemperatur rotieren lassen	
Chloroform	100 $\mu$ l
1. schütteln und 10 min bei Raumtemperatur rotieren lassen 2. 10 min bei 10.000 UpM und 4 °C 3. wässrigen Überstand in frisches 1,5ml-Reaktionsgefäß überführen	
Glycogen (20 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Isopropanol	250 $\mu$ l
1. 10 min oder länger auf Eis 2. 10 min bei 10.000 UpM und 4 °C 3. Überstand schnell abnehmen und verwerfen 4. Sedimente in 100 $\mu$ l kaltem 75 % Ethanol aufnehmen 5. über Nacht bei -20 °C 6. 10 min bei 10.000 UpM und 4 °C 7. Überstand möglichst komplett abnehmen 8. Sedimente unter Abzug an Luft trocknen lassen	
Ampuwa-Wasser	60 $\mu$ l
Sedimente lösen durch 10 min schütteln bei 300 rpm im Eppendorf Thermomixer Comfort	

### 3.13. Reverse Transkription (RT) und PCR

Bei einer RT-PCR wird im ersten Schritt der Reversen Transkription (RT) aus RNA cDNA synthetisiert (Tabelle 20) und diese anschließend in einem zweiten Schritt mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die verwendete SuperScript™ Reverse Transkriptase ist eine veränderte Version der Reversen Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus.

**Tabelle 20: Reaktionsansatz der Reversen Transkription.**

Komponenten	Reaktionsansatz
RNA	5 µl
Oligo(dT) Primer	1 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
DEPC-Wasser	ad 10 µl
1. 5 min bei 65 °C, 2. mindestens 1 min auf Eis 3. 10 µl cDNA Synthesis Mix dazugeben	
<b>cDNA Synthesis Mix</b>	
10x RT Puffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
leicht schütteln, dann weitermachen	
RNase OUT (40 U/µl)	1 µl
SuperScript III (200 U/µl)	1 µl
Leicht anschnippen, 10 µl vorsichtig dem Ansatz zugeben, vorsichtig mischen und durch kurze Zentrifugation wieder sammeln	
1. 50 min bei 50 °C 2. 5 min bei 85 °C 3. auf Eis kühlen 4. kurz zentrifugieren	
RNase H (2 U/µl)	1 µl
20 min bei 37 °C Die fertige cDNA kann bei -20 °C gelagert werden.	

Bei der nachfolgenden Polymerasekettenreaktion (PCR) und auch bei jeder anderen PCR wird eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet, die es ermöglicht eine DNA-Matrize in einer zyklischen Reaktion beliebig oft zu amplifizieren. Ein PCR-Zyklus besteht im Wesentlichen aus drei sich wiederholenden Schritten. Nach jedem Zyklus hat sich die Anzahl an DNA-Strängen verdoppelt.

1. Denaturierung: Bei 94 °C wird die doppelsträngige DNA-Matrize in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen.
2. Annealing (Hybridisierung): die Oligonukleotidstartsequenzen binden an die DNA-Matrize. Dabei wird die Reaktionstemperatur 3-5 °C niedriger gewählt als die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Matrizen-/Oligonukleotid-Hybrids. Im Normalfall liegt sie zwischen 50 und 60 °C. Die optimalen Reaktionsbedingungen sind allerdings für jedes Paar Oligonukleotide über die Schmelzpunktformel neu zu berechnen.
3. Elongation: die hybridisierten Oligonukleotide werden verlängert. Die dabei verwendeten Polymerasen besitzen ein Temperaturoptimum von 72-78 °C. Die Länge der Elongationszeit sollte dabei an die Länge des erwarteten Produkts angepasst sein.

Als Kontrolle läuft stets ein Ansatz ohne Matrizen-DNA parallel. Der verwendete Reaktionsansatz ist in Tabelle 21 beschrieben. Die verwendete AmpliTaq Gold wird dabei 1:5 mit 1x Puffer (KCl) verdünnt.

**Tabelle 21: Reaktionsansatz einer PCR.**

Komponenten	Reaktionsansatz
10x Puffer (KCl)	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
10 µM Oligo 1	2 µl
10 µM Oligo 2	2 µl
Plasmid-DNA	1µl
<b>ODER</b> cDNA	<b>ODER</b> 2 µl
1,25 U AmpliTaq Gold	1,2 µl
DEPC-Wasser	ad 50 µl

Verwendete Oligonukleotidstartsequenzen sind in Tabelle 22 aufgeführt. Die Oligos für ABPV wurden Bakonyi et al. (2002) entnommen und decken VP 3 und einen Teil der 3'-UTR

ab (s. Abb. 3B). Die Oligos für SBV wurden Grabensteiner et al. (2001) entnommen und hybridisieren an einen Teil des Capsidproteins VP 2 (s. Abb. 3A). Die Oligos für DWV stammen von Tomoko Fujiyuki (Universität von Tokyo) und hybridisieren an den Teil, der für die Nichtstrukturproteine (vgl. Abb. 3A) codiert.

Die  $T_m$  wird dabei nach der Schmelzpunktformel  $T_m (^{\circ}\text{C}) = 4 \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \times (\text{A} + \text{T})$  berechnet.

**Tabelle 22: Verwendete Oligonukleotidstartsequenzen.**

Oligos	Sequenz	$T_m$	Produktlänge
ABPV25f	5'-GGA ACA TGG AAG CAT TAT TG-3'	56 °C	688bp
ABPV26r	5'-AAT GTC TTC TCG AAC CAT AG-3'	56 °C	
SB8f	5'-GCG TAG ACC AGT GTT GTT GT-3'	60 °C	613bp
SB7r	5'-GTC AGA GAA TGC GTA GTT CC-3'	60 °C	
RdRpF1	5'-CAC TCA CAT CGT GAC AGG A-3'	58 °C	423bp
RdRpR1	5'-GAA AAG AAT TTT CCT ATC GTT ACG-3'	64 °C	

Für eine PCR werden dabei folgende Programmparameter gewählt (Tabelle 23), wobei die Annealing-Temperatur 2-4 °C unter der  $T_m$  der Oligos liegen sollte.

**Tabelle 23: PCR-Programm.**

	Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Stufe 1	Denaturierung	95 °C	600 s	1 (hot start)
Stufe 2	Denaturierung	94 °C	30 s	40
	Annealing	56 °C	30 s	
	Elongation	72 °C	30 s	
Stufe 3	Abschlussphase	72 °C	600 s	1
		4 °C	Hold	

Nach der PCR wird jeweils ein Aliquot (5 µl) jedes Ansatzes mit 2,5xProbenpuffer HSE versetzt und zur Analyse in einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt.

### **3.14. Agarosegele zum Auftrennen von DNA-Fragmenten**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und effektive Methode DNA-Fragmente von 0,2-25 kb Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren. Zur Auftrennung

doppelsträngiger DNA (Plasmide, PCR-Produkte) wird die horizontale Agarose-Gelelektrophorese verwendet (Sambrook und Russel, 2001). Die aus D- und L-Galaktose alternierend aufgebaute Agarose wirkt hierbei als Molekularsieb. Je höher die Konzentration an Agarose im Gel ist, desto kleiner sind die Poren des Siebs. Man verwendet je nach zu analysierender Probe Agarosekonzentrationen von 0,5-2,0 % (w/v) für Trennbereiche von 20-0,2 kb. Die bei neutralem pH negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle wandern im angelegten Spannungsfeld in Richtung Anode. Ethidiumbromid (EtBr) dient zum Färben der Nukleinsäuren im Gel. Es interkaliert zwischen die GC-Paare und fluoresziert unter langwelligem UV-Licht. Durch den Zusatz von EtBr zu Gel- und/oder Laufpuffer können die Nukleinsäuren nach erfolgter Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 5 ng je Bande (Mülhardt, 2009).

Mit einem breiten Klebeband wird die Gelkammer an den offenen Stirnseiten abgedichtet. Die Agarose (% w/v = Gelkonzentration) wird durch vorsichtiges, mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle im gewünschten Volumen Elektrophoresepuffer (1xTBE) vollständig gelöst (Tabelle 25). Die auf 60 °C abgekühlte Lösung wird mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) supplementiert, in die Gelkammer gegossen und der Taschenformer zügig eingesetzt. Nach dem Erstarren der Gelmatrix wird das Klebeband entfernt und die Gelkammer in eine mit 1xTBE gefüllte Elektrophoreseapparatur gelegt, so dass das Gel vollständig mit Puffer überschichtet ist. Erst jetzt wird der Taschenformer herausgezogen. Die aufzutragenden Proben werden mit 0,6 Volumen 2,5xProbenpuffer HSE versetzt (Tabelle 24), vorsichtig in die Taschen pipettiert und durch Anlegen einer Spannung von 60-90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Bandenmuster kann aufgrund der Fluoreszenz des EtBr im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

**Tabelle 24: Zusammensetzung des 2,5xProbenpuffers HSE.**

	<b>Komponenten</b>
<b>2,5xProbenpuffer HSE</b>	50 % (w/v) Saccharose
	4 M Urea
	50 mM Na <sub>2</sub> EDTA x H <sub>2</sub> O
	0,1 % BPB (1 %)
	0,1 % XFF (1 %)
	ad 10 ml H <sub>2</sub> O, deionisiert

**Tabelle 25: Zusammensetzung des Agarose-Gelelektrophoresepuffers.**

	Komponenten
<b>10xTBE</b>	890 mM Tris
	890 mM H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>
	20 mM Na <sub>2</sub> EDTA
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O, deionisiert

### **3.15. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten im Hämocoel**

Es wird wie in Kap. 3.3.2. beschrieben eine Bakterienlösung zur Injektion vorbereitet. Für eine Verfolgung der Abnahme der koloniebildenden Einheiten (KBEs) wird 1 µl der Bakteriensuspension, d.h. 10<sup>5</sup> Zellen *E. coli* oder *M. flavus*, entweder in Puppen, Jungbienen oder ältere Bienen injiziert. Zur Kontrolle der tatsächlichen Anzahl injizierter KBEs wird ein Aliquot der Ausgangssuspension mit handwarmen PBS um den Faktor 10<sup>7</sup> verdünnt, anschließend werden auf 2 Agar-Platten je 100 µl ausplattiert. Es ist darauf zu achten, dass für *E. coli* NB- und nicht LB-Agar-Platten benutzt werden, da sich eine Benutzung von LB-Agar-Platten leicht negativ auf das Wachstum von *E. coli* auswirkt. Nach Injektion der Bakteriensuspension in die Bienen wird zu bestimmten Zeitpunkten Hämolymphe entnommen, ein Aliquot davon verdünnt und jeweils 100 µl auf 2 Agar-Platten ausplattiert. Mit zunehmendem zeitlichem Verlauf wird der Verdünnungsfaktor reduziert, da die Zellzahl zurückgeht. Nach Injektion von *E. coli* wird allerdings stärker verdünnt als nach Injektion von *M. flavus*, da die *M. flavus* Zellen *in vivo* schneller aus der Hämolymphe verschwinden. Die Agar-Platten inkubieren über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Bachofer) und am nächsten Tag werden die Kolonien pro Platte gezählt, mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und mit der Gesamtmenge an gewonnener Hämolymphe der jeweiligen Biene verrechnet. Dadurch erhält man die Gesamtzahl an überlebenden Bakterienzellen pro Biene.

### **3.16. Hemmhof-Test**

Mittels des Hemmhof-Tests lässt sich feststellen, ob antimikrobielle Aktivität in der Hämolymphe vorhanden ist. Auf NB- bzw. LB-Agar-Platten (Kap. 2.7.) werden je 0,15 ml Übernachtskulturen der Bakterienstämme *E. coli* 682 bzw. *M. flavus* ausgestrichen und antrocknen gelassen. Danach werden je 1,5 µl der zu testenden Hämolympheproben an 4-8 festgelegten Stellen der Agar-Platten aufgetropft. In die Mitte der Platten wird zur Kontrolle

1,5 µl eines Antibiotikums bekannter Konzentration getropft. Bei *E. coli* 682 handelt es sich dabei um Kanamycin (1 mg/ml), bei *M. flavus* um Lysozym (10 mg/ml). Nach Inkubation der Agar-Platten bei 37 °C und erfolgtem Bakterienwachstum, sieht man am Vorhandensein von Hemmhöfen, in denen kein Bakterienwachstum stattfand, und anhand deren Fläche, ob eine der zu testenden Hämolympfproben antibakterielle Wirkung zeigt, und wenn ja, wie stark diese antibakterielle Wirkung im Vergleich zur Kontrolle ist. Die Hemmhof-Platten werden mit einer Panasonic DMC-LZ3 fotografisch dokumentiert.

### **3.17. Nodulipräparation bei adulten Bienen**

Zu bestimmten Zeitpunkten nach Injektion (6 h und 24 h) der zu testenden Pathogene, wie z.B. ABPV-Partikel und lebende *E. coli* Bakterien, werden je 5 Bienen einer Versuchsgruppe und je 5 Bienen einer nicht-infizierten Kontrollgruppe bis zur Bewegungslosigkeit auf Eis gekühlt. Den Bienen werden der Kopf, die Flügel und Beine entfernt, anschließend werden sie auf je einer kleinen Paraffinpetrischale eingebettet. Unter dem Binokular werden anschließend vorsichtig mit einem kleinen Skalpell die abdominalen Tergite auf der lateralen Seite der Biene durchtrennt. Eine Verletzung der inneren Organe sollte dabei vermieden werden. Unter Zuhilfenahme von zwei Uhrmacherpinzetten werden nun die Tergite vorsichtig von links nach rechts abgenommen bzw. vom Abdomen gelöst. Dabei sollten die Tracheen oder der Herzschlauch möglichst nicht zerstört werden. Anschließend wird PBS auf das geöffnete Abdomen gegeben. Nun sieht man dorsal auf die inneren Organe und kann nach Noduli suchen, die sich vorwiegend entlang des Herzschlauches und der Tracheen sammeln. Die Präparation mit anschließender fotografischer Dokumentation der Noduli erfolgt unter dem Binokular Olympus SZX7 mit aufgesetzter Olympuskamera UC30. Zur Vermeidung von Spiegelungen wird ein Polarisationsfilter verwendet.

### **3.18. Inaktivierung von ABPV durch die künstliche RNase Dp12F6**

Zur Inaktivierung von ABPV wird ein Aliquot der ABPV-Suspension ( $10^4$  Partikel/µl) über Nacht mit der künstlichen RNase Dp12F6 in der gewünschten Konzentration (0,04-400 µM) inkubiert. Als Kontrolle dient ein Aliquot der ABPV-Suspension, das unter den gleichen Bedingungen inkubiert, allerdings in Abwesenheit von Dp12F6 (Tabelle 26, 27).

**Tabelle 26: Protokoll zur Inaktivierung von ABPV durch Dp12F6.**

	Komponenten
<b>Ansatz</b>	5 µl ABPV ( $10^4$ Partikel)
	45 µl Dp12F6 in aRNase Puffer
<b>Kontrolle (-aRNase)</b>	5 µl ABPV ( $10^4$ Partikel)
	45 µl aRNase Puffer
18 h bei 37 °C inkubieren	

Von der resultierenden Lösung wird entweder direkt 1 µl in Larven injiziert oder aber die Anzahl enthaltener ABPV-Partikel wird vor Injektion durch 1:10 Verdünnung mit PBS auf  $10^3$  reduziert.

**Tabelle 27: Puffer für künstliche RNasen.**

	Komponenten
<b>aRNase Puffer</b>	50 mM Tris-HCl, pH 7,0
	0,2 mM EDTA
	200 mM KCl

## **4. Ergebnisse**

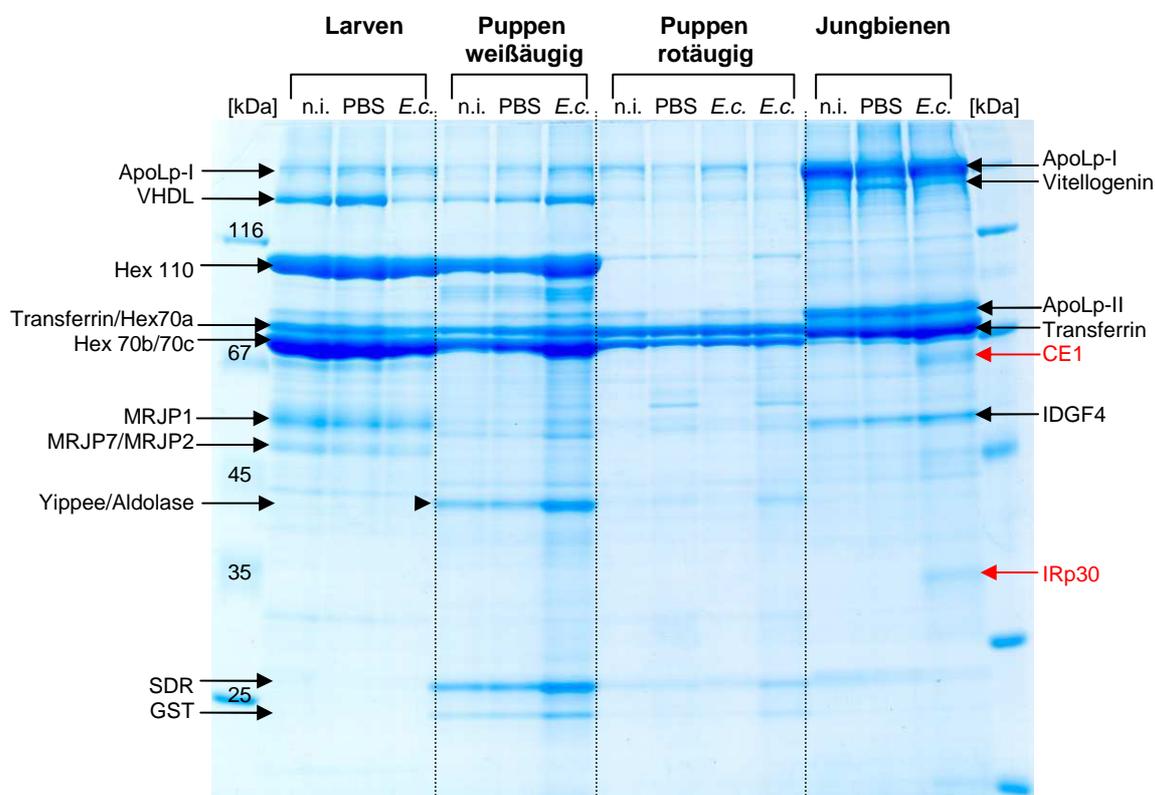
### **4.1. Von der Larve über die Puppe zur Jungbiene**

Bei der Honigbiene gibt es drei Entwicklungsstadien, die sich physiologisch und morphologisch voneinander unterscheiden. Als Folge davon gibt es Bienenpathogene, die entweder nur die adulte Biene befallen oder nur die Brut, dabei speziell Larven. Krankheiten, denen nur Puppen zum Opfer fallen, sind keine bekannt, vermutlich da das Puppenstadium geschützt in einer vollständig verdeckelten Wachszelle abläuft.

#### **4.1.1. Unterschiede im allgemeinen Hämolymp-Proteinmuster**

Der offensichtliche Unterschied zwischen Larven, Puppen und adulten Bienen legt nahe, dass sich auch die Hämolymp-Proteome voneinander unterscheiden, da die Hämolymphe des jeweiligen Entwicklungsstadiums teilweise spezifische Aufgaben zu erfüllen hat und in der Tat lassen sich schon auf den ersten Blick Unterschiede im Proteinmuster erkennen (Abb. 5). Bei Larven überwiegen hochmolekulare Speicherproteine wie das Very High Density Lipoprotein (VHDL, gi|110762106) und die Hexamerine (Hex 110, gi|155369750; Hex 70a, gi|148357839; Hex 70b, gi|58585148; Hex 70c, gi|148887477). Außerdem kommen spezifisch in Larven verschiedene Major Royal Jelly Proteine vor (MRJP1, gi|58585098; MRJP2, gi|66532248; MRJP7, gi|62198227). MRJPs sind Hauptbestandteile des Larvenfutters, werden sehr früh im weiteren Verlauf der Entwicklung abgebaut und sind schon in weißäugigen Puppen nicht mehr zu entdecken. Dafür sieht man im Hämolymp-Proteom weißäugiger Puppen drei spezifische Banden, die eindeutig als Short Chain Dehydrogenase (SDR), Glutathione S-Transferase (GST) und Yippee interacting protein (Yippee) bzw. Aldolase identifiziert werden können. Zudem sieht man im weißäugigen Puppenstadium auch einen beginnenden Abbau der hochmolekularen Speicherproteine (VHDL, Hexamerine), der sehr rasch voranschreitet und schon in rotäugigen Puppen (2 d älter) dazu führt, dass VHDL und Hex 110 nur noch als schwache Banden im Gel zu sehen sind. Aber auch die Banden der Hexamerine 70a/b/c haben deutlich an Intensität verloren. Bis sich aus einer rotäugigen Puppe eine junge Biene entwickelt vergehen einige Tage. In dieser Zeit kommt es in der Hämolymphe zu einem Anstieg an Apolipoporphin-I, -II (ApoLp-I, -II, gi|66513966) und Transferrin (gi|58585086). Typisch für adulte Bienen ist außerdem der

Imaginal Disc Growth Factor 4 (IDGF4, gi|66514614). Von den Hexamerinen lässt sich lediglich Hex 70a auch in adulten Bienen nachweisen.



**Abb. 5: Gelelektrophoretische Analyse von Hämolymphe aller drei Entwicklungsstadien.**

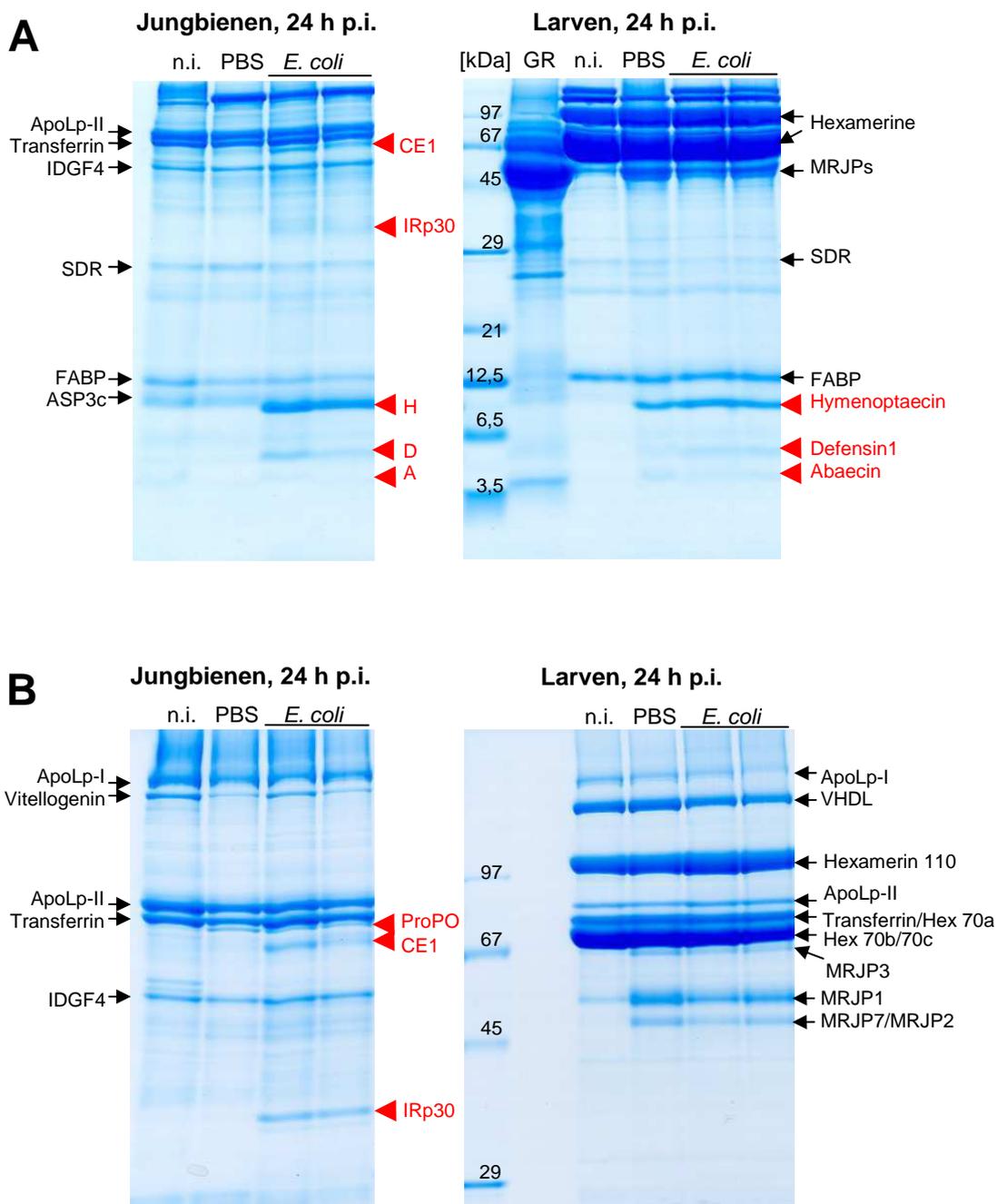
n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, E.c.: Injektion von  $10^3$  Zellen *E. coli* 682 bei Larven und Puppen und Injektion von  $10^4$  Zellen *E. coli* 682 bei Jungbienen. Alle Hämolympfproben wurden 24 h nach Injektion (p.i.) entnommen. Bei Larven war das am fünften Tag der Larvalentwicklung, bei weißäugigen Puppen am zweiten Tag des Puppenstadiums, bei rotäugigen am vierten Tag des Puppenstadiums und bei Jungbienen an Tag 2 nach dem Schlupf. Je  $0,75 \mu\text{l}$  Hämolymphe der Larven,  $0,9 \mu\text{l}$  Hämolymphe der weißäugigen Puppen,  $1,3 \mu\text{l}$  Hämolymphe der rotäugigen Puppen und  $1,3 \mu\text{l}$  Hämolymphe der Jungbienen wurden auf die jeweilige Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen und anschließend im Laemmli-Puffersystem einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendete Längenstandards: Fermentas SM0431 und Serva 39215.01.

Rot markiert sind diejenigen Proteine, die in Jungbienen nach *E. coli* Infektion induziert werden: CE1 = Carboxylesterase1, IRp30 = Immune-Responsive protein 30 (ehemals HP30). ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, VHDL = Very High Density Lipoprotein, Hex = Hexamerin, IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4, MRJP = Major Royal Jelly Protein, Yippee = Yippee interacting protein, SDR = Short Chain Dehydrogenase, GST = Glutathione S-Transferase.

#### 4.1.2. Unterschiedliche Expression von immunspezifischen Peptiden bzw. Proteinen bei Larven, Jungbienen und Puppen

Larven und adulte Bienen sind diejenigen Entwicklungsstadien, die starken äußeren Einflüssen ausgesetzt sein können, da sie über andere Bienen indirekten Kontakt zur Außenwelt haben. Larven werden von Ammenbienen gefüttert, die das Larvenfutter in ihren Hypopharynxdrüsen produzieren. Durch diesen direkten Kontakt können Krankheitserreger, wie z.B. das Sackbrut Virus oder *Paenibacillus larvae*, übertragen werden. Adulte Bienen teilen ihren Honigmageninhalt über Trophallaxis mit anderen Bienen (Seeley, 1995, S. 40). Bei beiden Varianten besteht die Möglichkeit sich Pathogene einzuverleiben, entweder durch infizierte Nestgenossinnen oder durch verseuchte Nahrung. Daher ist für beide Entwicklungsstadien ein intaktes Immunsystem von Vorteil. Schon während meiner Diplomarbeit fand ich heraus, dass nach artifizieller Injektion von Bakterien sowohl bei Larven, als auch bei Jungbienen, eine deutliche Immunantwort in Form von exprimierten antimikrobiellen Peptiden (AMPs) nachweisbar ist. Interessant hierbei ist, dass allein Larven schon auf bloße Verwundung mit der Bildung von AMPs reagieren, was bei Jungbienen nicht der Fall ist (Abb. 6A; Randolt et al., 2008).

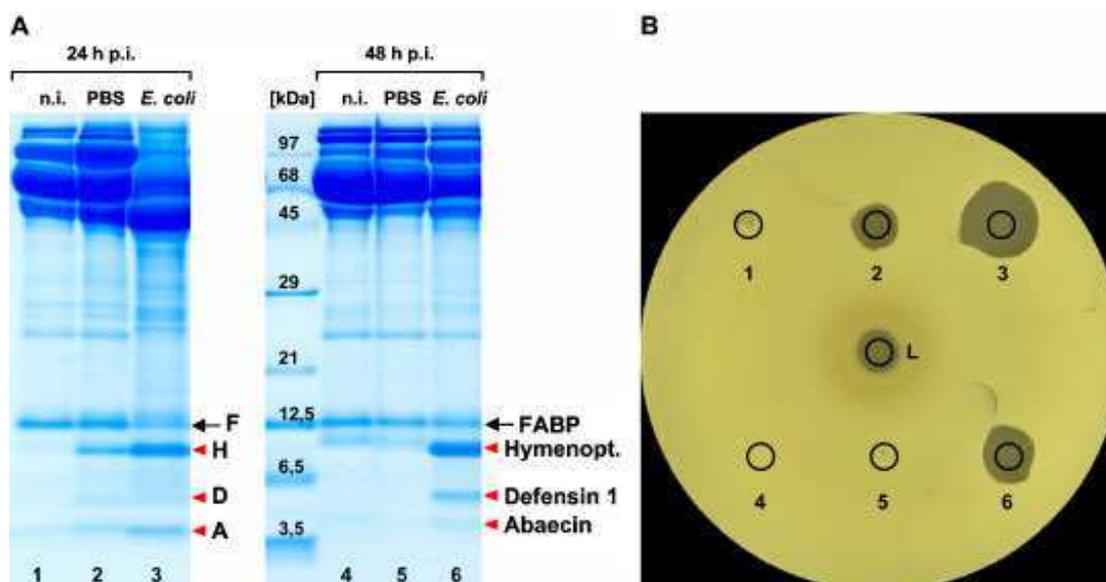
Es gibt allerdings noch einen weiteren wichtigen Unterschied in der Immunantwort der beiden Entwicklungsstadien. Während Larven einzig und allein die bereits bekannten AMPs Hymenoptaecin (H, gi|58585174), Defensin1 (D, gi|58585176) und Abaecin (A, gi|1703044) bilden, exprimieren Jungbienen zusätzlich vier weitere immunspezifische Proteine im höhermolekularen Bereich (Randolt et al., 2008), wovon in Abb. 6B drei zu sehen sind. Davon ist die Prophenoloxidase (ProPO, gi|58585196) das bestuntersuchte Protein, gefolgt vom Peptidoglycan Recognition Protein-S2 (PGRP-S2). Zusätzlich taucht noch eine Carboxylesterase1 (CE1, gi|66512983) und ein unbekanntes Protein mit einer Größe von 30 kDa auf. Letzteres wurde anfänglich als Hypothetisches Protein 30 (HP30, gi|66507096) bezeichnet, wurde aber inzwischen umbenannt in Immune-Responsive protein 30 (IRp30), da vieles darauf hinweist, dass es eine Rolle bei der Immunantwort spielt. Im Gegensatz zur Carboxylesterase1 und IRp30, die nur nach artifizieller Infektion exprimiert werden, taucht die Prophenoloxidase auch schon nach bloßer Verwundung in der Hämolymphe auf. Diese interessanten Erkenntnisse meiner Diplomarbeit bezüglich des humoralen Immunsystems von Larven und Jungbienen dienen mit als Grundlage der hier vorliegenden Arbeit.



**Abb. 6: Hoch- und niedermolekulare Proteine in der Hämolymphe von Jungbienen und Larven (Randolt et al., 2008).**

n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, *E.c.*: Injektion von  $10^5$  Zellen *E. coli* 682. Alle Hämolympfproben wurden 24 h nach Injektion (p.i.) entnommen. Bei Larven war das am sechsten Tag der Larvalentwicklung und bei Jungbienen an Tag 3 nach dem Schlupf. Je 1  $\mu$ l der Hämolymphe eines einzelnen Individuums wurde auf eine Spur eines (A) 15 % PAA/0,1 % SDS Gels (Tricine-Puffersystem) bzw. je 0,75  $\mu$ l auf eine Spur eines (B) 10 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendete Längenstandards: Serva 39208.01, 39209.01 und Insulin  $\beta$ . Rot markiert sind diejenigen Proteine, die in Larven und Jungbienen nach Verwundung (PBS) oder *E. coli*-Infektion induziert werden. ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, VHDL = Very High Density Lipoprotein, IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4, MRJPs = Major Royal Jelly Proteine, SDR = Short Chain Dehydrogenase, FABP = Fatty Acid Binding Protein, ASP3c = Antennal-specific protein 3c, H = Hymenoptaecin, D = Defensin1, A = Abaecin, ProPO = Prophenoloxidase, CE1 = Carboxylesterase1, IRp30 = Immune-Responsive protein 30.

Ein weiterer Unterschied betrifft die transiente Expression von antimikrobiellen Peptiden. Wie schon bemerkt reagieren allein Larven schon auf bloße Verwundung mit der Bildung von AMPs. Allerdings werden diese sehr rasch wieder abgebaut, so dass 48 h nach Injektion von PBS weder im Proteinmuster noch im Hemmhof-Test AMPs nachzuweisen sind, ganz im Gegensatz zum Resultat einer *E. coli*-Infektion, wo auch nach 48 h immer noch ausreichend Hymenoptaecin, Defensin1 und Abaecin im Proteinmuster und im Hemmhof-Test zu entdecken sind (Abb. 7).



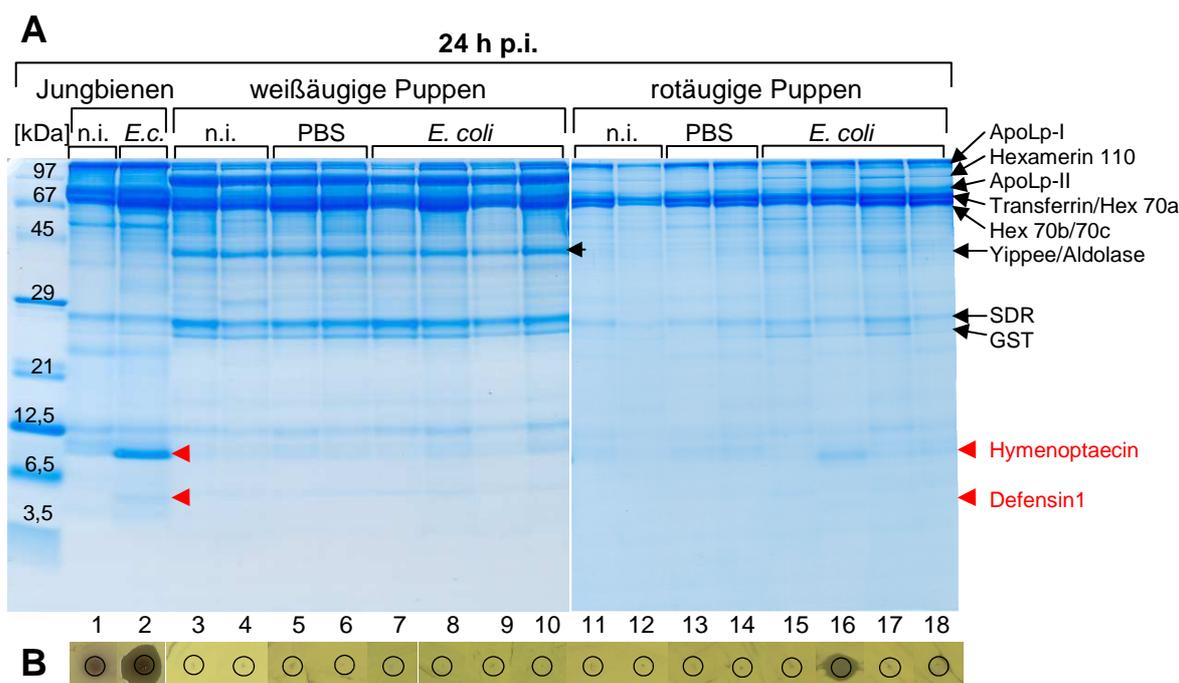
**Abb. 7: Transient exprimierte Immunpeptide in Bienenlarven (Randolt et al., 2008).**

(A) Gelelektrophoretische Analyse von Hämolympheproteinen von Larven, die am vierten Tag ihrer Larvalentwicklung behandelt wurden. n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, *E. coli*: Injektion von  $10^5$  Zellen lebende *E. coli* 682. Auf jede Spur wurden 1,5  $\mu$ l Hämolymphe eines einzelnen Individuums aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einem 15 % PAA/0,1 % SDS Gel (Tricine-Puffersystem), anschließend wurde mit Coomassie Blau G250 gefärbt. Verwendete Längenstandards: Serva 39208.01, 39209.01 und Insulin  $\beta$ .

FABP = Fatty Acid Binding Protein, ein interner Standard bei Larven (gi58585214). Die roten Pfeile kennzeichnen die induzierten AMPs: H = Hymenoptaecin, D = Defensin1 und A = Abaecin.

(B) Hemmhof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität in der Hämolymphe infizierter Larven. Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *Micrococcus flavus*, die als Rasen auf eine Agarplatte ausgebracht wurde. 1,5  $\mu$ l der gleichen Hämolympheproben wie auf den Gelen (1-6) wurden mit einer Pipette auf den gerade ausgebrachten und angetrockneten Rasen aufgetropft (ebenfalls 1-6) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 1,5  $\mu$ l Lysozym (L, 5 mg/ml) dient in der Mitte der Platte als Kontrolle.

Betrachtet man nun die humorale Immunantwort von Puppen (Abb. 8), so lassen sich in den ersten 24 h nach artifizierlicher Infektion im frühen weißäugigen Puppenstadium keinerlei AMPs nachweisen, weder im Proteingel noch im Hemmhof-Test. Lediglich im rotäugigen Puppenstadium lässt sich eine beginnende humorale Immunantwort erahnen. Aus diesem Grund habe ich mich in meinen weiteren Studien zur humoralen Immunantwort hauptsächlich auf Larven und Jungbienen konzentriert.



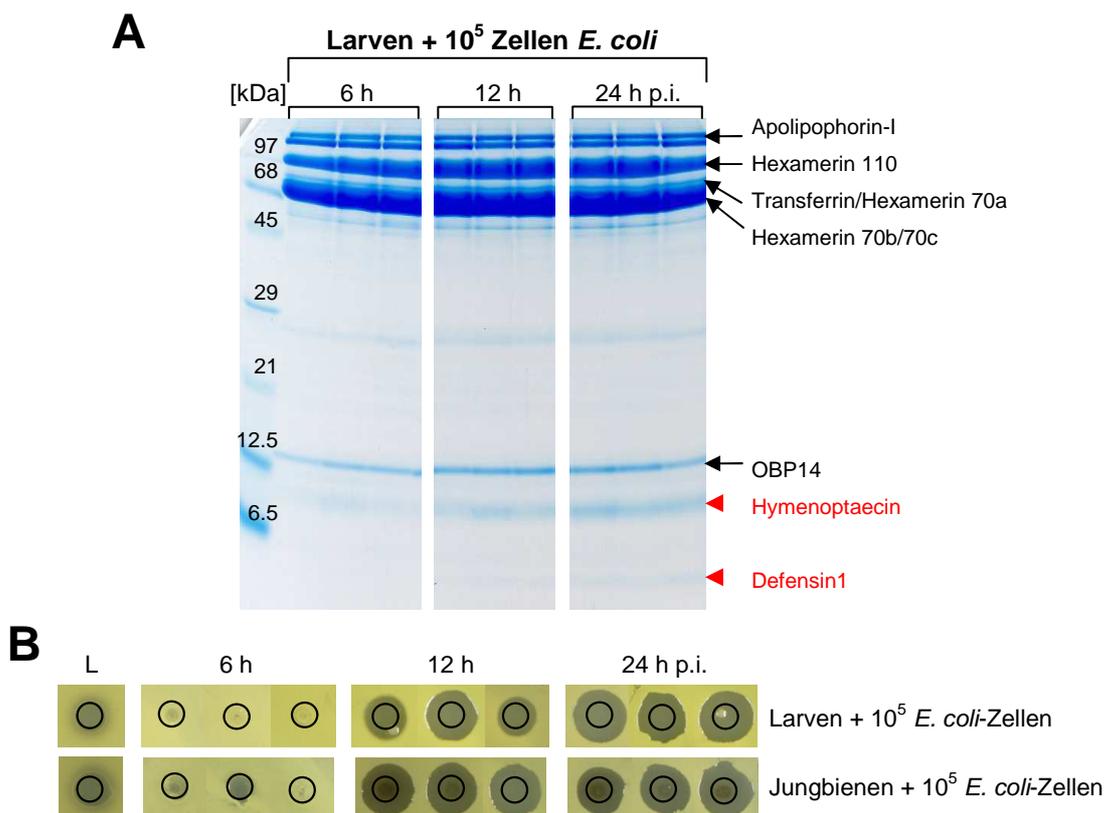
**Abb. 8: Expression von AMPs in immunstimulierten Puppen.**

(A) Gelelektrophoretische Analyse der Hämolymphe. n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, *E.c.*: Injektion von  $10^3$  Zellen *E. coli* 682 in Puppen und  $10^4$  Zellen *E. coli* 682 in Jungbienen. Alle Hämolympfproben wurden 24 h p.i. entnommen. Bei Jungbienen war das an Tag 2 nach dem Schlupf, bei weißäugigen Puppen am zweiten Tag des Puppenstadiums und bei rotäugigen am vierten Tag des Puppenstadiums. Je 1,5  $\mu$ l Hämolymphe von Jungbienen, je 0,9  $\mu$ l Hämolymphe von weißäugigen Puppen und je 1,3  $\mu$ l Hämolymphe von rotäugigen Puppen wurden auf die jeweilige Spur eines 15 % PAA/0,1 % SDS Gels (Tricine-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendete Längenstandards: Serva 39208.01, 39209.01 und Insulin  $\beta$ .

ApoLp-I und II = Apolipoprotein I und II, Hex = Hexamerin, Yippee = Yippee interacting protein, SDR = Short Chain Dehydrogenase, GST = Glutathione S-Transferase. Die roten Pfeile zeigen die Induktion der bekannten AMPs Hymenoptaecin und Defensin1.

(B) Hemmhof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität in der Hämolymphe infizierter Puppen. Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *M. flavus*, die als Rasen auf eine Agarplatte ausgebracht wurde. 1,5  $\mu$ l der gleichen Hämolympfproben wie auf den Gelen (1-18) wurden mit einer Pipette auf den gerade ausgebrachten und angetrockneten Rasen aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der deutliche Hemmhof einer *E. coli*-infizierten Jungbiene (2) dient als Kontrolle.

In Jungbienen und Larven sieht man 24 h nach Injektion eines Elizitors eine deutliche Immunantwort in Form von AMPs (Abb. 6). Was ist jedoch mit früheren Zeitwerten? Ab wann erscheinen AMPs in der Hämolymphe? Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von *E. coli*-Zellen Hämolymphe entnommen (Abb. 9).



**Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der Expression von Hymenoptaecin und Defensin1.**

Die Hämolympfproben wurden 6, 12 und 24 h nach Injektion (p.i.) von 10<sup>5</sup> Zellen *E. coli* 682 in Larven und Jungbienen entnommen. (A) Je 1,2 µl der Hämolymphe einer einzelnen Larve wurde auf eine Spur eines 15 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendete Längenstandards: Serva 39208.01 und 39209.01. Hymenoptaecin (H) und Defensin1 (D) sind rot markiert.

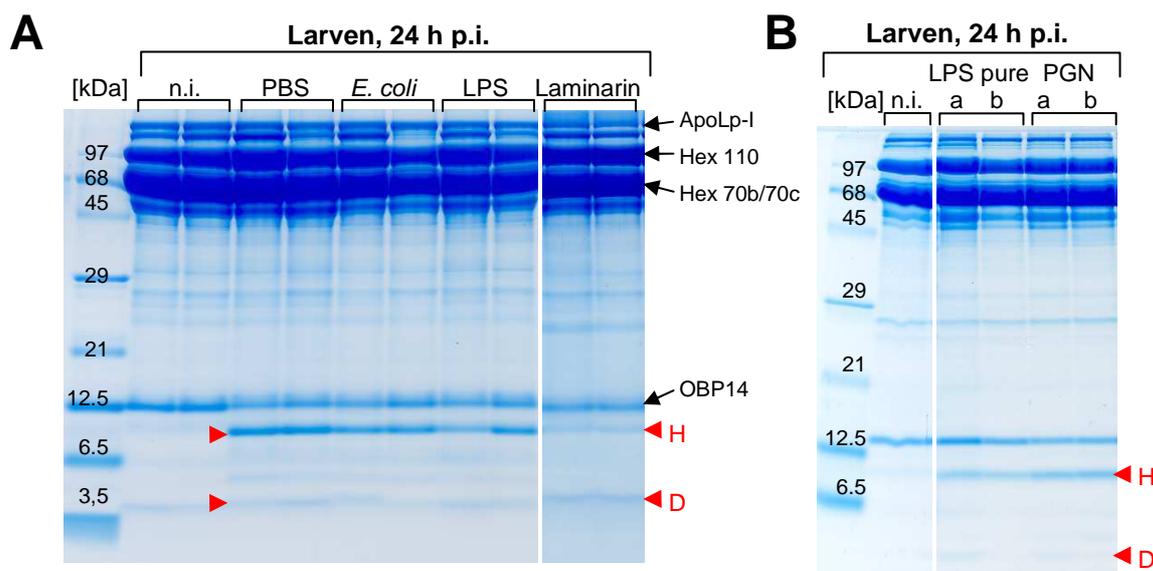
(B) Hemmhof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität in der Hämolymphe infizierter Larven und Jungbienen 6, 12 und 24 h p.i.. Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *M. flavus*, die als Rasen auf eine Agarplatte ausgebracht wurde. Bei den Larven wurden 1,5 µl der gleichen Hämolympfproben wie auf dem Gel aufgetropft, bei den Jungbienen waren es entsprechende Proben. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C. Der Hemmhof von Lysozym (L, 10 mg/ml) dient als Kontrolle.

Man erkennt im Hämolympf-Proteinmuster von Larven deutlich, dass 12 h nach Injektion von *E. coli* ausreichende Mengen an Hymenoptaecin und Defensin1 exprimiert werden (Abb. 9A). Eine beginnende Expression antimikrobieller Peptide zwischen 6 und 12 h p.i. lässt sich, sowohl für Larven als auch für Jungbienen, im Hemmhof-Test (Abb. 9B) veranschaulichen. Offensichtlich gibt es zwischen Larven und Jungbienen keine großen Unterschiede in der zeitlichen Expression der AMPs.

### 4.1.3. Die Auswirkung verschiedener Elizitoren auf das humorale Immunsystem von Larven und Jungbienen

Es gibt in der Natur alle möglichen Arten von Pathogenen: gram-negative und gram-positive Bakterien, Pilze, Einzeller und Viren. Einige evolutionär-stabile Bestandteile dieser Pathogene werden vom angeborenen Immunsystem erkannt und aktivieren beispielsweise die humorale und/oder die zelluläre Immunantwort. Um das Aktivierungsspektrum des humoralen Immunsystems der Honigbiene einzugrenzen bzw. auszuloten, wurden Larven und Jungbienen unterschiedliche Elizitoren, d.h. immunstimulierende Pathogene oder Pathogenbestandteile injiziert und die Expression von immunspezifischen Peptiden bzw. Proteinen überprüft (Abb. 10 und 11).

Als Elizitoren dienten hierbei zum Einen lebende, gram-negative *Escherichia coli* 682. Außerdem Lipopolysaccharide (LPS), Bestandteile der äußeren Membran des gram-negativen *E. coli* 0111:B4, aufgereinigt durch Phenolextraktion. Man kann bei dieser Aufreinigung davon ausgehen, dass noch ausreichende Mengen gram-negativen Peptidoglycans (Bestandteil der Bakterienzellwand) in der Substanz zurückbleiben. Daher wurde ein zusätzliches, durch Gelfiltrationschromatographie aufgereinigtes LPS von *E. coli* 0111:B4 benutzt, das im Weiteren als LPS pure bezeichnet wird, da davon auszugehen ist, dass es kein Peptidoglycan mehr enthält. Als repräsentative gram-positive Bakterien dienten lebende *Micrococcus flavus*. Das verwendete Peptidoglycan stammt von *M. luteus*. Laminarin wird in großen Mengen aus der Braunalge *Laminaria digitata* gewonnen und besteht vorwiegend aus Poly-1,3- $\beta$ -Glukan. Der Hauptbestandteil von Pilzzellwänden ist ebenfalls 1,3- $\beta$ -Glukan (Lipke und Ovalle, 1998), daher wird hier Laminarin benutzt, um eine Pilzinfektion zu simulieren.



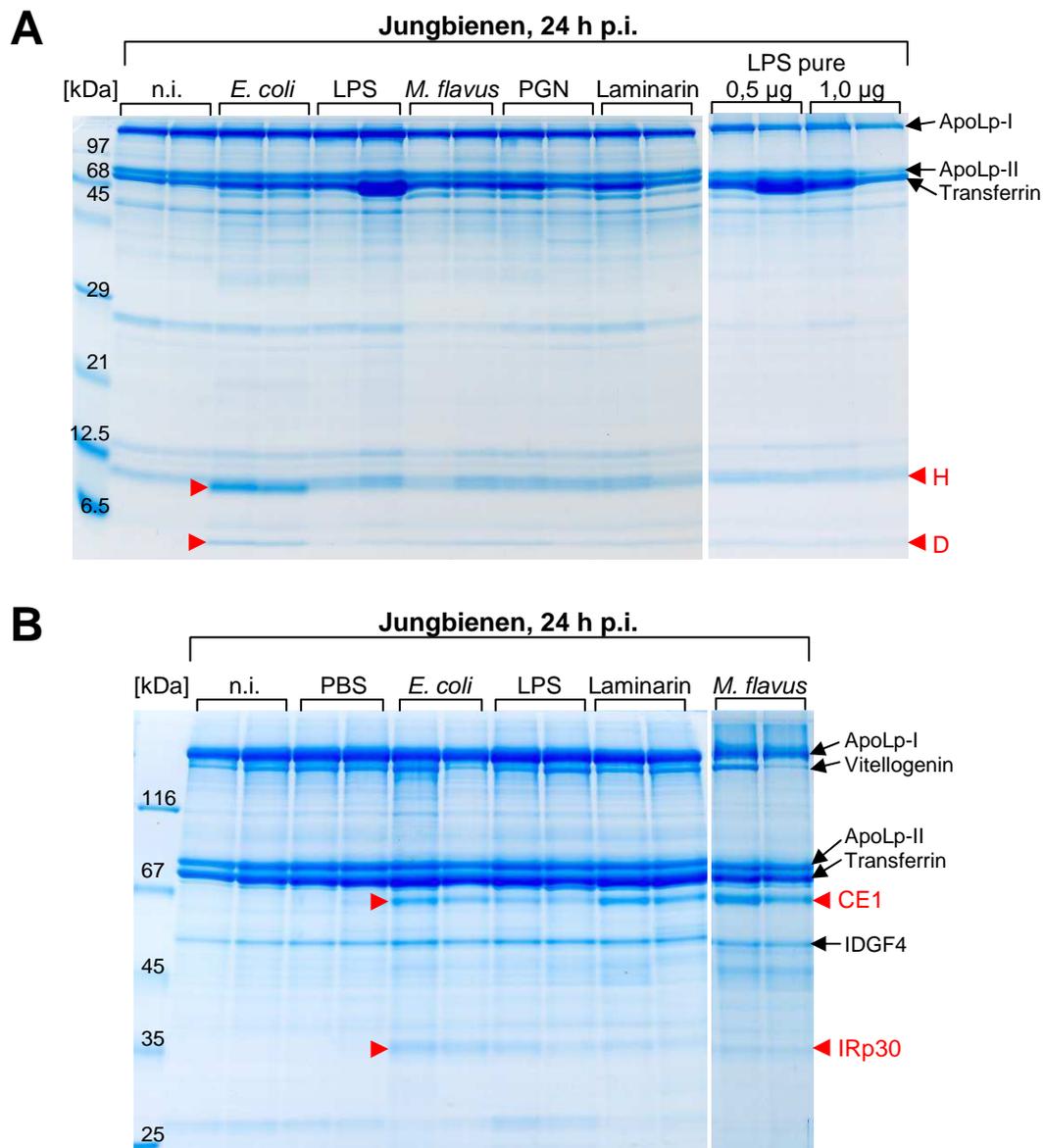
**Abb. 10: Hämolympf-Proteinmuster von Larven nach Injektion von unterschiedlichen Elizitoren.**

(A, B) n.i. = nicht-injiziert, PBS = Injektion von Puffer zur Verwundung, *E. coli* 682 = Injektion von  $10^4$  Zellen lebender gram-negativer Bakterien, LPS = Injektion von 0,5  $\mu$ g Lipopolysaccharid, Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, Laminarin = Injektion von 30  $\mu$ g eines Bestandteils von Pilzzellwänden, LPS pure = Injektion von (a) 0,5  $\mu$ g und (b) 1,0  $\mu$ g hochaufgereinigten Lipopolysaccharids und PGN = Injektion von (a) 0,5  $\mu$ g und (b) 1,0  $\mu$ g Peptidoglycan,

Bei (A) wurden je 2  $\mu$ l Hämolymphe der einzelnen Larven und je 1,5  $\mu$ l Hämolymphe der Laminarin-infizierten Larven und bei (B) je 1,5  $\mu$ l Hämolymphe der einzelnen Larven auf je eine Spur eines 15 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese erfolgte für (A) im Tricine-Puffersystem und für (B) im Laemmli-Puffersystem. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendete Längenstandards: Serva 39208.01, 39209.01 und Insulin  $\beta$ . Die roten Pfeile kennzeichnen die Induktion von Hymenoptaecin (H) und Defensin1 (D). ApoLp-I = Apolipoprotein I, Hex 110 = Hexamerin 110, Hex 70b/70c = Hexamerine 70b/70c, OBP14 = Odorant binding protein 14.

Es ist in Abb. 10 und 11 deutlich zu erkennen, dass beide Entwicklungsstadien mit der Bildung von AMPs auf die Injektion von Bestandteilen verschiedener Mikroorganismen reagieren. Larven reagieren dabei auf die Injektion aller getesteter Elizitoren stark, wobei nicht zu unterscheiden ist, ob diese Reaktion tatsächlich auf die unterschiedlichen Elizitoren zurückzuführen ist oder auf die mechanische Verletzung durch den Injektionsvorgang, da Larven auch schon auf PBS Injektion sehr stark reagieren. Einzig die Reaktion auf Laminarin fällt schwächer aus (Abb. 10A).

Jungbienen hingegen reagieren auf die Injektion lebender *E. coli* Bakterien mit einer stärkeren Expression von Hymenoptaecin und Defensin1 als auf die Injektion anderer Elizitoren (Abb. 11A). Bei der Expressionsstärke der beiden immunspezifischen Proteine IRp30 und CE1 kann jedoch kein starker Unterschied zwischen der Injektion von lebenden *E. coli*-Zellen und anderen Elizitoren festgestellt werden (Abb. 11B).



**Abb. 11: Hämolympf-Proteinmuster von Jungbienen nach Injektion von unterschiedlichen Elizitoren.**

(A) n.i. = nicht-injiziert, PBS = Injektion von Puffer zur Verwendung, *E. coli* 682 = Injektion von  $10^4$  Zellen lebender gram-negativer Bakterien, LPS = Injektion von 0,5 µg Lipopolysaccharid, Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, *M. flavus* = Injektion von  $10^4$  Zellen lebender gram-positiver Bakterien, PGN = Injektion von 1 µg Peptidoglycan, Bestandteil der Zellwand eines gram-positiven Bakteriums (*M. luteus*), Laminarin = Injektion von 30 µg eines Bestandteils von Pilzzellwänden und LPS pure = Injektion von 0,5 µg und 1,0 µg hochaufgereinigten Lipopolysaccharids.

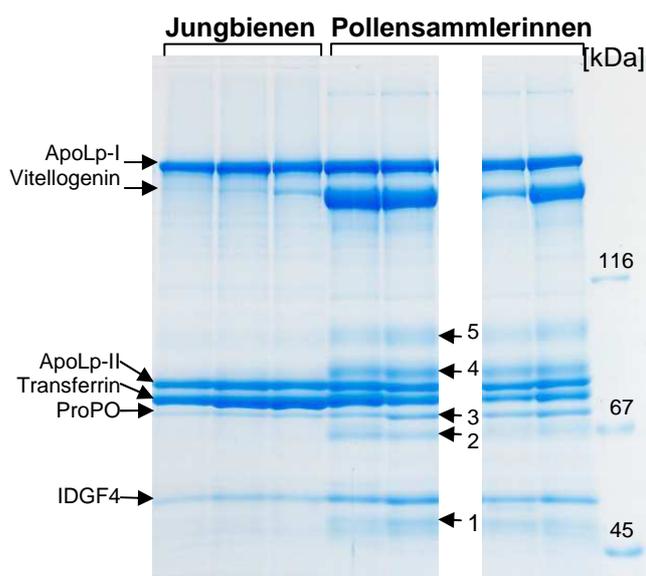
Bei (A) wurden je 1,3 µl der Hämolymphe der einzelnen Jungbienen auf je eine Spur eines 15 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen und bei (B) wurden je 1,3 µl Hämolymphe der einzelnen Jungbienen auf je eine Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese erfolgte im Laemmli-Puffersystem. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendete Längenstandards: Serva 39208.01, 39209.0, Insulin β und Fermentas SM0431. Die roten Pfeile kennzeichnen die Induktion von Hymenoptaecin (H) und Defensin1 (D) im niedermolekularen Bereich und von Carboxylesterase1 (CE1) und Immune-Responsive protein 30 (IRp30) im höhermolekularen Bereich. ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4.

## 4.2. Alters- bzw. aufgabenspezifische Unterschiede im Hämolymp-Proteinmuster

Aufgrund einer altersabhängigen Arbeitsteilung erfüllen Bienen abhängig vom Alter unterschiedliche Aufgaben für die zum Teil unterschiedliche physiologische Voraussetzungen erfüllt sein müssen. Dadurch kann man davon ausgehen, dass sich unterschiedlich alte und unterschiedlich spezialisierte Bienen nicht nur in ihrer Physiologie, sondern auch in ihrem Hämolymp-Proteinmuster voneinander unterscheiden.

### 4.2.1. Ein Vergleich zwischen Jungbienen und Pollensammlerinnen

Jungbienen und Pollensammlerinnen stellen jeweils den Anfang und das Ende eines Bienenlebens dar. Als Jungbiene werden maximal zwei Tage alte Bienen bezeichnet, die nach dem Schlupf abhängig vom steigendem Alter verschiedene Aufgaben im Stock erfüllen, bevor sie nach ca. 20 Tagen zu Sammlerinnen und damit außerhalb des Stocks tätig werden (Seeley, 1995). Zwischen den Hämolymp-Proteinmustern dieser beiden Extreme eines Bienenlebens (jung und sicher im Stock, alt und gefährdet im Außendienst) lassen sich einige Unterschiede erkennen (Abb. 12). Interessant ist es zu erwähnen, dass Sammlerinnen, je nach Bedarf der Kolonie, wechseln zwischen alleinigem Sammeln von Nektar, von Pollen oder dem zeitgleichen Sammeln von Beidem (Free, 1967).



**Abb. 12: Hämolymp-Proteinmuster von Jungbienen und erfahrenen Pollensammlerinnen.**

Je 1,3 µl Hämolymphe von einzelnen Individuen wurden auf je eine Spur eines 8 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen (Laemmli-Puffersystem). Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431. In beiden Bienengruppen vorhandene Proteine: ApoLp-I und -II = Apolipoprotein I und II, ProPO = Prophenoloxidase und IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4. Interessante Proteine in Pollensammlerinnen (1-5) wurden ausgeschnitten und mittels nano-LC-ESI-MS/MS analysiert (Tabelle 28).

**Tabelle 28: Proteine in der Hämolymphe erfahrener Pollensammlerinnen.\***

Nr.	Protein	Accession (NCBI)	Molekulare Masse (Da) <sup>a</sup>	SP <sup>b</sup>
1	<b>Enolase</b>	gi 110761968	40.149	-
	<b>Serinprotease</b>	gi 110758534	45.503	18
2	<b>Carboxylesterase1</b>	gi 66512983	65.249	18
	<b>Aminooxidase</b>	gi 66525345	57.178	17
3	<b>Prophenoloxidase</b>	gi 58585196	80.094	-
4	<b>Toll-like receptor 13-like</b>	gi 110755367	75.705	17
5	<b>Alpha-Glucosidase-II</b>	gi 94400901	66.568	24

\* eine ausführlichere Tabelle befindet sich im Anhang als Tabelle S28.

<sup>a</sup> die molekulare Masse wurde mithilfe des Programms ProtParam errechnet.

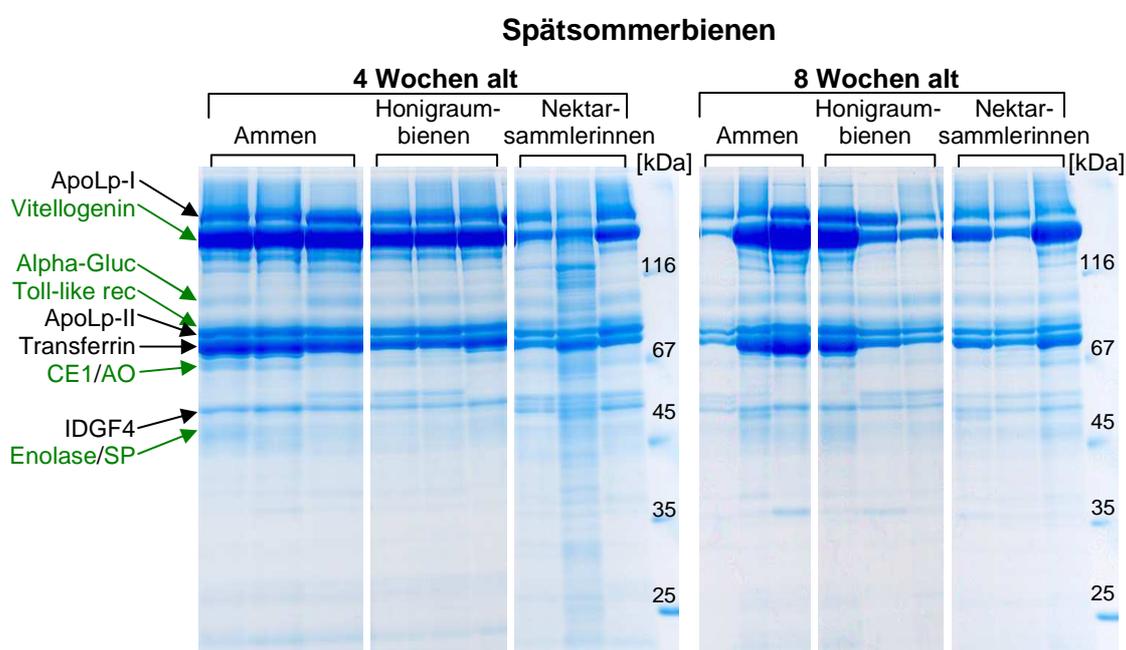
<sup>b</sup> das Vorhandensein eines Signalpeptides wurde mithilfe des Programms TargetP ermittelt, angegeben ist die Länge des Signalpeptides in Aminosäuren.

In Abb. 12 lässt sich erkennen, dass in Pollensammlerinnen neben den in Tabelle 28 aufgeführten Proteinen auch noch in großer Menge Vitellogenin vorhanden ist. Dieser Fund steht im Gegensatz zur bisherigen Annahme, dass ein reduzierter Vitellogenin-Titer der Auslöser für das Sammelverhalten und Verlassen des Stockes sei. Demzufolge sollten ältere Bienen nur noch wenig Vitellogenin vorweisen können (Guidugli et al., 2005).

#### **4.2.2. Das Hämolymp-Protetom verschiedener Arbeitsgruppen des Bienenvolkes und Veränderungen mit steigendem Alter**

Für diesen Versuch wurden frischgeschlüpfte Bienen desselben Stocks farblich markiert, wieder in den Stock eingesetzt und nach bestimmten Zeiträumen zur Hämolympheentnahme aus dem Stock gesammelt. Die 4 Wochen alten Bienen schlüpften Anfang Juli und die 8 Wochen alten Bienen Anfang Juni. Sie werden daher als Spätsommerbienen bezeichnet. Die Proben für diese Gele wurden Anfang September gesammelt. Ammen wurden während der Brutpflege abgesammelt, Honigraumbienen wurden direkt aus dem Honigraum gesammelt und Nektarsammlerinnen beim Einflug in den Stock abgefangen. Man erkennt am Hämolymp-Proteinmuster der 4 Wochen alten Bienen, dass es augenscheinlich keinen Unterschied gibt bei den Ammen und Honigraumbienen, den Gruppen also, die im Stockinneren ihrer Tätigkeit nachgehen. Nektarsammlerinnen zeigen jedoch größere individuelle Unterschiede und außerdem eine geringere Menge an manchen Proteinen in der Hämolymphe als ihre gleichaltrigen Innendienst-Kameradinnen, so z.B. auch an Vitellogenin. Betrachtet man nun 8 Wochen alte Bienen, die unterschiedlichen Tätigkeiten nachgehen, so verschwimmen die frühen eindeutigen Hämolymp-Proteinmuster und es treten mehr

individuelle Unterschiede zutage, sodass sich allein anhand des Proteinmusters keine Biene einer bestimmten Tätigkeit zuordnen ließe (Abb. 13). Wenige Tage vor Sammeln dieser Proben wurde der Stock auf die Anwesenheit der beiden markierten Gruppen (4 Wochen alte und 8 Wochen alte Bienen) überprüft. Von beiden Gruppen waren nur noch wenige Exemplare im Stock zu finden, was den Schluss zulässt, dass es sich bei beiden Gruppen noch um normale, nektarsammelnde und sterbende Spätsommerbienen handelte und noch kein Übergang zu Herbst- oder Winterbienen mit veränderter Physiologie stattfand. Ende November waren bei einer Durchsicht der Wintertraube keine Bienen dieser zwei Gruppen mehr zu finden.



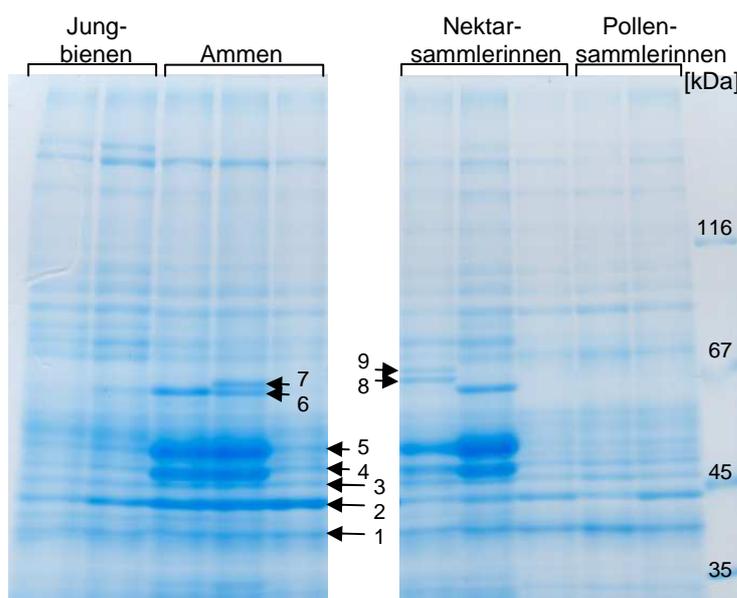
**Abb. 13: Vergleich des Hämolympf-Proteinmusters von unterschiedlich alten Bienen mit unterschiedlichen Aufgaben.**

Alle Bienen stammen von Stock 20. Die 4 Wochen alten Bienen schlüpfen am 8.7.2009 und die 8 Wochen alten Bienen am 11.6.2009. Am 28.8. waren von beiden Gruppen nur noch wenige Exemplare im Stock zu finden, die Proben für diese Gele wurden am 8.9.2009 gesammelt. Ammen wurden während der Brutpflege abgesammelt, Honigraumbienen wurden direkt aus dem Honigraum gesammelt und Nektarsammlerinnen beim Einflug in den Stock abgefangen. Je 1,2 µl Hämolymphe der Spätsommerbienen wurden auf die jeweilige Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen und anschließend im Laemmli-Puffersystem einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendete Längenstandards: Fermentas SM0431.

Grün markiert sind diejenigen Proteine, die in älteren Bienen exprimiert werden (s. Tabelle 28): Vitellogenin, Alpha-Gluc = Alpha-Glucosidase-II, Toll-like rec = Toll-like receptor 13-like, CE1 = Carboxylesterase1, AO = Aminooxidase, Enolase und SP = Serinprotease. Schwarz markiert sind die bekannten ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, Transferrin und IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4.

### 4.2.3. Proteinexpression in den Köpfen von Jungbienen, Ammenbienen, Nektar- und Pollensammlerinnen

In den Köpfen sitzen Drüsen, die in unterschiedlichen Phasen des Bienenlebens gebraucht werden. Die Hypopharynxdrüsen dienen der Futtersaftproduktion und sind daher bei Ammenbienen stark ausgeprägt. Die Labialdrüsen vergrößern sich erst einige Zeit nach dem Schlupf, manchmal erst zu Flugbeginn, sollten daher also vor allem in Flugbienen stark ausgeprägt sein. Die Mandibeldrüsen produzieren zur Ammenbienenzeit Bestandteile des Futtersaftes, später mit dem Übergang zu anderen Tätigkeiten produzieren die Mandibeldrüsen eine Flüssigkeit, die ein Alarmpheromon enthält (Nitschmann und Hüsing, 1987). Die Proteinmuster der Köpfe unterschiedlicher Arbeitsgruppen sollten sich daher leicht unterscheiden lassen. Allerdings tauchen in den Kopfextrakten jede Menge Proteine auf, die eine eindeutige Gruppenzuordnung erschweren (Abb. 14).



**Abb. 14: Gelelektrophoretische Analyse der Kopfextrakte von Arbeiterinnen.**

Je 5  $\mu$ l des jeweiligen Kopfextraktes einer einzelnen Biene wurden auf ein 8 % PAA/0,1 % SDS Gel aufgetragen und anschließend im Laemmli-Puffersystem einer Elektrophorese unterzogen. Die nachfolgende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431.

Interessante Proteinbanden (1-9) wurden ausgeschnitten und mittels nano-LC-ESI-MS/MS analysiert. Die gefundenen Proteine sind in Tabelle 29 aufgelistet.

Vor allem Ammenbienen zeigen ein markantes Proteinmuster, das allerdings ebenfalls in manchen Nektarsammlerinnen auftaucht. Eine Reihe an Proteinen unterschiedlichster Funktion, die aus der Sequenzierung einzelner interessanter Proteinbanden (Abb. 14 (1-9)) resultiert, zeigt Tabelle 29.

**Tabelle 29: Proteine in Kopfextrakten von Arbeiterinnen.\***

Nr.	Protein	Accession (NCBI)	Molekulare Masse (Da) <sup>a</sup>	SP <sup>b</sup>
1	<b>Arginine kinase lethal 1 G0156</b>	gi 58585146	40.008	-
		gi 48102814	39.135	-
2	<b>Actin-5</b>	gi 1168325	41.771	-
3	<b>Phosphoglycerate kinase</b>	gi 110763826	44.992	-
	<b>Probable citrate synthase 1, mitochondrial-like</b>	gi 66521738	51.930	-
	<b>Mitochondrial-processing peptidase subunit beta-like</b>	gi 66500205	53.349	M15
	<b>Isocitrate dehydrogenase</b>	gi 110764717	46.646	-
	<b>60S Ribosomal protein L4</b>	gi 66525285	48.367	-
4	<b>MRJP2 precursor</b>	gi 58585108	51.074	-
	<b>Elongation factor 1-alpha</b>	gi 62526112	50.310	-
	<b>Troponin T</b>	gi 78101798	48.206	-
	<b>ATP-Synthase</b>	gi 110762902	55.130	M39
	<b>6-phosphogluconate dehydrogenase</b>	gi 66547531	52.453	-
5	<b>MRJP1</b>	gi 58585098	48.886	S19
	<b>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</b>	gi 48100966	59.512	M8
	<b>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</b>	gi 66530423	55.686	M14
	<b>Cytosolic non-specific dipeptidase-like</b>	gi 66535742	54.252	-
	<b>Troponin T</b>	gi 78101798	48.206	-
	<b>Calreticulin</b>	gi 66545506	47.174	S18
	<b>MRJP7</b>	gi 62198227	50.541	S17
6	<b>MRJP3 Malic enzyme</b>	gi 56422035	65.696	S21
		gi 110761561	59.756	M15
7	<b>MRJP3 Transketolase</b>	gi 56422035	65.696	S21
		gi 110751363	67.411	-
8	<b>MRJP3</b>	gi 56422035	65.696	S21
9	<b>Phenoloxidase (52-693)</b>	gi 58585196	74.262	-
	<b>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial</b>	gi 66505480	72.462	M22
	<b>Protein ROP</b>	gi 66505531	66.592	-

\* eine ausführlichere Tabelle befindet sich im Anhang als Tabelle S29.

<sup>a</sup> die molekulare Masse wurde mithilfe des Programms ProtParam errechnet.

<sup>b</sup> das Vorhandensein eines Signalpeptides wurde mithilfe des Programms TargetP ermittelt, ein S zeigt an, dass das Protein sekretiert wird, ein M zeigt an, dass es für die Mitochondrien bestimmt ist, die Zahl danach gibt die Länge des Signalpeptides in Aminosäuren an.

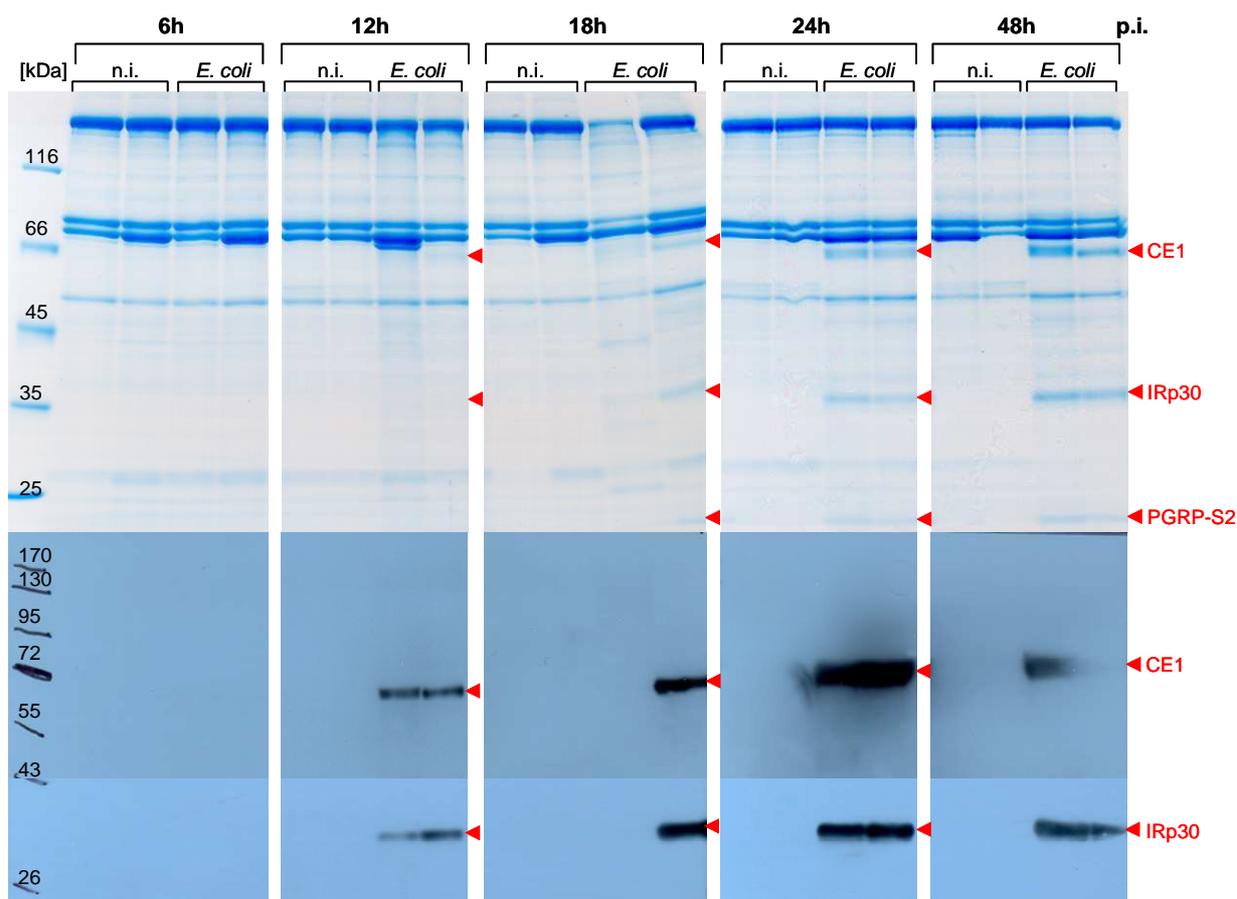
### **4.3. Expression der immunspezifischen Proteine IRp30 und Carboxylesterase1 (CE1)**

Kommen wir nun nach Betrachtung der allgemeinen Unterschiede der Hämolymp-Proteinmuster unterschiedlich spezialisierter Bienen zurück auf die Untersuchung der Immunantwort. Die interessantesten Proteine, die im Zuge der humoralen Immunantwort bei adulten Bienen induziert werden, sind das Immune-Responsive protein 30 (IRp30) und die Carboxylesterase1 (CE1) (Abb. 6 und 11B). IRp30 ist ein Protein unbekannter Funktion weswegen es in den Datenbanken als Hypothetisches Protein (HP) bezeichnet wird. Durch seine berechnete Größe von 30 kDa wurde es bis vor kurzem als HP30 bezeichnet (Randolt et al., 2008). Mehrere Indizien sprechen aber dafür, dass beide Proteine eine Rolle in der Immunantwort spielen, weswegen HP30 in IRp30 umbenannt wurde (Albert et al., 2011).

#### **4.3.1. Der zeitliche Verlauf der Expression von IRp30 und CE1 in Jungbienen**

Obwohl die Expression von IRp30 und CE1 von verschiedenen Elizitoren induziert werden kann (Abb. 11B), wurden für alle nachfolgenden Experimente lebende *E. coli*-Zellen verwendet, da sie insgesamt zur stärksten Immunantwort führen (Abb. 11A). Neben der Frage nach der allgemeinen Induzierbarkeit von IRp30 und CE1 war es außerdem interessant zu klären, ab welchem Zeitpunkt Carboxylesterase1 und IRp30 in der Hämolymphe auftauchen. Dafür wurden Jungbienen lebende *E. coli*-Zellen injiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion Hämolympproben entnommen (Abb. 15).

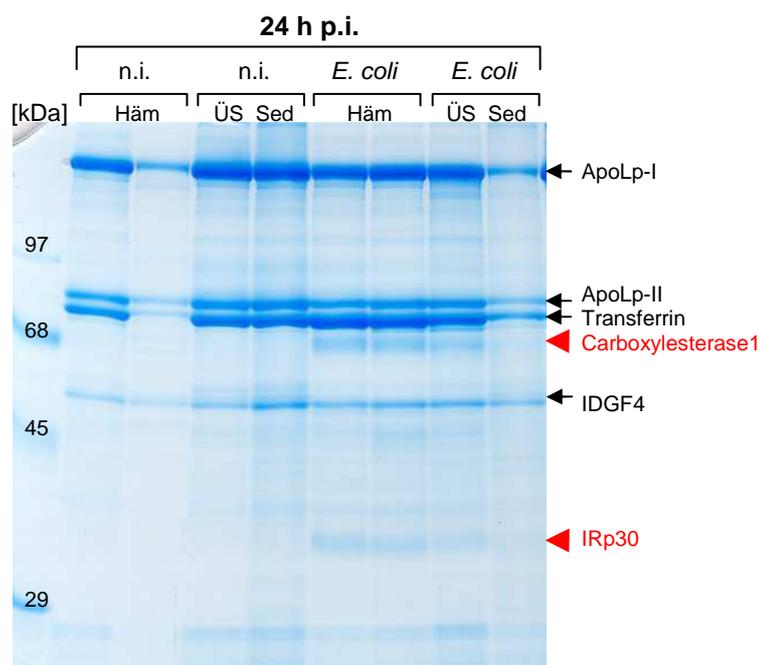
Sollten Carboxylesterase1 und IRp30, ausgelöst durch die Injektion, ganz normal exprimiert werden, so sollten die beiden Proteine zwischen 6 h und 12 h p.i. im Gel sichtbar werden. Bei induzierten AMPs ist das der Fall. Sollten die beiden Proteine allerdings irgendwo im Körper in einer inaktiven Vorläuferform gespeichert sein, wie z.B. die Prophenoloxidase, so sollten die beiden Proteine schon viel früher nachweisbar sein. Anhand der Zeitreihe lässt sich schon auf dem Gel erahnen, dass zwischen 6 h und 12 h p.i. die Expression von IRp30 und Carboxylesterase1 beginnt. Dieses Ergebnis wird zum Einen im Western-Blot bestätigt, zum Anderen wurden nach Injektion von *E. coli* erhöhte mRNA Level von IRp30 gefunden, was ebenfalls ein Zeichen dafür ist, dass IRp30 erst nach Injektion exprimiert und nicht irgendwo gelagert und dann aktiviert wird (Albert et al., 2011). Im Western-Blot (Abb. 15) erkennt man zudem eine zeitgleiche Expression der beiden Proteine IRp30 und CE1, die ihren Höhepunkt bei ca. 24 h p.i. findet und auch die nächsten Stunden noch auf nahezu gleich hohem Niveau bleibt. Als Zusatzinformation lässt sich dem Gel noch entnehmen, dass auch die Expression des Peptidoglycan Recognition Protein-S2 ca. 12 h p.i. beginnt und allmählich zunimmt.



**Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der Expression von IRp30 und CE1 in Jungbienen nach *E. coli* Infektion.** n.i.: nicht-infiziert und *E. coli* = Injektion von  $10^5$  Zellen *E. coli* 682. Die Hämolympfproben wurden 6 h, 12 h, 18 h, 24 h und 48 h p.i. entnommen. Die Jungbienen waren dabei 2-3 d alt. Je 1,3  $\mu$ l Hämolymphe der Jungbienen wurden auf die jeweilige Spur von zwei parallel laufenden 10 % PAA/0,1 % SDS Gelen aufgetragen und anschließend im Laemmli-Puffersystem einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung des einen Gels erfolgte mit Coomassie Blau G250. Mit dem anderen Gel wurde ein Western-Blot durchgeführt. Verwendete Längenstandards: Fermentas SM0431 beim Gel und Fermentas SM0671 beim Blot. Rot markiert: CE = Carboxylesterase1, IRp30 = Immune-Responsive protein 30 und PGRP-S2 = Peptidoglycan Recognition Protein-S2.

#### 4.3.2. Wo wird IRp30 exprimiert?

Eine interessante Frage bezüglich IRp30 ist auch Frage nach dem Ort seiner Expression. Das Gleiche gilt für Carboxylesterase1. Es stehen verschiedene Organe/Gewebe, aber auch Hämocyten zur Auswahl. Ob es in Hämocyten exprimiert und dann in die Hämolymphe abgegeben wird, lässt sich in einem einfachen Experiment klären. Die abgenommenen Hämolympfproben infizierter und nicht-infizierter Individuen werden direkt nach der Abnahme zentrifugiert und so die Hämocyten sedimentiert. Überstand und Sediment werden anschließend gelelektrophoretisch analysiert und man kann dann nachweisen ob IRp30 und Carboxylesterase1 vermehrt im Sediment, und damit in den Hämocyten, oder im Überstand zu finden sind. In Abb. 16 kann man eindeutig erkennen, dass keines der beiden Proteine im Sediment auftaucht. Was zumindest die Hämocyten als Ort der Synthese ausschließt.



**Abb. 16: Fraktionierung der Hämolymphe von Jungbienen nach *E. coli* Infektion.**

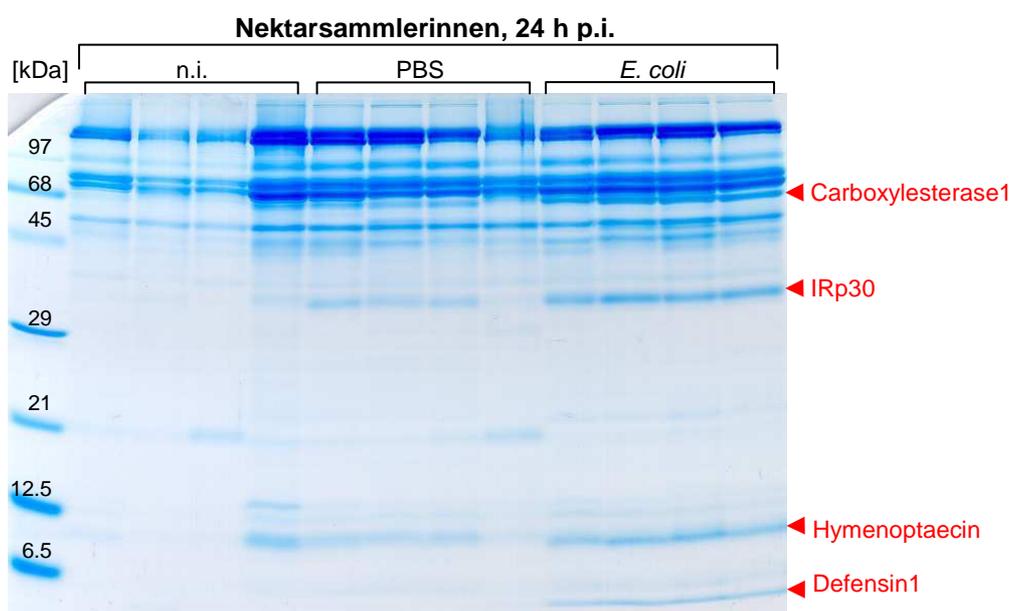
n.i.: nicht-infiziert und *E. coli*: Injektion von  $10^5$  Zellen *E. coli* 682. Alle Proben wurden 24 h p.i. entnommen. Die normalen Hämolympfproben (Häm) stammen von einzelnen Individuen. Für die Proben der Überstände (ÜS) und Sedimente (Sed) wurde die Hämolymphe von jeweils 5 Bienen vereinigt und direkt im Anschluss für 15 min bei 12.000 Upm zentrifugiert. Auf die jeweilige Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) wurden je 1,3  $\mu$ l der Häm- und ÜS-Proben und je 6  $\mu$ l der Sediment-Proben, die zuvor in 15  $\mu$ l 2xSP in Lösung gebracht wurden, aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Serva 39208.01.

ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, IDGF4 = Imaginal-Disc Growth Factor 4. Die roten Pfeile zeigen die Induktion der Carboxylesterase1 und des Immune-Responsive protein 30 (IRp30).

#### 4.3.3. Expression von immunspezifischen Proteinen in Sammel- und Winterbienen

Dass die Expression von IRp30 und Carboxylesterase1 durch verschiedene Arten von Elizitoren induziert werden kann, dass sie innerhalb von 6-12 h p.i. beginnt und Hämocyten als Ort der Synthese ausgeschlossen werden können, wurde in Experimenten mit Jungbienen herausgefunden. Jungbienen haben den klaren Vorteil, dass sie sehr einfach in großen Mengen mit einem Alter von max. 24 h zu erhalten sind. Man muss lediglich eine verdeckelte Wabe, auf der einzelne Bienen schon anfangen zu schlüpfen, in den Brutschrank stellen und hat dann am darauffolgenden Tag die gewünschten Jungbienen. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass diese sehr jungen Bienen noch keine individuellen Unterschiede in ihren Hämolympf-Proteinmustern aufweisen. Diese bilden sich erst mit steigendem Alter und unterschiedlicher Tätigkeit heraus.

Jedoch ist es genauso von Interesse herauszufinden, ob ältere Bienen ebenfalls IRp30 und Carboxylesterase1 exprimieren, zwei Proteine bei denen davon ausgegangen werden kann, dass sie Bestandteil der Immunantwort sind. Bis jetzt geht man in der Literatur davon aus, dass ältere Bienen eine reduzierte zelluläre Immunantwort zeigen (Amdam et al., 2004b). Um eine Auswirkung des Alters auf die anderen Komponenten des Immunsystems zu überprüfen, wurden die zwei ältesten Gruppen eines Bienenjahres untersucht. Im Sommer sind das Sammlerinnen, in diesem Fall Nektarsammlerinnen, im Winter sind das Winterbienen. Abb. 17 zeigt die deutliche Immunantwort der Nektarsammlerinnen auf *E. coli* Injektion.



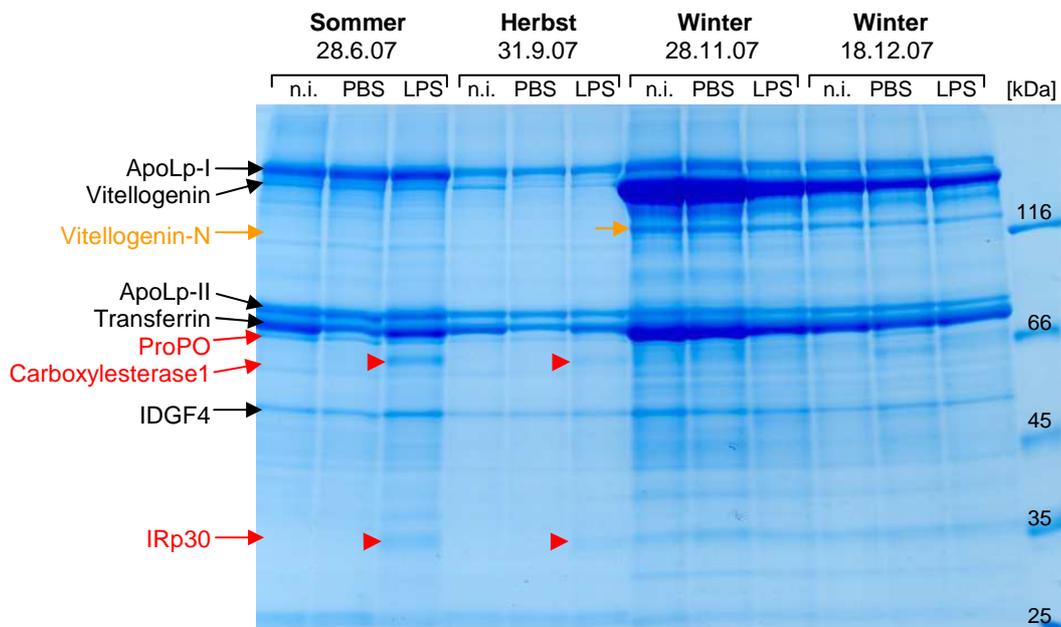
**Abb. 17: Induktion von IRp30 und Carboxylesterase1 in Nektarsammlerinnen.**

n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, *E. coli*: Injektion von  $10^4$  Zellen *E. coli* 682. Alle Hämolympfproben wurden 24 h p.i. entnommen. Je 1,3 µl Hämolymphe der Jungbienen wurden auf die jeweilige Spur eines 15 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendete Längenstandards: Serva 39208.01 und 39209.01.

Die roten Pfeile zeigen die Induktion der Carboxylesterase1, des Immune-Responsive protein 30 (IRp30) und der AMPs Hymenoptaecin und Defensin1.

Auffällig ist, dass Nektarsammlerinnen schon auf bloße Verwundung (Injektion von PBS) mit der Expression von Carboxylesterase1, IRp30 und Hymenoptaecin reagieren, wenn auch noch etwas schwach. Die Injektion lebender *E. coli*-Zellen führt zu einer deutlich stärkeren Expression der beiden hochmolekularen Proteine und Hymenoptaecin. Einzig nach Injektion von *E. coli* wird zudem Defensin1 exprimiert. Es ist also eindeutig, dass auch ältere Bienen eine Immunreaktion aufweisen.

Was ist aber mit richtig alten Bienen? Mehrere Wochen oder gar Monate alten Bienen, die zudem eine andersartige Physiologie aufweisen? Abb. 18 zeigt anschaulich wie sich die Zusammensetzung des Hämolymp-Protoms mit dem Wechsel der Jahreszeiten ändert. Es muss an dieser Stelle betont werden, dass sich nicht das Hämolymp-Protom einzelner Bienen ändert, sondern das Hämolymp-Protom des Superorganismus Bienenvolk.



**Abb. 18: Jahreszeitliche Änderungen im Hämolymp-Proteinmuster von Arbeiterinnen.**

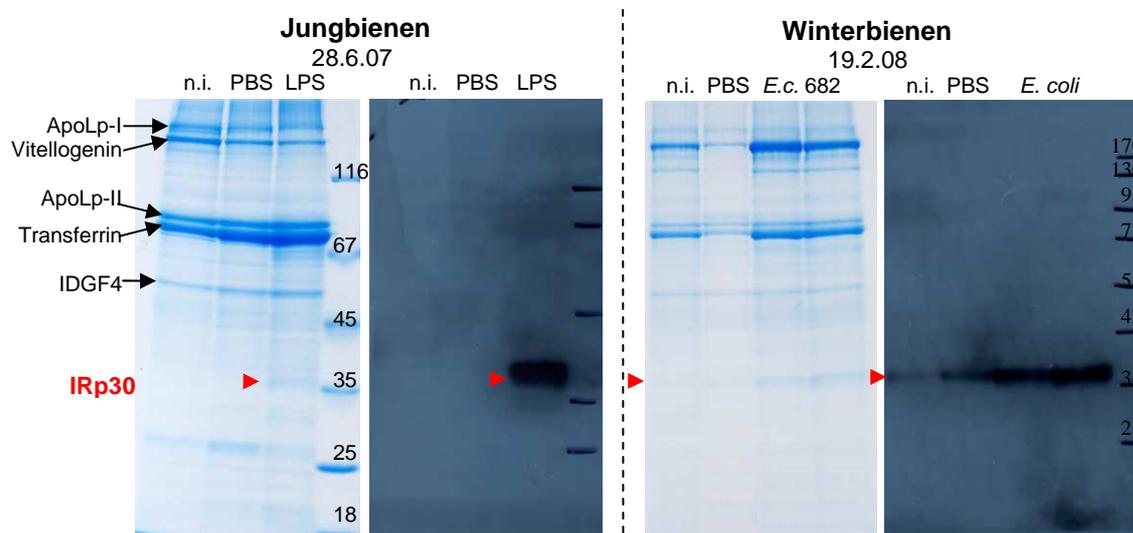
n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, LPS: Injektion von 0,5 µg Lipopolysaccharid, Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien. Alle Hämolympproben wurden 24 h p.i. entnommen. Die Sommer- und Herbstbienen waren dabei 2-3 d alt, da sie bei der Injektion frischgeschlüpft waren, die Individuen der zwei Winterbienen Gruppen waren dabei mehrere Wochen bis mehrere Monate alt, da sie direkt aus der Wintertraube abgesammelt wurden. Je 1 µl Hämolymphe der Sommerbienen, 0,6 µl Hämolymphe der Herbstbienen und je 0,3 µl Hämolymphe der Winterbienen der beiden Gruppen wurden auf die jeweilige Spur eines 9 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen und anschließend im Laemmli-Puffersystem einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431.

Konstitutiv in der Hämolymphe vorhandene Proteine sind schwarz oder orange markiert. ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, Vitellogenin = Vorläufer von Vitellogenin-N, Vitellogenin-N = N-terminaler Teil von Vitellogenin, IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4. Nach der Injektion von LPS transient exprimierte Proteine sind rot markiert. ProPO = Prophenoloxidase, Carboxylesterase1 und IRp30 = Immune-Responsive protein 30.

Auffällig in Winterbienen ist die große Menge an Vitellogenin, vor allem wenn man bedenkt, dass nur ca. 1/3 der Menge an Hämolymphe aufgetragen wurde wie bei Sommerbienen. Vitellogenin ist ein echtes Speicherprotein, welches unterschiedliche metabolische Zwecke erfüllen kann. In Winterbienen ist es wohl hauptverantwortlich für deren Langlebigkeit (Amdam und Omholt, 2002). Zusätzlich zu Vitellogenin taucht in Winterbienen ein spezifischer N-terminaler Teil des Vitellogenins auf, hier als Vitellogenin-N bezeichnet (Abb. 19). Über seine Bedeutung für Winterbienen kann nur spekuliert werden. Vitellogenin selbst



geringer Menge bereits konstitutiv in der Hämolymphe vorhanden. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde ein Western-Blot durchgeführt (Abb. 20).



**Abb. 20: Expression von IRp30 in Jungbienen und Winterbienen.**

n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, LPS: Injektion von 0,5 µg Lipopolysaccharid, Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien und *E. coli* = Injektion von  $10^4$  (linke Spur) und  $10^5$  (rechte Spur) Zellen *E. coli* 682. Alle Hämolympfproben wurden 24 h p.i. entnommen. Die Jungbienen waren dabei 2-3 d alt, da sie bei der Injektion frischgeschlüpft waren, die Winterbienen waren dabei mehrere Wochen alt, da sie direkt aus der Wintertraube abgesammelt wurden. Je 1 µl Hämolymphe der Jungbienen und 0,3 µl Hämolymphe der Winterbienen wurden auf die jeweilige Spur von zwei parallel laufenden 10 % PAA/0,1 % SDS Gelen aufgetragen und anschließend im Laemmli-Puffersystem einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung des einen Gels erfolgte mit Coomassie Blau G250. Mit dem anderen Gel wurde ein Western-Blot durchgeführt. Verwendete Längenstandards: Fermentas SM0431 beim Gel, Bio-Rad 161-0318 und Fermentas SM0671 beim Blot.

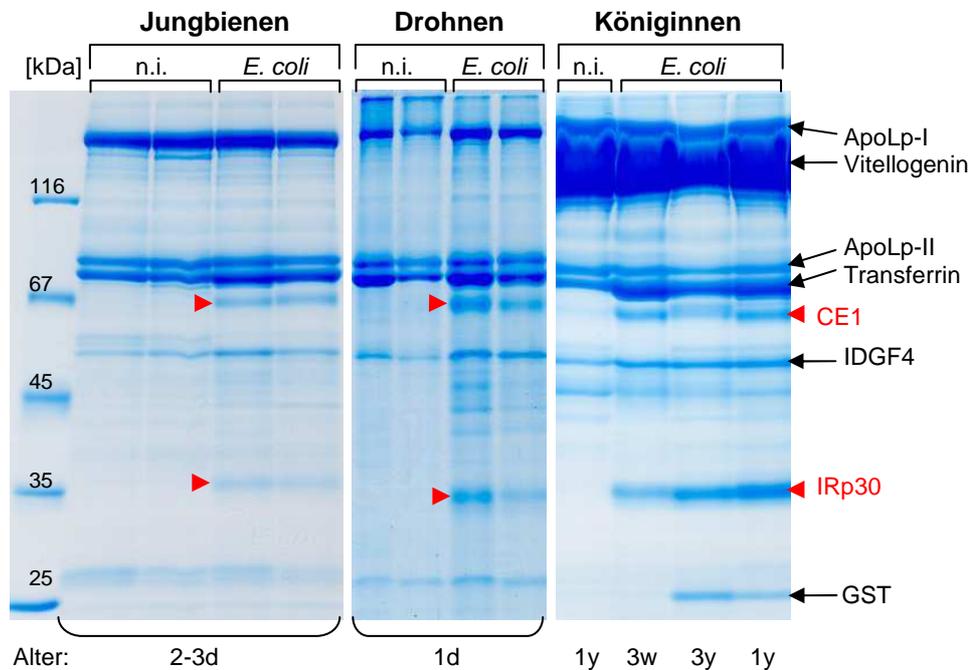
ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4. Rot markiert: IRp30 = Immune-Responsive protein 30.

Das Ergebnis des Western-Blots ist eindeutig: während in Jungbienen IRp30 erst nach Injektion des Elizitors stark exprimiert wird, so ist IRp30 auch schon in nicht-infizierten Winterbienen konstitutiv in geringen Mengen vorhanden. Allerdings kann auch in Winterbienen die Expression durch Injektion eines Elizitors noch deutlich verstärkt werden.

#### 4.3.4. Kastenübergreifende Expression von IRp30 und CE1

Ein Bienenvolk besteht aber nicht nur aus mehreren Tausend Arbeiterinnen, sondern auch aus einer Königin, die zur Hälfte mit allen Arbeiterinnen des Volkes verwandt ist und zudem besteht es in der fortpflanzungsfähigen Zeit auch aus jeder Menge Drohnen, den männlichen Bienen, die ihr Erbgut an die nächste Generation weitergeben wollen. Wenn die Carboxylesterase1 und IRp30 Teil einer allgemeinen Immunantwort der Honigbiene sind,

dann müssen sie auch in diesen beiden Kasten exprimiert werden. Um das zu prüfen wurden frischgeschlüpften Drohnen und unterschiedlich alten Königinnen lebende *E. coli*-Zellen injiziert. Das resultierende Hämolymp-Proteinmuster findet sich in Abb. 21.



**Abb. 21: Kastenübergreifende Expression von IRp30 und CE1.**

n.i.: nicht-infiziert und *E. coli* = Injektion von  $10^4$  Zellen *E. coli* 682. Alle Hämolympfproben wurden 24 h p.i. entnommen. Die Jungbienen waren dabei 2-3 Tage alt, die Drohnen 1 Tag und die Königinnen waren von links nach rechts 1 Jahr, 3 Wochen, 3 Jahre und 1 Jahr alt. Je 1  $\mu$ l Hämolymphe der Jungbienen, 0,3  $\mu$ l Hämolymphe der Drohnen (H. Gättschenberger) und 1  $\mu$ l Hämolymphe der Königinnen wurden auf die jeweilige Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen und anschließend im Laemmli-Puffersystem einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431.

Auffällige Proteine in Königinnen: Vitellogenin und Glutathione S-Transferase (GST). Durch *E. coli* Infektion induzierte Proteine sind rot markiert: CE1 = Carboxylesterase1 und IRp30 = Immune-Responsive protein 30.

Bis auf die großen Mengen an Vitellogenin in Königinnen unterscheiden sich die Hämolymp-Proteinmuster der drei Kasten nicht sehr stark voneinander. Wichtig ist zu bemerken, dass sowohl Drohnen als auch Königinnen auf die Injektion des Elizitors mit der Expression von IRp30 und Carboxylesterase1 reagieren.

#### **4.4. Zelluläre Immunantwort**

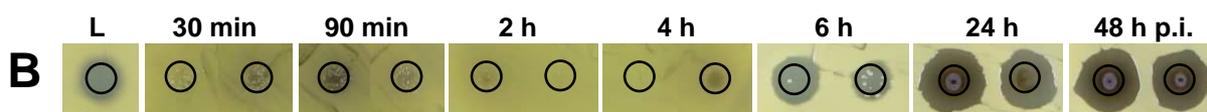
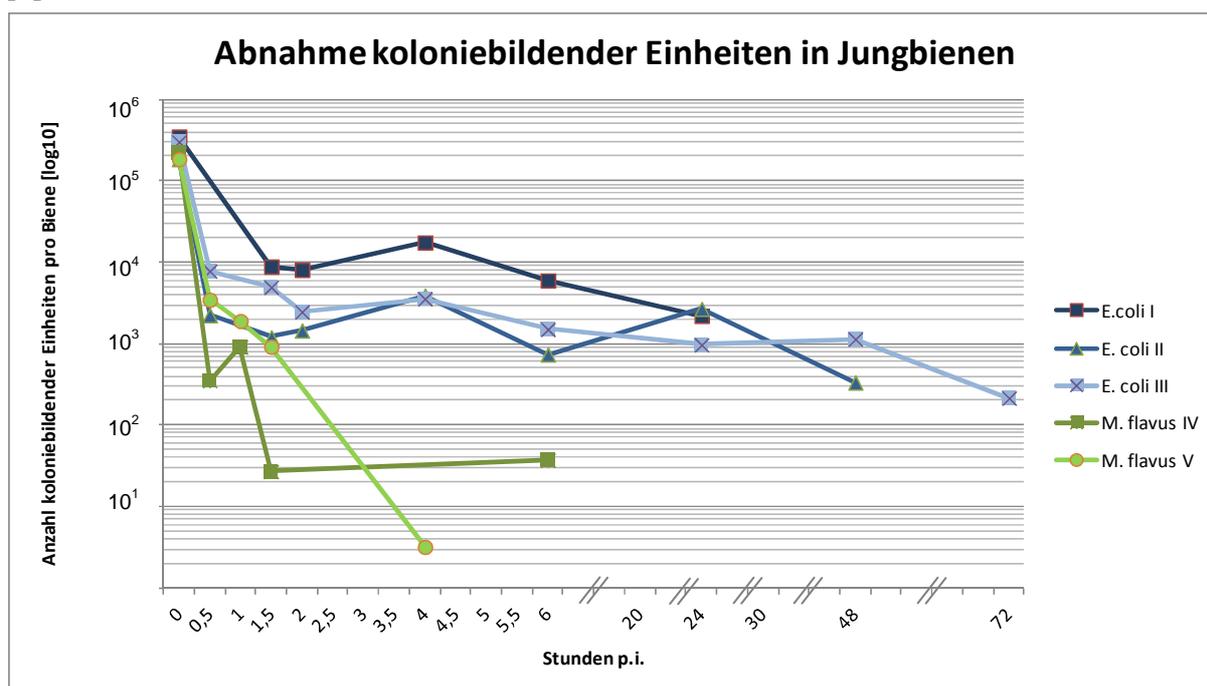
Bis jetzt wurde nur die humorale Komponente des angeborenen Immunsystems betrachtet: exprimierte AMPs, ein neu entdecktes Protein (IRp30) und ein Enzym (Carboxylesterase1), das zwar schon länger bekannt ist, dem aber in dieser Arbeit eine neue Bedeutung zugeschrieben wird. Aber auch die zelluläre Immunantwort ist eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems, das einige Überraschungen bereithält. Eventuell ist Phagozytose für die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse verantwortlich.

##### **4.4.1. Abnahme bakterieller, koloniebildender Einheiten in Jungbienen**

Injiziert man eine bestimmte Anzahl gram-positiver oder gram-negativer Bakterien in Jungbienen, so wird diese Anzahl schon innerhalb weniger Stunden drastisch um zwei Zehnerpotenzen reduziert, d.h. von ca.  $3 \times 10^5$  auf ca.  $5 \times 10^3$  Zellen pro Biene. Auffällig ist, dass die Zahl lebender *M. flavus*-Zellen in der Hämolymphe deutlich rascher abnimmt als die Zahl lebender *E. coli*-Zellen (Abb. 22A).

Gegen eine Eliminierung dieser Bakterien durch antimikrobielle Peptide spricht die Tatsache, dass AMPs frühestens 6 h nach Injektion in der Hämolymphe der Jungbienen erscheinen (Abb. 9). Dies wird ebenfalls in einem Hemmhof-Test mit Hämolympfproben derselben Jungbienen veranschaulicht, bei denen auch die Abnahme der koloniebildenden Einheiten ermittelt wurde (Abb. 22B).

A



**Abb. 22: Abnahme der Anzahl koloniebildender Einheiten in Jungbienen.**

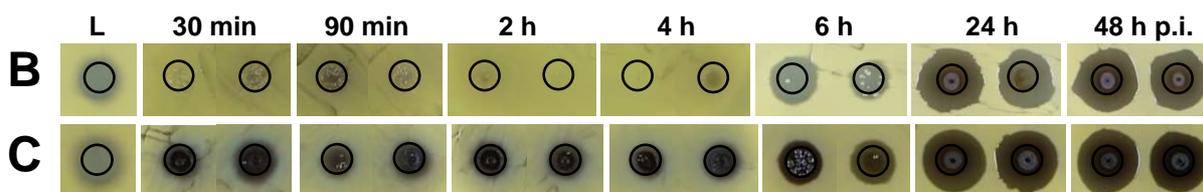
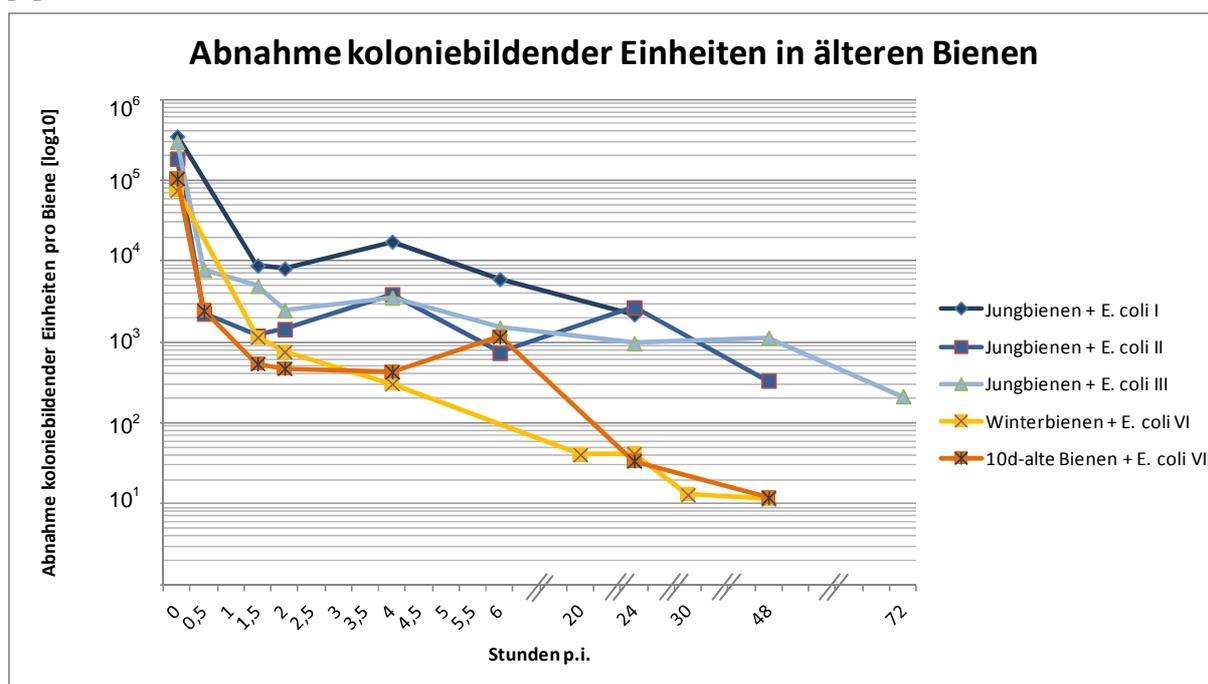
(A) Vergleich der Abnahme koloniebildender Einheiten von *E. coli* (blau) und *M. flavus* (grün) in Jungbienen. Es wurden jeder Biene ca.  $10^5$  Zellen lebende *E. coli* oder lebende *M. flavus* injiziert. Nach bestimmten Zeiten wurde die Hämolymphe entnommen und eine definierte Menge auf Agarplatten aufgetragen. Die Platten inkubierten bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt.

(B) Hemmhof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten in der Hämolymphe *E. coli*-injizierter Individuen (Versuchsreihe *E. coli* III). Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *M. flavus*. 1,5 µl der Hämolympfproben wurden aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Hemmhof von 1,5 µl Lysozym (L, 10 mg/ml) dient als Kontrolle.

#### 4.4.2. Abnahme bakterieller, koloniebildender Einheiten in älteren Bienen

Wie in Kap. 4.3.3. beschrieben, gibt es Unterschiede zwischen der Immunantwort von frischgeschlüpften Jungbienen und älteren Bienen. Genauso wird auch hier ein Unterschied in der Abnahme der Anzahl lebender *E. coli*-Zellen erwartet. Betrachtet man Abb. 23A, so erkennt man, dass in älteren Bienen die Anzahl an *E. coli*-Zellen in der Hämolymphe deutlich rascher und stärker abfällt als in frischgeschlüpften Bienen. Ebenso wie bei Jungbienen (Abb. 23B) erscheinen auch bei 10d-alten Bienen die ersten Hemmhöfe erst nach 6 h (Abb. 23C). Die auffällige Braunfärbung der Auftropfstellen ist ein Phänomen, das sehr häufig bei Hämolympfproben von älteren Bienen auftritt und sollte nicht mit einem echten Hemmhof verwechselt werden.

A



**Abb. 23: Abnahme der Anzahl koloniebildender Einheiten in älteren Bienen.**

(A) Vergleich der Abnahme der Anzahl koloniebildender Einheiten von *E. coli* in Jungbienen (blau) und älteren Bienen (orange). Es wurden jeder Biene ca.  $10^5$  Zellen lebende *E. coli* injiziert. Nach bestimmten Zeiten wurde die Hämolymphe entnommen und eine definierte Menge auf Agarplatten aufgetragen. Die Platten inkubierten bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt.

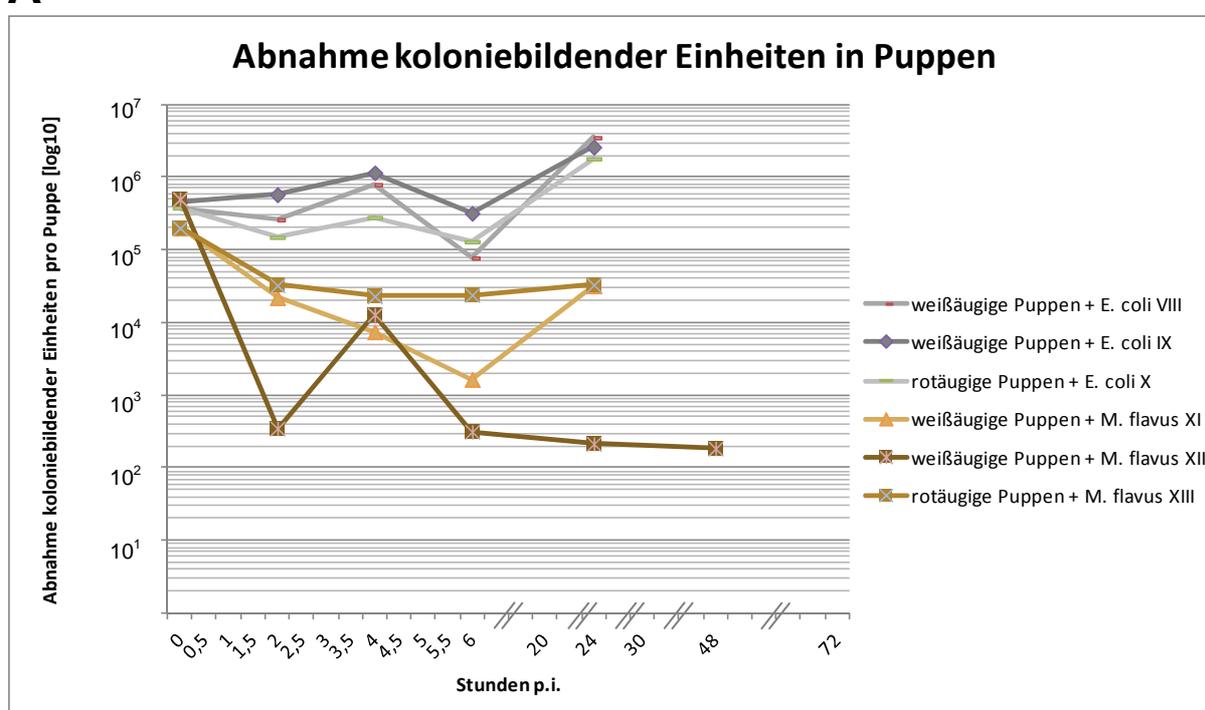
(B) Hemmhof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten in der Hämolymphe von Jungbienen (Versuchsreihe *E. coli* III) (C) Hemmhof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten in der Hämolymphe von 10d-alten Bienen (Versuchsreihe *E. coli* VII). Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *M. flavus*. 1,5 µl der Hämolympfproben wurden aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Hemmhof von 1,5 µl Lysozym (L, 10 mg/ml) dient als Kontrolle.

#### 4.4.3. Puppen reagieren anders als adulte Bienen auf Bakterieninfektion

Noch interessanter als die Abnahme an koloniebildenden Einheiten in Jungbienen und älteren Bienen sind die Ergebnisse, die man erhält, wenn man *E. coli* oder *M. flavus* in Puppen injiziert. Wie vorangehend gezeigt, kommt es nach Injektion von *E. coli* in Puppen innerhalb von 24 h zu keiner oder nur zu einer sehr schwach ausgeprägten humoralen Immunantwort in Form von exprimierten AMPs (Abb. 8). Injiziert man nun Bakterien in Puppen und verfolgt die Abnahme an koloniebildenden Einheiten in der Hämolymphe (Abb. 24A), so erkennt man auf den ersten Blick, dass es zu keiner oder keiner starken Abnahme kommt. In Puppen,

denen lebende *E. coli*-Zellen injiziert wurden, kommt es sogar offensichtlich noch zu einer Zunahme. Die *E. coli*-Zellen scheinen sich in den Puppen zu vermehren. Lediglich nach der Injektion von *M. flavus*-Zellen kommt es zu einer anfänglichen Abnahme an koloniebildenden Einheiten, die jedoch in den meisten Fällen bald stagniert. Führt man mit der Hämolymphe dieser Puppen einen Hemmhof-Test durch, so erscheinen in keinem Fall Hemmhöfe. Interessanterweise tauchen aber vor allem bei den Puppen, denen lebende *E. coli*-Zellen injiziert wurden, jede Menge kleine, graue Kolonien an den Stellen auf, an denen die Hämolymphe aufgetropft wurde (Abb. 24B).

A



B



**Abb. 24: Abnahme der Anzahl koloniebildender Einheiten in Puppen.**

(A) Abnahme von *E. coli*-Zellen in Puppen (grau) und *M. flavus*-Zellen in Puppen (braun). Es wurden jeder Puppe ca.  $10^5$  Zellen lebende *E. coli* oder *M. flavus* injiziert. Nach bestimmten Zeiten wurde die Hämolymphe entnommen und eine definierte Menge auf Agarplatten aufgetragen. Die Platten inkubierten bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt.

(B) Hemmhof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten in der Hämolymphe *E. coli*-injizierter Puppen (Versuchsreihe *E. coli* VIII). Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtkultur von *M. flavus*. 1,5 µl der Hämolympfproben wurden aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Hemmhof von 1,5 µl Lysozym (L, 10 mg/ml) dient als Kontrolle.

Auch das äußere Erscheinungsbild der Puppen ist auffällig. Am Tag der Injektion werden die zu injizierenden weißäugigen Puppen frisch abgesammelt. Alle sehen gleich aus (Abb. 25).



Abb. 25: Weißäugige Puppen vor der Injektion.

Doch schon 24 h später erscheinen die Puppen, denen *E. coli*-Zellen injiziert wurden, grünlich (Abb. 26). Beobachtet man die Puppen noch über die nächsten Tage, so wird deutlich, dass anscheinend bei beiden Gruppen die Entwicklung zunächst weitergeht, erkennbar an der beginnenden Melanisierung der Augen. Jedoch wird auch deutlich, dass die Puppen, denen *E. coli*-Zellen injiziert wurden, ungefähr 72 h nach Injektion in ihrer Entwicklung stehenbleiben, da sich die Augen nicht so stark dunkelrot färben, wie es bei der nicht-injizierten Kontrollgruppe der Fall ist. Das deckt sich mit der Erfahrung, dass die Puppen ab Tag 3 (72 h p.i.) äußerst schlapp werden, d.h. ihr Turgor stark abfällt.



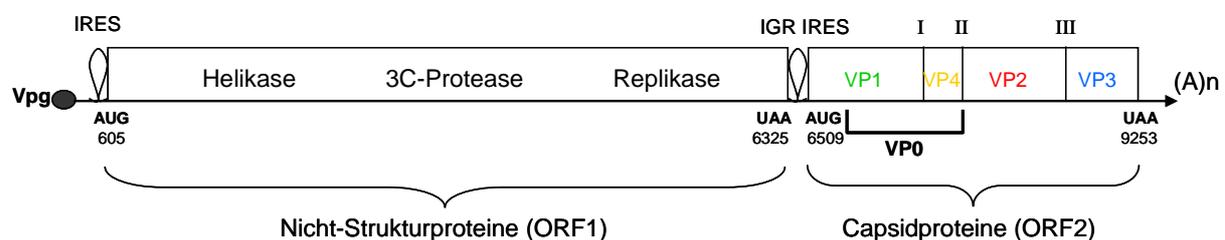
Abb. 26: Äußeres Erscheinungsbild von Puppen nach Injektion von *E. coli*-Zellen.

Vergleich von nicht-infizierten Individuen (n.i.) und solche, denen  $10^5$  lebende *E. coli*-Zellen injiziert wurden 1 d (24 h), 2 d (48 h), 3 d (72 h) und 4 d (96 h) p.i.

## 4.5. Merkmale der verwendeten Akuten Bienen Paralyse Virus (ABPV) - Suspension

### 4.5.1. Organisation und Prozessierung der Capsidproteine

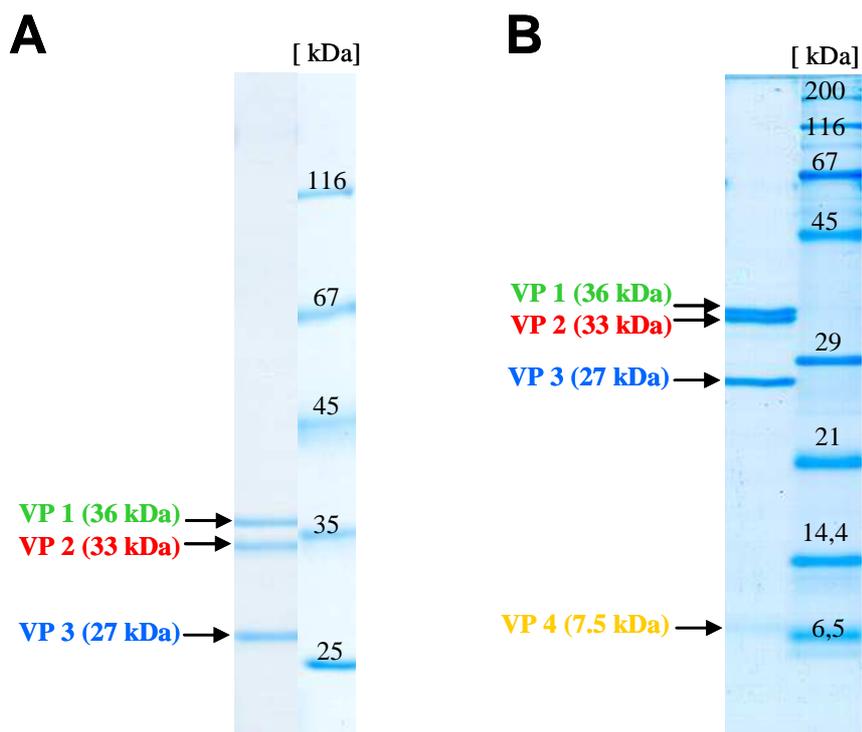
Das Akute Bienen Paralyse Virus (ABPV) hat vor allem mit der Verbreitung von *Varroa* wesentlich an Bedeutung als Pathogen gewonnen (Genersch und Aubert, 2010). Es besitzt ein dicistronisches, positiv-einzelsträngiges RNA Genom, dessen erstes offenes Leseraster (ORF1) für die Nicht-Strukturproteine codiert, während das zweite offene Leseraster (ORF2) für die viralen Capsidproteine (VP) codiert (Abb. 27).



**Abb. 27: Schematische Darstellung des dicistronischen Genomaufbaus von ABPV.**

Das offene Leseraster am 5'-Ende (ORF1) codiert für die Nicht-Strukturproteine, während ORF2 am 3'-Ende für die Capsidproteine (VP) 1-4 codiert. Die Schnittstellen sind mit I, II und III bezeichnet. VP1 und VP4 werden als VP0 erst spät prozessiert. Die beiden ORFs sind durch eine Intergenomische Region (IGR) voneinander getrennt. Vor Beginn jedes ORF befindet sich eine Interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES). Die Start und Stoppcodons der beiden ORFs sind an den von Govan et al. (2000) beschriebenen Positionen eingezeichnet

Beide offenen Leseraster werden als je ein Polyprotein translatiert und anschließend prozessiert. VP 1 und VP 4 werden erst kurz vor Zusammenbau des Virions prozessiert und sind daher im Wirt lange gemeinsam als Vorläuferprotein VP 0 zu finden (Abb. 34). Da VP 0 in einer gelelektrophoretischen Analyse der verwendeten ABPV-Suspension nicht zu finden ist, kann man davon ausgehen, dass darin nur reife Partikel enthalten sind. Dafür lassen sich wiederum VP 1 und VP 4, die im Hämolymp-Proteinmuster infizierter Individuen nicht zu finden sind, gut voneinander unterscheiden (Abb. 28A, B). Die Capsidproteine VP 2 und VP 3 findet man sowohl in gelelektrophoretischen Analysen der verwendeten ABPV-Suspension, als auch in Hämolympproben infizierter Individuen. Die hier errechneten Größen der Capsidproteine weichen mit VP 1 = 36 kDa, VP 2 = 33 kDa, VP 3 = 27 kDa und VP 4 = 7,5 kDa leicht von den in der Literatur (Govan et al., 2000) angegebenen Werten von 35 kDa, 33 kDa, 24 kDa und 9,4 kDa ab.

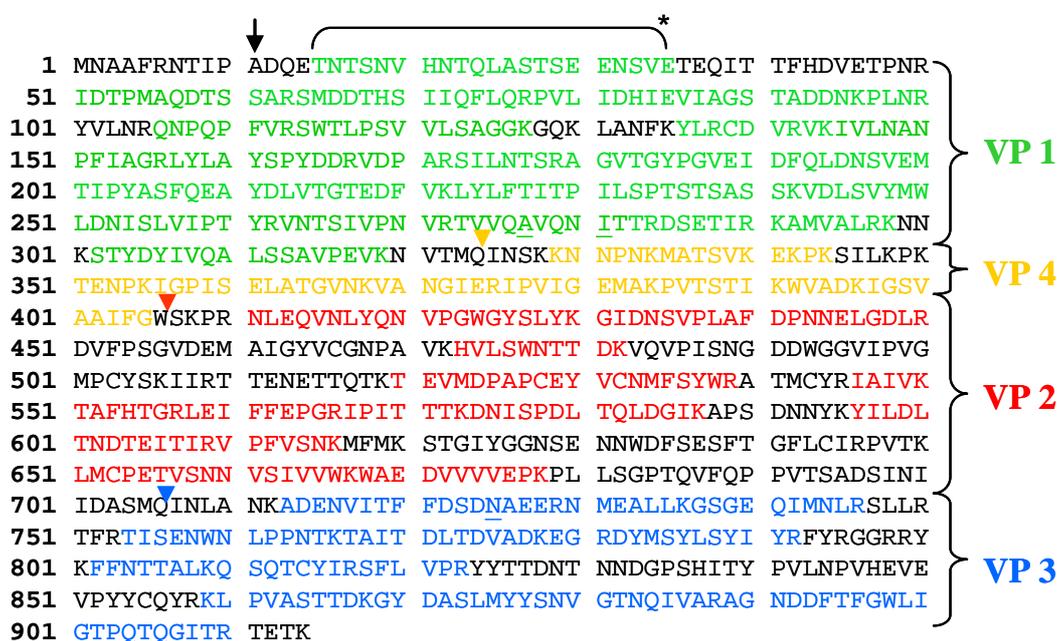


**Abb. 28: Gelelektrophoretische Analyse der ABPV-Suspension.**

(A) Capsidproteine auf einem 10 % PAA/0,1 % SDS Gel (Laemmli-Puffersystem), anschließende Färbung mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431. (B) Capsidproteine auf einem 15 % PAA/0,1 % SDS Gel (Laemmli-Puffersystem), anschließende Färbung mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Serva 39215.01.

Aus verschiedenen Gelen wurden immer wieder einzelne Capsidproteinbanden ausgeschnitten und mittels nano-LC-ESI-MS/MS analysiert. Alle entdeckten Peptide sind in der Aminosäuresequenz des Polyproteins von ORF2 farblich markiert (Abb. 29). Als Grundlage der Aminosäuresequenz dient der von Bakonyi et al. (2002) identifizierte Stamm „Germany 2“ (gi|19068035). Die farbigen Dreiecke markieren die Schnittstellen zwischen den Capsidproteinen. Die N-terminalen Sequenzen von VP 2 und VP 3 wurden dabei von Govan et al. (2000) mittels Edman-Abbau bestimmt. Die wahrscheinliche Schnittstelle von VP 1 und VP 4 wurde von de Miranda et al. (2010a) durch Vergleich mit anderen Dicistroviren bestimmt. Der schwarze Pfeil in Abb. 29 zeigt auf Alanin, die vermutlich erste translatierte Aminosäure des Capsid-Polyproteins von ABPV. Eine Besonderheit bei Dicistroviren ist, dass vor jedem ORF eine Interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) lokalisiert ist, die eine Cap-unabhängige Translation gewährleistet. Die erste Aminosäure des Polyproteins von ORF1 ist Methionin. Die erste Aminosäure des Polyproteins von ORF2 kann jedoch jede beliebige Aminosäure sein, denn in 10 von 14 Viren erkennt das IRES-Element, das sich in der Intergenomischen Region (IGR) befindet, das Prolin Codon CCU und das nachstehende Alanin Codon wird so zur ersten translatierten Aminosäure (Nakashima und Uchiumi, 2009). Dass es sich bei der ersten Aminosäure des ORF2 tatsächlich um Alanin handelt konnte hier

leider nicht bestätigt werden, da ein versuchter Edman-Abbau des VP 1 fehlschlug, möglicherweise aufgrund einer Blockierung des N-terminalen Endes.



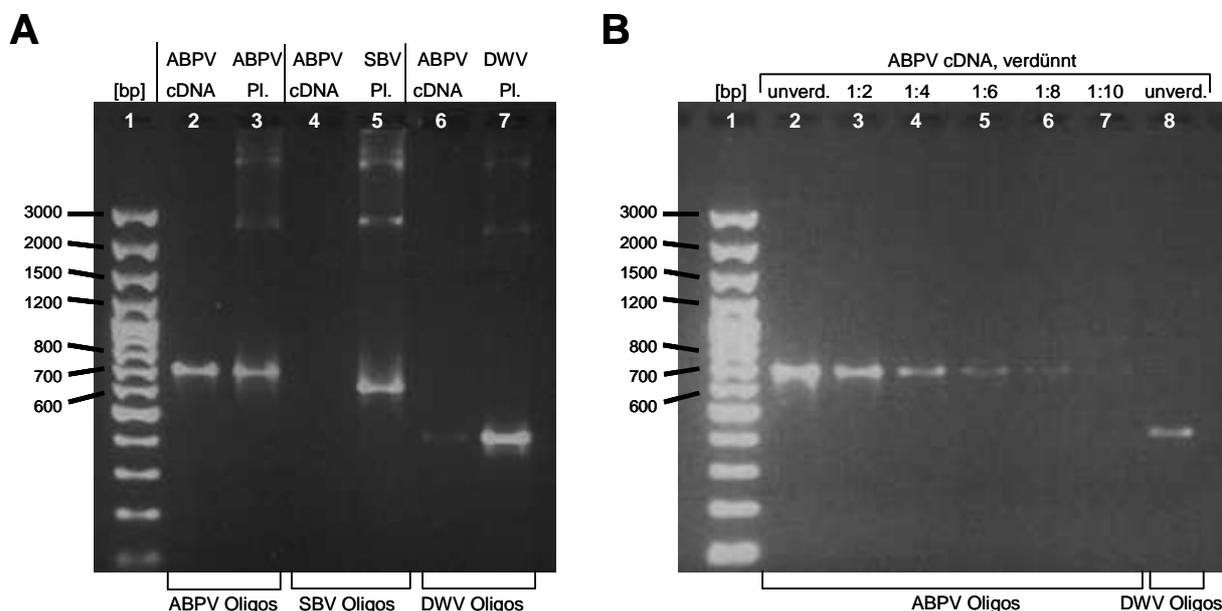
**Abb. 29: Aminosäuresequenz des Polyproteins ORF2.**

Grundlage dieser Sequenz ist der von Bakonyi et al. (2002) identifizierte Stamm „Germany 2“ (gi|19068035). Aus verschiedenen Gelen wurden immer wieder einzelne Capsidprotein-Banden ausgeschnitten und nach Trypsin-Verdau mittels nano-LC-ESI-MS/MS analysiert. Lediglich das mit einer Klammer (\*) versehene Peptid von VP 1 resultiert aus einem Protease V8-Verdau. Alle entdeckten Peptide sind farblich markiert. Von dieser Sequenz abweichende Aminosäuren sind unterstrichen. Die farbigen Dreiecke markieren die wahrscheinlichen Schnittstellen zwischen den Capsidproteinen (Govan et al., 2000; de Miranda et al., 2010a). Der schwarze Pfeil zeigt auf die Stelle, an der nach Nakashima und Uchiumi (2009) die Translation beginnt.

#### 4.5.2 Reinheit der verwendeten ABPV-Suspension

Eine ausreichende Menge an Virussuspension erhält man durch gezielte Virusvermehrung in Puppen und anschließende Aufreinigung. Da Puppen von Natur aus auch symptomlose Trägerinnen sein können und bei Viruserkrankung fast immer zeitgleich von mehreren Viren befallen sind, wurde die verwendete Akute Bienen Paralyse Virus (ABPV)-Suspension auf ihre Reinheit getestet. Abb. 30A zeigt deutlich, dass die verwendete Suspension frei von Sackbrut Virus (SBV) ist (Spur 4) und zu einem geringen Teil mit Deformed Wing Virus (DWV) kontaminiert ist (Spur 6). Um die Stärke der Kontamination abschätzen zu können, wurde eine PCR mit einer Verdünnungsreihe der Suspension und spezifischen ABPV-Oligos durchgeführt und eine PCR mit unverdünnter Suspension und spezifischen DWV-Oligos (Abb. 30B). Die erhaltene Bande von DWV auf Spur 8 ist in etwa so stark wie die ABPV Bande auf Spur 4, die aus einer 1:4 Verdünnung der ABPV Suspension resultiert. Man kann

also näherungsweise davon ausgehen, dass der Anteil an DWV in der ABPV-Suspension bei 25 % liegt.



**Abb. 30: PCR zum Prüfen der Reinheit der verwendeten ABPV-Suspension.**

(A) PCR zum Nachweis der Reinheit. Aus einem Aliquot der Virussuspension wurde cDNA hergestellt. Diese cDNA wurde mithilfe spezifischer Oligonukleotidstartsequenzen (Oligos) auf die Anwesenheit des Akuten Bienen Paralyse Virus (ABPV, Spur 2), Sackbrut Virus (SBV, Spur 4) und Deformed Wing Virus (DWV, Spur 6) untersucht. Jeweils daneben als Positivkontrolle wurde eine PCR mit denselben spezifischen Oligos und einem ABPV-Plasmid (Spur 3), einem SBV-Plasmid (Spur 5) und einem DWV-Plasmid (Spur 7) durchgeführt.

(B) PCR zum Abschätzen wieviel Prozent der ABPV-Suspension mit DWV verunreinigt sind. Dafür wurde die ABPV cDNA unverdünnt und in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Bei den Proben der Spuren 2-7 wurden spezifische ABPV-Oligos verwendet, bei der unverdünnten cDNA Probe von Spur 8 wurden spezifische DWV-Oligos verwendet.

#### 4.6. Auswirkungen einer ABPV-Infektion auf Larven

In der Literatur ist bis jetzt sehr wenig darüber bekannt wie sich eine ABPV-Infektion auf den Organismus auswirkt. Fast alle Arbeiten beziehen sich auch nur auf die Infektion von adulten Bienen, da in der Natur nur adulte Bienen von Symptomen betroffen sind. Aber gerade die Infektion von Larven, die durch die *In-vitro*-Aufzucht sehr leicht in großen Mengen im Labor zu handhaben sind und auch pro Individuum genügend Hämolymphe für Analysen liefern, eignet sich hervorragend, um Auswirkungen einer Infektion auf die Hämolymphe-Zusammensetzung und auch auf den gesamten Körper zu beobachten.

Die verwendete ABPV-Suspension ( $5 A_{260}/\text{ml}$ ) kann mit einem Quotienten  $A_{260}/A_{280} = 1,7$  als rein bezeichnet werden. Die  $LD_{50}$  bei Larven liegt beispielsweise bei  $10^{-7}$ , einer Verdünnung der Ausgangs-Suspension um den Faktor  $10^7$ .  $LD_{50}$  (Lethal Dose<sub>50</sub>) beschreibt die Dosis bei

der nur 50 % der infizierten Individuen 24 h überleben. Von Fedorova et al. (2011) wurde der Titer der verwendeten Virussuspension auf  $10^{12}$  Partikel/ml bestimmt und die  $LD_{50}$  damit auf  $10^2$  Partikel/Larve festgelegt, bei 1  $\mu$ l Injektionsvolumen. Dieses Ergebnis deckt sich ungefähr mit der von Bailey et al. (1963) ermittelten  $LD_{50}$  von ca.  $1.3 \times 10^2$  Partikeln pro Biene bei Injektion. Wobei Bailey et al. zudem fanden, dass die  $LD_{50}$  bei oraler Aufnahme bei mehr als  $10^{11}$  Partikeln liegt und bei Aufsprühen zwischen  $10^8$  und  $10^9$  Partikeln, also deutlich höher. Das Virus muss folglich ins Hämocoel gelangen, um sich erfolgreich vermehren zu können. Um die Ergebnisse eindeutiger präsentieren zu können, wird im Folgenden stets die von Fedorova et al. (2011) ermittelte Partikelzahl anstelle des Verdünnungsfaktors angegeben.

#### 4.6.1. Konzentrationsabhängige Unterschiede - alles oder nichts

Betrachtet man die Überlebensraten dreier unabhängiger Versuchsreihen 24 h nach Injektion unterschiedlicher ABPV-Konzentrationen (Tabelle 30), so erkennt man, dass ca. 82 % der Larven eine Injektion der sehr niedrigen Partikelzahl von  $10^1$  ABPV-Partikeln überleben. Ungefähr genauso viele Larven überleben eine Injektion von  $10^5$  *E. coli*-Zellen. Wird die Dosis um eine Zehnerpotenz auf  $10^2$  ABPV-Partikel erhöht, so überleben nur noch ca. 47 % der Larven. Eine erneute Erhöhung der Dosis auf  $10^3$  Partikel wird von keiner Larve überlebt.

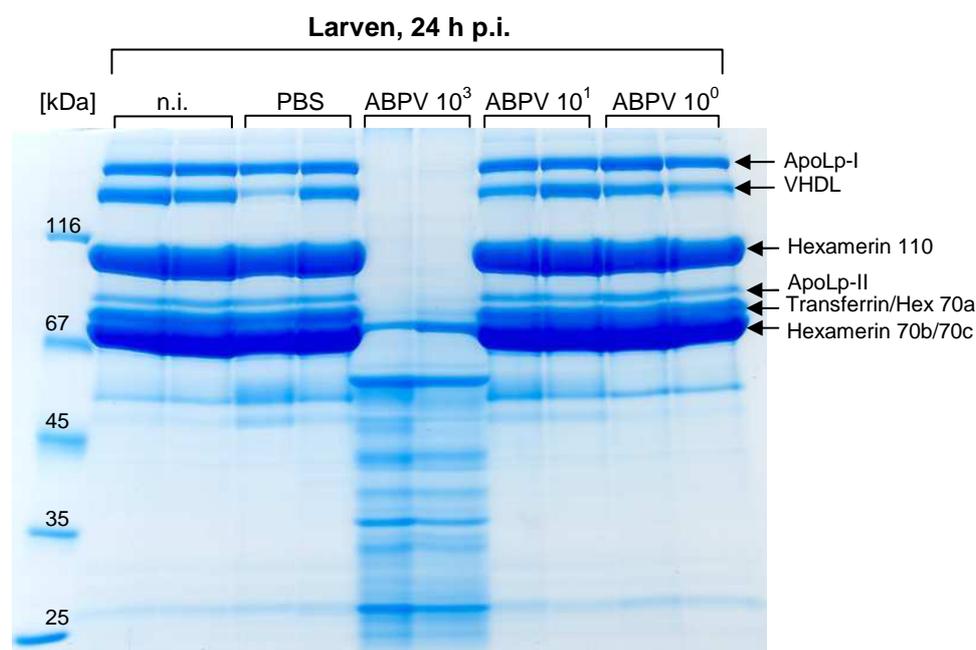
**Tabelle 30: Überlebensraten (%) von Larven 24 h nach Injektion von *E. coli*-Zellen und unterschiedlichen ABPV-Konzentrationen.**

Versuchsreihe	nicht-infiziert	<i>E. coli</i>	ABPV-Partikel		
	(n.i.)	$10^5$ Zellen	$10^3$	$10^2$	$10^1$
I (2008)	<b>100</b> (14/14)*	<b>80</b> (12/15)	<b>0</b> (0/12)	<b>53</b> (8/15)	<b>81</b> (13/16)
II (2008)	<b>91</b> (10/11)	<b>83</b> (10/12)	<b>0</b> (0/17)	<b>39</b> (7/18)	<b>75</b> (15/20)
III (2009)	<b>100</b> (12/12)	<b>90</b> (9/10)	<b>0</b> (0/22)	<b>50</b> (6/12)	<b>91</b> (10/11)
Durchschnitt ± SD	<b>97 ± 5,2</b>	<b>84,3 ± 5,1</b>	<b>0</b>	<b>47,3 ± 7,4</b>	<b>82,3 ± 8,1</b>

\* Anzahl überlebender Larven im Verhältnis zur Gesamtanzahl.

Sehr interessant ist die Beobachtung, dass es bei Larven offensichtlich so etwas wie eine kritische Anzahl an Viruspartikeln gibt, die für eine erfolgreiche Infektion notwendig ist. Diese kritische Anzahl liegt bei Larven bei der  $LD_{50}$  von  $10^2$  Partikeln. Bei ca. 50 % der Larven reicht diese Dosis für eine erfolgreiche Infektion aus, bei den anderen 50 % wird sie

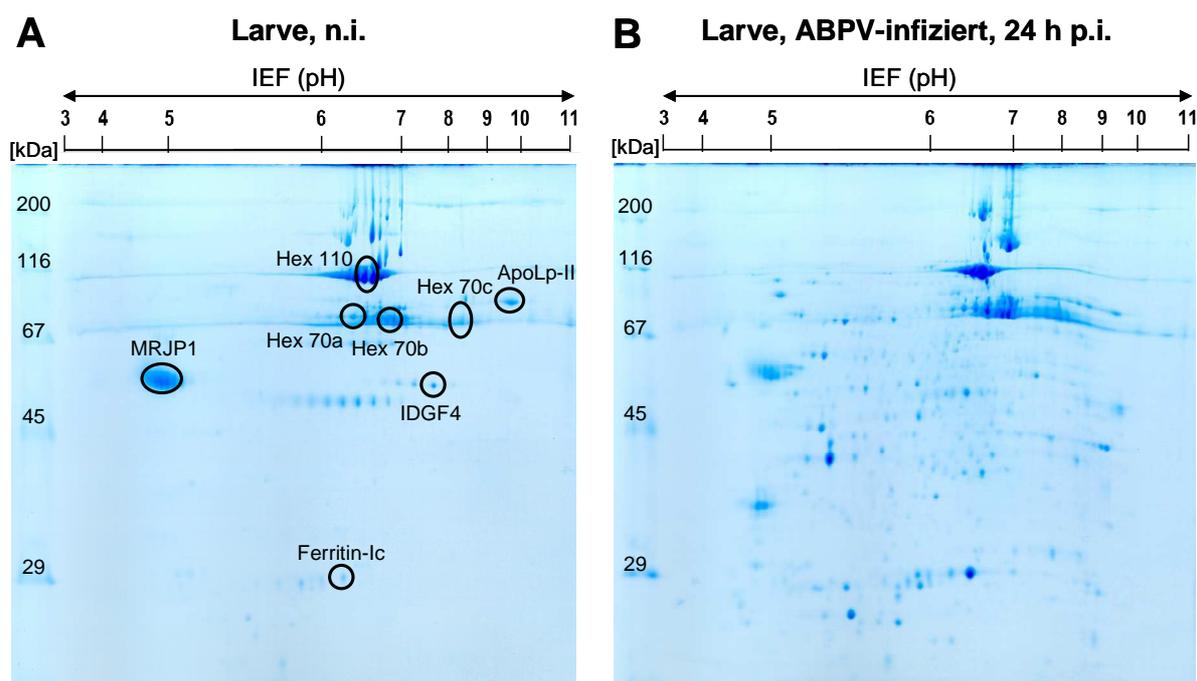
überlebt und hat anscheinend keinerlei Auswirkung. Zumindest nicht auf das äußere Erscheinungsbild und auf die Hämolymphe-Zusammensetzung. Das ist vor allem insofern bemerkenswert, da ein Überschreiten der kritischen Partikelzahl innerhalb der ersten 24 h zu einem Kollaps der Larven führt, der sich sowohl äußerlich als auch im Proteinmuster der Hämolymphe bemerkbar macht (Abb. 31). Man erkennt eine hohe Anzahl an Proteinen, die entweder neu exprimiert werden oder als Folge einer Degradation der hochmolekularen Proteine in der Hämolymphe der stark infizierten, kollabierenden Larven erscheinen.



**Abb. 31: Gelelektrophoretische Analyse der Hämolymphe von Larven nach einer ABPV-Injektion.** n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, ABPV  $10^3$  bis  $10^0$ : Injektion von 1000 bis 1 Viruspartikel. Alle Hämolympheproben wurden 24 h p.i. entnommen. Je 1,3  $\mu$ l der Hämolymphe eines einzelnen Individuums wurde auf eine Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431.

ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, VHDL = Very High Density Lipoprotein.

Ein Blick auf ein 2D-Gel der Hämolymphe einer solchen kollabierenden Larve macht noch deutlicher wieviel sich auf Proteinebene ereignet (Abb. 32B). Wo im 1D-Gel nur dicke Banden erscheinen, trennen sich diese im 2D-Gel aufgrund der unterschiedlichen pI-Werte der enthaltenen Proteine in einer zweiten Dimension auf. Zum besseren Vergleich zeigt Abb. 32A das Hämolymphe-Proteinmuster einer nicht-infizierten Larve.



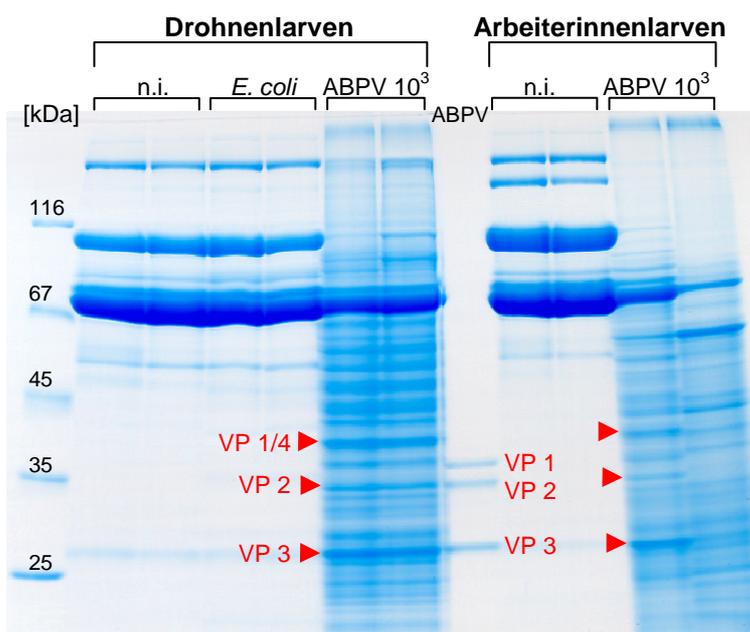
**Abb. 32: Zwei-dimensionale Gelelektrophorese unterschiedlicher Hämolympheproben.**

Hämolymphe-Proteinmuster einer (A) nicht-infizierten (n.i.) und einer (B) ABPV-infizierten Larve ( $10^3$  Partikel) 24 h p.i. 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF) der Proteine entlang eines pH-Gradienten, 2. Dimension: Auftrennung nach molekularer Masse (kDa) in einem 10 % PAA/0,1 % SDS-Gel (Laemmli-Puffersystem). Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250, verwendeter Längenstandard: Serva 39215.01. Larventypische Proteine sind kreisrund markiert: Hex 110 = Hexamerin 110, Hex 70a/b/c = Hexamerin 70 a/b/c, ApoLp-II = Apolipoprotein-II, MRJP1 = Major Royal Jelly Protein 1, IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4 und Ferritin-Ic.

#### 4.6.2. Keine wesentlichen Unterschiede zwischen einer ABPV-Infektion in Arbeiterinnen- und Drohnenlarven

Obwohl sich diese Arbeit auf die Immunreaktion von Arbeiterinnen konzentriert, war es doch interessant zu prüfen, ob Drohnenlarven eventuell eine andere Reaktion auf die gleiche Konzentration an ABPV-Partikeln zeigen wie Arbeiterinnenlarven (Abb. 33).

Das Hämolymphe-Proteinmuster der Drohnenlarven zeigt allerdings eine fast identische Reaktion auf die injizierten Viruspartikel wie die Arbeiterinnenlarven, auch die Virusvermehrung kann anhand der Capsidproteinbanden gut verfolgt werden.



**Abb. 33: Reaktion von Drohnenlarven auf eine ABPV-Infektion.**

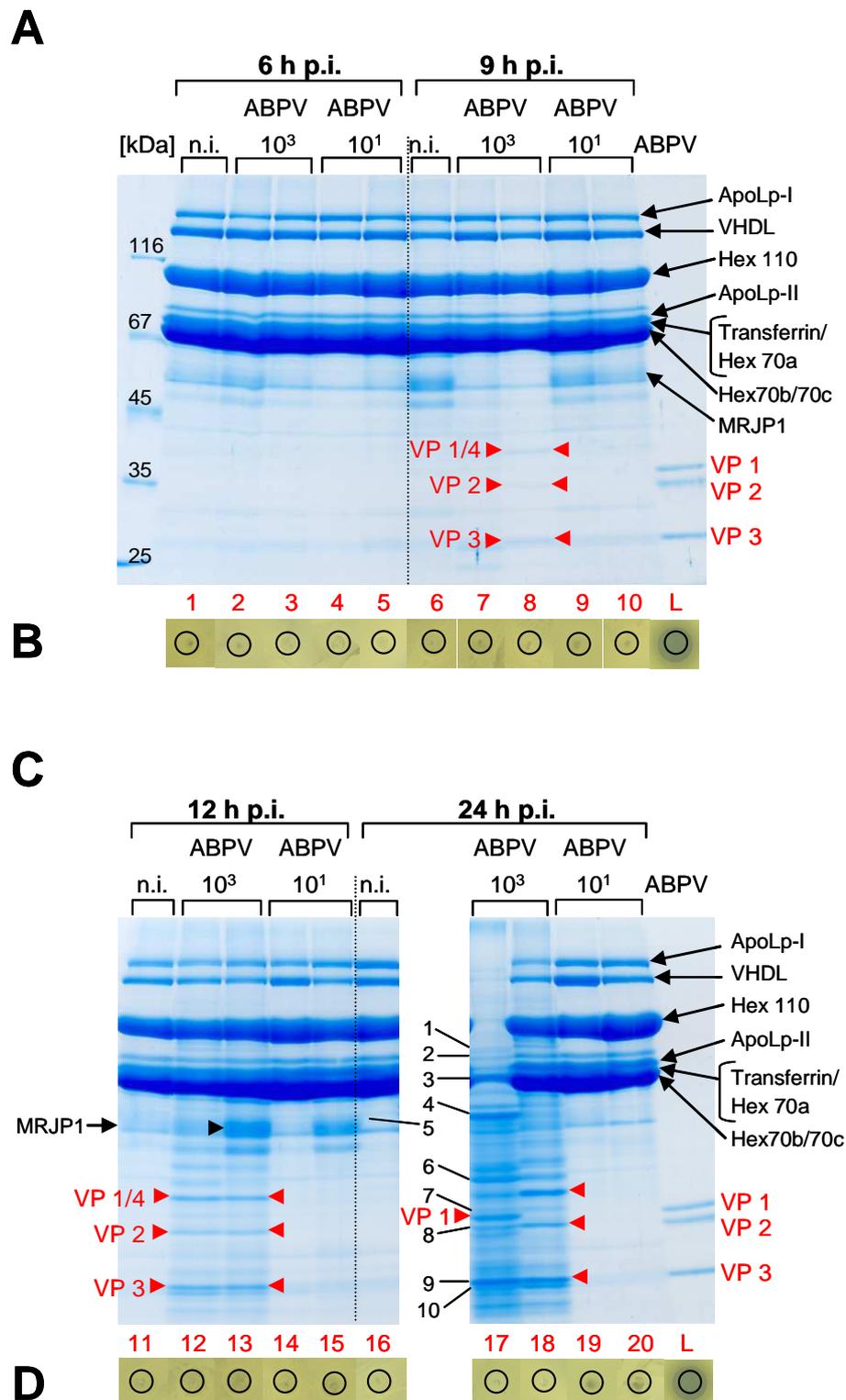
Vergleich von Arbeiterinnenlarven (5 d) und Drohnenlarven (7 d). n.i.: nicht-infiziert, *E. coli*: Injektion von  $10^5$  Zellen *E. coli* 682, ABPV  $10^3$ : Injektion von  $10^3$  Partikeln. Alle Hämolympfproben wurden 24 h p.i. entnommen. Je 1,2  $\mu$ l der Hämolymphe eines einzelnen Individuums wurde auf eine Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431, als Kontrolle (ABPV) dienten 7  $\mu$ l der ABPV-Suspension. Die roten Pfeile zeigen die in der Hämolymphe der ABPV-infizierten Larven exprimierte Capsidproteine VP 1/4, VP 2 und VP 3.

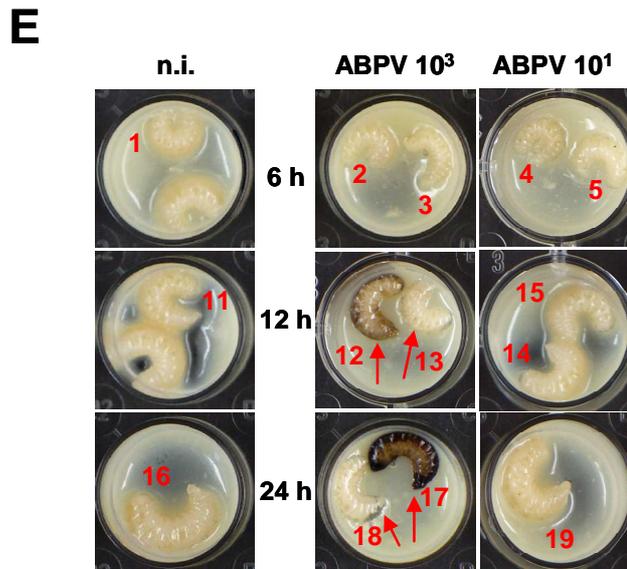
#### 4.6.3. Der zeitliche Verlauf der viralen Vermehrung von ABPV in Larven

Da Larven schon 24 h nach einer tödlichen ABPV-Injektion kollabieren und sich ihr Hämolympf-Proteinmuster drastisch verändert, wurde in einer Zeitreihe mit kürzeren Zeitabständen nach Injektion geprüft, ab wann sich erste Veränderungen sowohl im äußeren Erscheinungsbild als auch in der Hämolymphe bemerkbar machen (Abb. 34).

Dafür wurden zwei unterschiedliche ABPV-Konzentrationen gewählt. Die Eine lag mit  $10^3$  Partikeln knapp über der ermittelten  $LD_{50}$  von  $10^2$ , die Andere lag mit  $10^1$  Partikeln knapp darunter. Während die niedrigere Konzentration selbst 24 h p.i. zu keinerlei Veränderung im Hämolympf-Proteinmuster führt, so wird bei der höheren Konzentration schon 9 h p.i. eine schwache Virusmehrung in Form der Capsidproteine VP 1/4, VP 2 und VP 3 sichtbar (Abb. 34A). Nach 12 h p.i. ist diese Virusvermehrung wesentlich deutlicher und es erscheinen außerdem die ersten zusätzlichen Banden im Proteinmuster. In den nächsten Stunden schreitet die Virusvermehrung weiter stark fort, erkennbar an den immer stärker werdenden Banden der Capsidproteine VP 1/4, VP 2 und VP 3, am Auftauchen des erst spät prozessierten VP 1

und an den immer zahlreicheren zusätzlichen Banden (Abb. 34C). Viele dieser neu induzierten Proteine spielen eine Rolle bei der Translation, im Energiehaushalt oder sind eine Antwort auf Stress (Tabelle 31).





**Abb. 34: Zeitlicher Verlauf der viralen Vermehrung in Larven.**

(A-D) n.i.: nicht-infiziert, ABPV 10<sup>3</sup> bzw. 10<sup>1</sup>: Anzahl der injizierten ABPV-Partikel. Die Hämolympfproben wurden 6, 9, 12 und 24 h p.i. entnommen. (A, C) Je 1 µl der Hämolymphe eines einzelnen Individuums wurde auf eine Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431. Als Kontrolle (ABPV) dienten 6 µl der ABPV-Suspension.

Nach Infektion neu erscheinende Proteine sind mit schwarzen Ziffern (1-10) markiert und in Tabelle 31 aufgelistet. ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, VHDL = Very High Density Lipoprotein, Hex 110 = Hexamerin 110, Hex 70a/b/c = Hexamerin 70a/b/c, MRJP1 = Major Royal Jelly Protein 1. Virale Capsidproteine sind rot markiert: VP 1, VP 1/4, VP 2 und VP 3.

(B, D) Hemmhof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität. Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *M. flavus*. 1,5 µl der gleichen Hämolympfproben wie auf den Gelen (1-20) wurden aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Lysozym (L, 10 mg/ml) diente als Kontrolle.

(E) Äußeres Erscheinungsbild von nicht-infizierten (n.i.) und ABPV-infizierten Larven (10<sup>3</sup> und 10<sup>1</sup> injizierte Partikel) 6, 12 und 24 h p.i.. Die roten Ziffern kennzeichnen Larven, deren äußeres Erscheinungsbild den Larven gleicht, deren Hämolymphe sowohl auf den Gelen (1-20) als auch im Hemmhof-Test (1-20) analysiert wurde. Die roten Pfeile zeigen auf tote Larven.

Alle Larven wurden bei einem Ausgangsgewicht von ca. 40 mg infiziert. Während sich nicht-infizierte Larven und Larven, denen nur 10<sup>1</sup> Partikel injiziert wurden, in den ersten 24 h p.i. weiterentwickeln und deutlich an Gewicht zulegen auf ca. 90 mg pro Larve, so kommt es bei den tödlich infizierten Larven schon innerhalb der ersten 12 h p.i. zu einer Wachstumsverzögerung, d.h. sie erreichen durchschnittlich nur ca. 50 mg, und bei einigen Larven kommt es auch zu einer Änderung der Körperfarbe von gelblich-weiß zu hellbraun. Diese Farbänderung wandelt sich in den nächsten Stunden, in denen die Larven sterben, weiter zu einem schwarzbraun (Abb. 34E, Larven 12 und 17). Das Hämolympf-Proteinmuster solcher toter, schwarzbrauner Larven (Abb. 34E, Larve 17, Spur 17) zeigt wesentlich mehr Banden und einen stärkeren Abbau der hochmolekularen Proteine als das Muster toter, gelblich-weißer Larven (Abb. 34 E, Larve 18; Abb. 34C, Spur 18).

**Tabelle 31. Hochregulierte Proteine in der Hämolymphe von Larven nach ABPV-Infektion.\***

Nr.	Protein	Accession (NCBI)	Molekulare Masse (Da) <sup>a</sup>	SP <sup>b</sup>
1	<b>Glycogen phosphorylase</b>	66557932	97.329	-
	<b>Elongation factor-2 like</b>	66508439	94.582	-
	<b>TER 94</b>	66534286	88.895	-
2	<b>Heat shock protein 90</b>	229892248	83.383	-
	<b>Heat shock protein 1<math>\alpha</math></b>	110749824	82.753	-
3	<b>Heat shock protein cognate 5</b>	229892203	75.403	-
4	<b>Protein disulfide-isomerase A3 (ERp60)</b>	66546657	55.856	18
	<b>Hexamerin 70a (238-684)<sup>c</sup></b>	148357839	53.497	21
	<b>Hexamerin 70b (255-683)<sup>c</sup></b>	58585148	49.359	21
5	<b>MRJP 1</b>	58585098	48.886	19
6	<b>3-Ketoacyl-CoA thiolase</b> (=Yippee interacting protein 2)	48097100	42.503	-
7	<b>Aldose reductase like</b>	66525576	36.082	-
	<b>Lambda crystallin-like protein</b>	209180477	35.860	-
	<b>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2</b>	48142692	35.883	-
8	<b>N-acetylneuraminat pyruvate lyase</b>	110755974	34.019	-
9	<b>Trypsin-like serine protease</b>	110762229	28.596	18
	<b>15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase</b>	66518230	28.776	-
	<b>3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</b>	110760701	27.099	-
	<b>Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR)</b>	58585184	27.191	-
	<b>Proteasome subunit alpha</b>	66541426	26.718	-
10	<b>Heat shock protein beta-1-like</b>	110757651	25.565	-
	<b>Peroxiredoxin-like protein</b>	283436152	25.133	-
	<b>Glutathione S-transferase S1</b>	237681308	23.761	-

\* eine ausführlichere Tabelle befindet sich im Anhang als Tabelle S31.

<sup>a</sup> die molekulare Masse wurde mithilfe des Programms ProtParam errechnet.

<sup>b</sup> das Vorhandensein eines Signalpeptides wurde mithilfe des Programms TargetP ermittelt, angegeben ist die Länge des Signalpeptides in Aminosäuren.

<sup>c</sup> vermutliche Länge des Degradationsprodukts.

In den infizierten Larven kommt es offensichtlich zu keiner Aktivierung des humoralen Immunsystems, da sich in den Hemmhof-Tests keine antimikrobielle Aktivität in der Hämolymphe nachweisen lässt (Abb. 34B, D). Das ist vor allem insofern bemerkenswert, da für gewöhnlich eine bloße Verwundung (Injektion von PBS) bei Larven schon zu einer Expression der AMPs führt, die auch im Hemmhof-Test nachweisbar ist (Abb. 7).

Betrachtet man die Überlebensraten der Larven in diesem Versuch (Tabelle 32) so wird deutlich, dass erst 12 h p.i. die Zahl an Überlebenden zurückgeht. Für die höhere Konzentration von  $10^3$  Partikeln mit 33 % Überlebenden wesentlich drastischer als für die niedrigere Konzentration von  $10^1$  Partikeln mit 80 % Überlebenden. Das ist der Zeitpunkt, an dem im Hämolymp-Proteinmuster der höheren Dosis von  $10^3$  injizierten ABPV-Partikeln neben einer deutlichen Virusvermehrung die ersten zusätzlichen Proteinbanden auftauchen. Nach 24 h p.i. hat keine Larve eine Injektion von  $10^3$  ABPV-Partikeln überlebt, im Gegensatz zu 75 % der Larven, die eine Injektion von  $10^1$  Partikeln überlebten. Interessant hierbei ist, dass die Anzahl Überlebender auch bei der niedrigeren Dosis zurückgeht und das obwohl bei dieser Gruppe keine Virusvermehrung im Hämolymp-Proteinmuster nachweisbar ist.

**Tabelle 32. Anzahl überlebender Larven (%) zu verschiedenen Zeitpunkten nach ABPV-Infektion.**

Stunden (h) p.i.	nicht-infiziert (n.i.)	ABPV-Partikel	
		$10^3$	$10^1$
6	<b>100</b> (14/14)*	<b>100</b> (28/28)	<b>96</b> (26/27)
9	<b>100</b> (11/11)	<b>100</b> (25/25)	<b>96</b> (23/24)
12	<b>89</b> (8/9)	<b>33</b> (7/21)	<b>80</b> (16/20)
24	<b>83</b> (5/6)	<b>0</b> (0/17)	<b>75</b> (12/16)

\* In Klammern: Anzahl überlebender Larven im Verhältnis zur Gesamtanzahl.

## **4.7. Auswirkungen einer ABPV-Infektion auf adulte Bienen**

### **4.7.1. Jungbienen haben eine andere $LD_{50}$ als Larven**

Bei der Arbeit mit Jungbienen wird sehr schnell ersichtlich, dass sie nicht so sensitiv auf eine ABPV-Infektion reagieren wie Larven. Jungbienen zeigen weder eine starke Änderung des äußeren Erscheinungsbilds, noch eine so rasche Virusvermehrung (s. Kap. 4.7.2.). Zudem überleben sie eine höhere Anzahl an injizierten Viruspartikeln und zeigen einen anderen zeitlichen Verlauf einer ABPV-Infektion als Larven (Tabelle 33). Während sich bei Larven

die Virusvermehrung innerhalb der ersten 24 h als lethal erweist oder auch nicht, muss die Auswirkung einer ABPV-Infektion auf adulte Bienen über mehrere Tage beobachtet werden. Auch Bailey et al. (1963) beschreiben, dass die ersten Symptome einer Infektion nach 2-4 Tagen auftreten, gefolgt vom Tod weitere 1-2 Tage später.

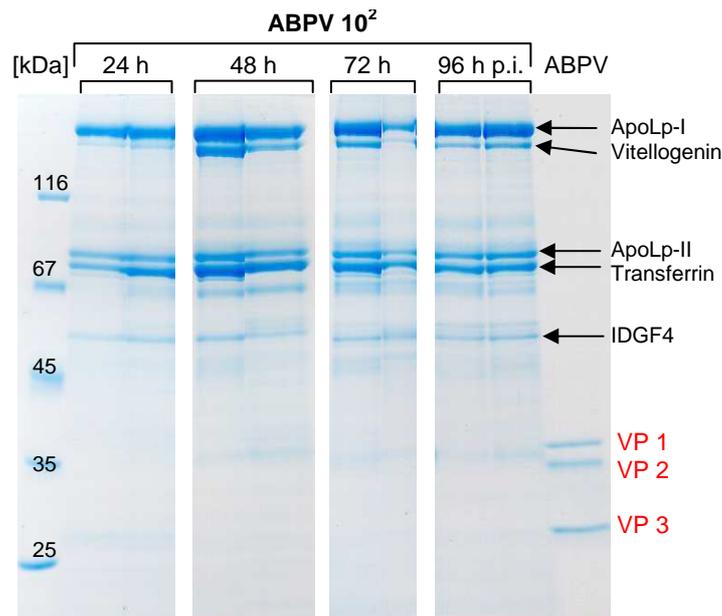
**Tabelle 33: Anzahl überlebender Jungbienen (%) 24 h nach Injektion von *E. coli*-Zellen und unterschiedlichen ABPV-Konzentrationen.**

Stunden (h) p.i.	nicht-infiziert*	<i>E. coli</i> *	ABPV-Partikel*		
	(n.i.)	10 <sup>5</sup> Zellen	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
24	100 ± 0	99 ± 1,7	54,3 ± 27,7	82,7 ± 30	98,3 ± 2,9
48	100 ± 0	95,3 ± 4,5	6,3 ± 6,5	56,7 ± 24,5	95,3 ± 4,5
72	93,7 ± 3,2	83,7 ± 3,8	0	0	91 ± 6,6

\* Durchschnittswerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchsreihen. Jede Gruppe bestand ursprünglich aus 25 Individuen.

Injiziert man Jungbienen 10<sup>2</sup> ABPV-Partikel, was der LD<sub>50</sub> von Larven entspricht, so hat das in Jungbienen bei einem Beobachtungszeitraum von 72 h im Vergleich zu einer *E. coli* Injektion keinerlei Auswirkung (Tabelle 33). Erhöht man die ABPV-Dosis auf 10<sup>3</sup> Partikel, eine Dosis die 24 h p.i. schon keine Larve mehr überlebt, so überleben 24 h p.i. zwar noch 82,7 ± 30 % der Jungbienen, 48 h p.i. dann aber nur noch 56,7 ± 24,5 % und letztendlich bleibt 72 h p.i. keine Überlebende übrig. Wird die Dosis noch einmal um eine Zehnerpotenz auf 10<sup>4</sup> Partikel erhöht, so erfolgt das Dahinsterben der Jungbienen schneller: 24 h p.i. gibt es nur noch 54,3 ± 27,7 % Überlebende, 48 h p.i. nur noch 6,3 ± 6,5 % und 72 h p.i. keine einzige Überlebende mehr.

Eine gelelektrophoretische Analyse der Hämolymphe von Jungbienen, denen 10<sup>2</sup> ABPV-Partikel injiziert wurden zeigt, dass es offensichtlich zu keinerlei Virusvermehrung in den Individuen kommt und sich auch ansonsten auf Ebene des Hämolymphe-Proteinmusters nichts verändert (Abb. 35).



**Abb. 35: Injektion von  $10^2$  ABPV-Partikeln in Jungbienen.**

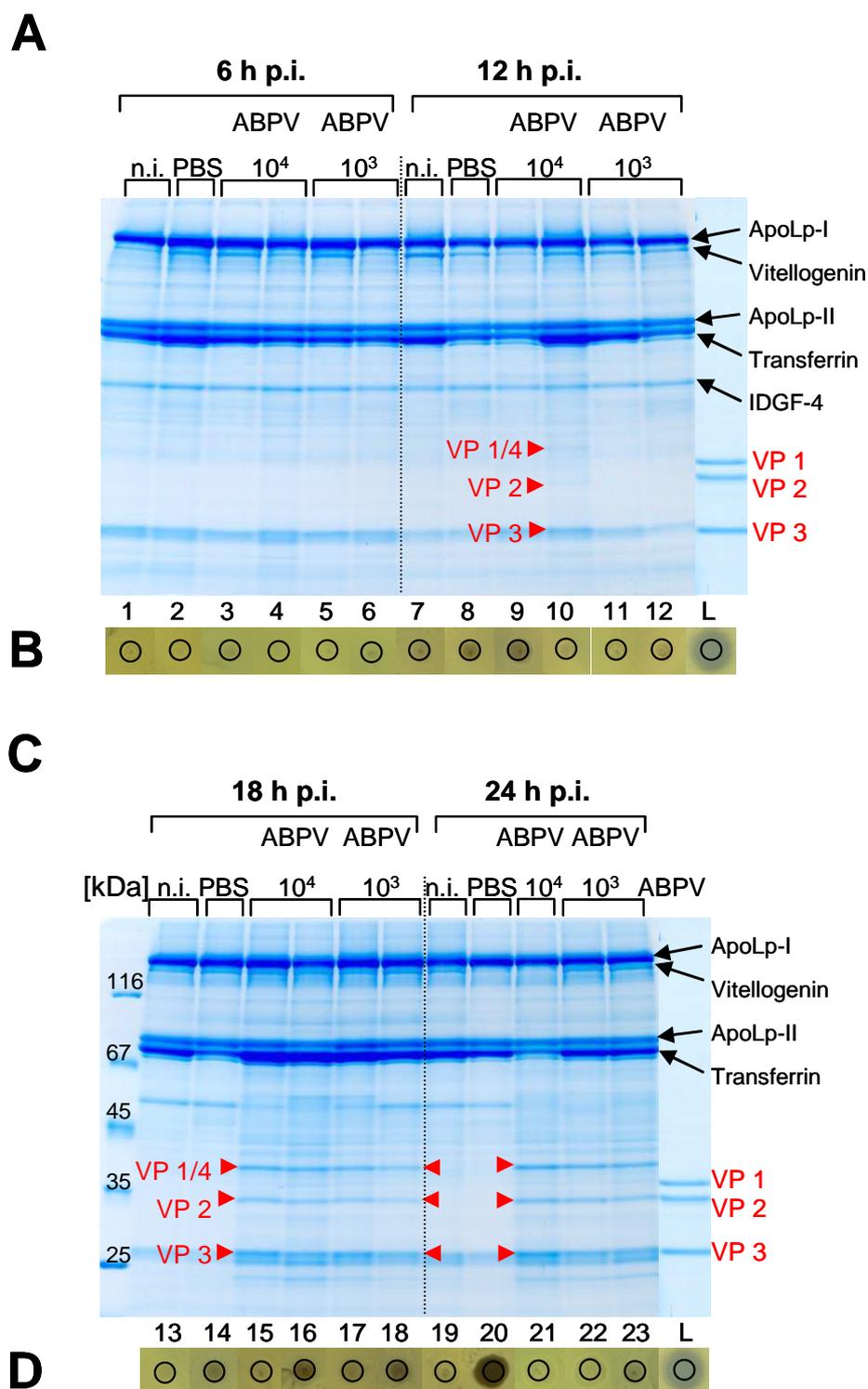
Die Hämolympfproben wurden 24, 48, 72 und 96 h nach Injektion (p.i.) entnommen. Je 1,3  $\mu$ l der Hämolymphe eines einzelnen Individuums wurde auf eine Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431. Als Kontrolle (ABPV) dienten 6  $\mu$ l der ABPV-Suspension, rot gekennzeichnet: VP 1, VP 2 und VP 3.

Typische Proteine in der Hämolymphe von Jungbienen: ApoLp-I und -II = Apolipophorin-I und -II, Vitellogenin, Transferrin und IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4.

#### 4.7.2. Die virale Vermehrung ist in Jungbienen langsamer als in Larven

Im Gegensatz zu Larven, bei denen man nach Überschreiten einer kritischen injizierten Partikelzahl eine sehr rasche Virusvermehrung im Hämolympf-Proteinmuster nachweisen kann, läuft eine verfolgbare Virusvermehrung in Jungbienen sehr viel langsamer ab. Ob Jungbienen nach ihrem Tod ein ebenso breites Spektrum an induzierten und degradierten Proteinen in ihrer Hämolymphe aufweisen, konnte leider nicht untersucht werden, da die Bienen bei 35 °C gehalten wurden und kurz nach ihrem Tod stets schon so ausgetrocknet waren, dass keine ausreichende Menge an Hämolymphe gewonnen werden konnte.

Zur Untersuchung des zeitlichen Ablaufs einer Virusvermehrung in Jungbienen analog zur Virusvermehrung in Larven (Abb. 34) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion Hämolymphe entnommen. Es ist zu bemerken, dass den Jungbienen mit  $10^3$  und  $10^4$  Partikeln höhere Konzentrationen injiziert wurden als Larven (Abb. 36).



**Abb. 36: Zeitlicher Verlauf der viralen Vermehrung in Jungbienen.**

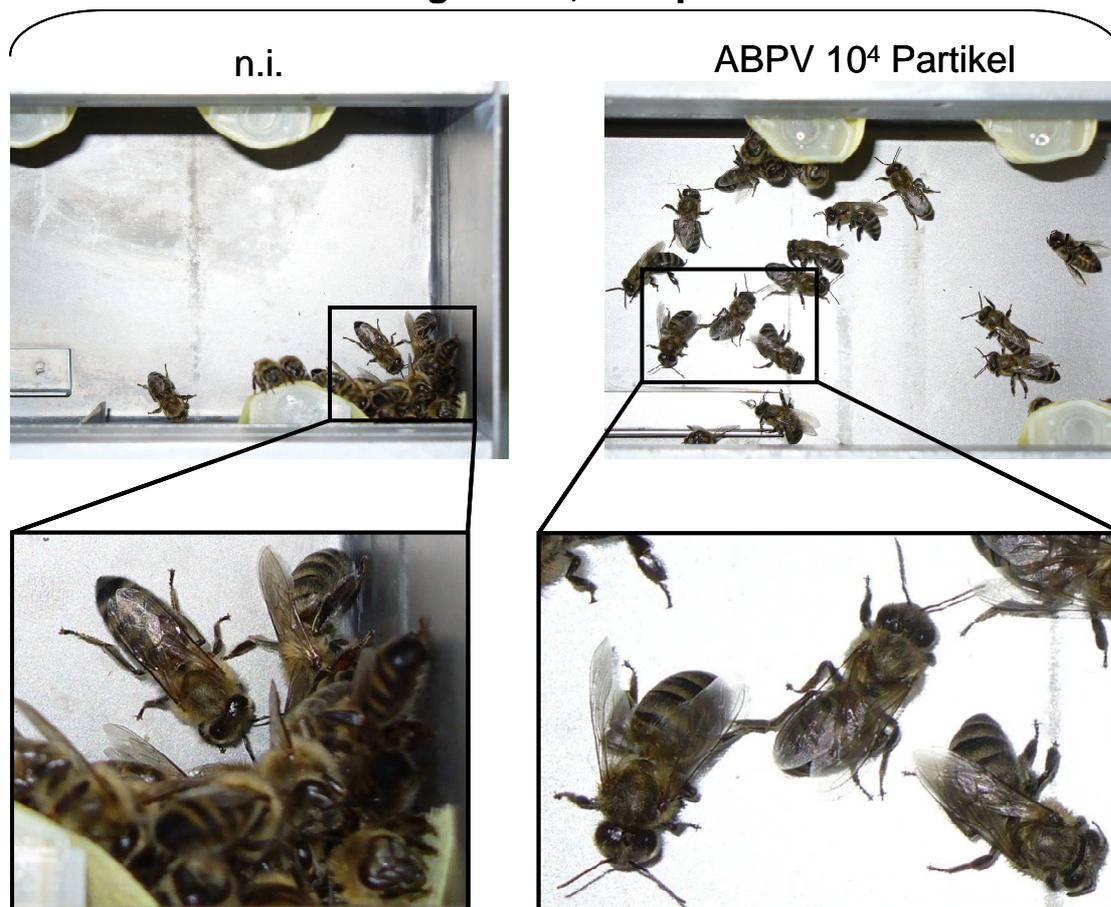
(A, C) n.i.: nicht-infiziert, ABPV 10<sup>4</sup> bzw. 10<sup>3</sup>: Anzahl der injizierten ABPV-Partikel. Die Hämolympbproben wurden 6, 12, 18 und 24 h p.i. entnommen. Je 1 µl der Hämolymphe eines einzelnen Individuums wurde auf eine Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431. ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4. Induzierte virale Capsidproteine sind rot markiert: VP 1/4, VP 2 und VP 3. (B, D) Hemmhoft-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität. Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *M. flavus*, die als Rasen auf eine Agarplatte ausgebracht wurde. 1,5 µl der gleichen Hämolympbproben wie auf den Gelen (1-23) wurden aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 1,5 µl Lysozym (L, 10 mg/ml) diente als Kontrolle.

Während in Larven bei  $10^3$  injizierten Partikeln schon nach 9 h eine Virusvermehrung sichtbar wird, sind die ersten Capsidproteine in Jungbienen erst nach 12 h und  $10^4$  injizierten Partikeln nachweisbar (Abb. 36A). Die Virusvermehrung schreitet über die nächsten Stunden weiter voran, so dass 18 h p.i. sowohl bei  $10^4$  als auch bei  $10^3$  injizierten Partikeln deutliche Capsidproteinbanden auf dem Gel erscheinen. Anders als bei Larven, bei denen die Virusvermehrung noch stärker voranschreitet und schon bei  $10^3$  injizierten Partikeln in den nächsten Stunden zum Tod führt, begleitet von einer großen Menge an induzierten und degradierten Proteinen, kommt es bei Jungbienen zwischen 18 und 24 h p.i. auch bei  $10^4$  injizierten Partikeln zu keiner so starken Virusvermehrung und es erscheinen auch nur einige zusätzliche schwache Banden im Hämolymp-Protteinmuster (Abb. 36C).

Ebenso wie bei Larven kommt es in ABPV-infizierten Jungbienen offensichtlich zu keiner Aktivierung des humoralen Immunsystems. Die Hemmhof-Tests zeigen keine antimikrobielle Aktivität in der Hämolymphe der virusinfizierten Jungbienen (Abb. 36B, D).

Betrachtet man allein das äußere Erscheinungsbild, so kann man an der Körperbeschaffenheit keine Unterschiede zwischen nicht-infizierter und ABPV-infizierter Jungbiene erkennen. Allerdings kommt es bei starker Virusinfektion zu Verhaltensauffälligkeiten. In der Literatur werden die offensichtlichen Symptome einer ABPV-Infektion beschrieben als kraftlose, zitternde Bewegungen (Bailey et al., 1963). Dies lässt sich auch bei den im Labor infizierten Individuen sehr gut beobachten (Abb. 37). Nicht-infizierte Jungbienen verhalten sich ihrem Alter entsprechend, suchen engen Körperkontakt und stehen und laufen unauffällig. Ganz anders die ABPV-infizierten Bienen: sie bewegen sich 24 h p.i. schwach und zitternd, oft erkennt man eine unnatürliche Beinstellung, außerdem fallen sie häufig um und brauchen längere Zeit um wieder hoch zu kommen. Während man von nicht-infizierten Bienen bei fortschreitendem Alter leider keine Fotos mehr machen kann, da sie sofort wegfliegen würden, schlagen die ABPV-infizierten Bienen zum Teil zwar kräftig mit ihren Flügeln, schaffen es aber nicht abzuheben.

### Jungbienen, 24 h p.i.



**Abb. 37: Verhaltensauffälligkeiten von ABPV-infizierten Jungbienen.**

n.i.: nicht-infiziert, ABPV  $10^4$  Partikel: Injektion von  $10^4$  ABPV-Partikeln. Die Jungbienen wurden in den ersten 24 h nach ihrem Schlupf infiziert, in Metallkästchen überführt und die nächsten 24 h bei 35 °C und 70 % relativer Luftfeuchte gehalten.

Betrachtet man die Überlebensraten für diesen Versuch (Tabelle 34), so wird deutlich, dass ebenso wie bei Larven, die Anzahl überlebender Individuen dann zurückgeht, wenn eine Virusvermehrung deutlich erkennbar ist und zudem die ersten zusätzlichen Proteinbanden im Hämolymp-Protteinmuster auftauchen. Im gezeigten Larvenversuch fällt die Anzahl Überlebender bei  $10^3$  injizierten Partikeln schon 12 h p.i. rasant auf 33 % (Abb. 34, Tabelle 32), während bei Jungbienen erst 18 h p.i. bei  $10^3$  bzw.  $10^4$  Partikeln ein moderater Rückgang der Überlebenden auf 77 bzw. 71 % zu verzeichnen ist (Tabelle 34). Obwohl die Virusvermehrung zwischen 18 h p.i. und 24 h p.i. nicht mehr so stark zunimmt und auch nicht noch mehr zusätzliche Proteinbanden im Gel auftauchen, sinkt die Anzahl überlebender Jungbienen weiter auf 25 % für  $10^4$  Partikel und 42 % für  $10^3$  Partikel.

**Tabelle 34: Anzahl überlebender Jungbienen (%) zu verschiedenen Zeitpunkten nach ABPV-Infektion.**

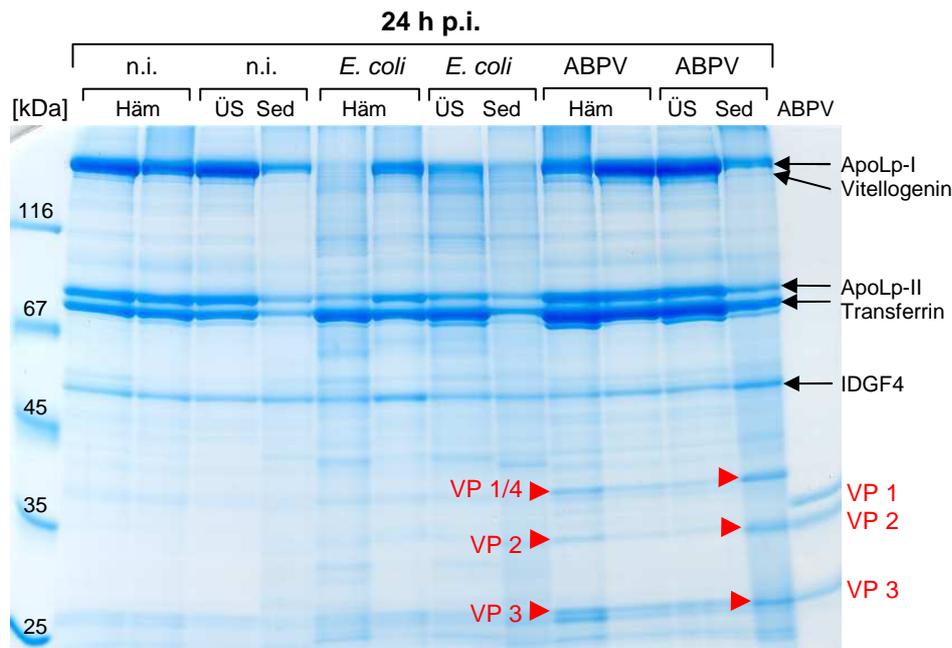
Stunden (h) p.i.	nicht-infiziert (n.i.)	Verwundung (PBS)	ABPV-Partikel	
			$10^4$	$10^3$
6	<b>100</b> (31/31)*	<b>100</b> (27/27)	<b>100</b> (23/23)	<b>100</b> (27/27)
12	<b>100</b> (26/26)	<b>100</b> (22/22)	<b>100</b> (18/18)	<b>100</b> (22/22)
18	<b>100</b> (21/21)	<b>100</b> (17/17)	<b>77</b> (10/13)	<b>71</b> (12/17)
24	<b>100</b> (16/16)	<b>100</b> (12/12)	<b>25</b> (2/8)	<b>42</b> (5/12)

\* In Klammern: Anzahl überlebender Jungbienen im Verhältnis zur Gesamtanzahl.

#### 4.7.3. Hämozyten als Ort der Virusvermehrung?

Eine fortschreitende Virusvermehrung lässt sich anhand der viralen Capsidproteine leicht in der Hämolymphe nachweisen. Allerdings bleibt die Frage offen wo es zur Synthese dieser Capsidproteine kommt. Es bestehen verschiedene Möglichkeiten. So könnte es z.B. zu einer Vermehrung im Fettkörper oder in Epithelzellen kommen, die dann absterben und neben Viruspartikeln auch vermehrt Capsidproteine freisetzen. Oder das Virus vermehrt sich hauptsächlich oder ausschließlich in Hämozyten und lediglich das Einfrieren der Proben und/oder die denaturierenden Bedingungen bei der Gelelektrophorese führen dazu, dass die Zellen reißen und die Capsidproteine freigesetzt werden.

Um diese Frage zu klären wird ebenso verfahren wie beim Nachweis, dass es sich bei IRp30 um ein sekretiertes Protein handelt (Abb. 16). Die abgenommenen Hämolympfproben werden direkt nach der Abnahme zentrifugiert und so die Hämozyten sedimentiert. Eine anschließende gelelektrophoretische Analyse zeigt deutlich, dass die viralen Capsidproteine stark im Sediment vertreten sind (Abb. 38). Das spricht für eine starke Virusvermehrung in den Hämozyten.



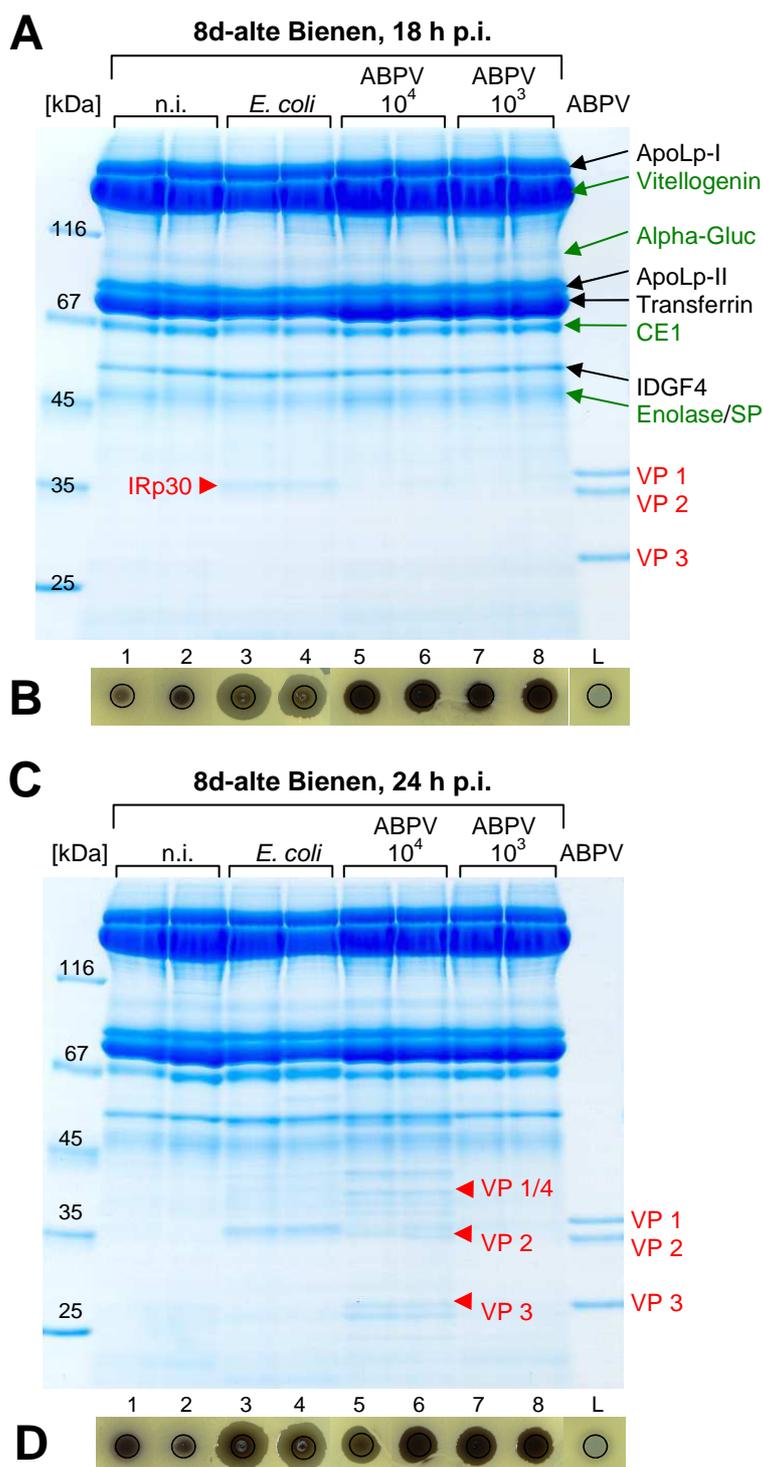
**Abb. 38: Gelelektrophoretische Analyse zur Prüfung der Virusvermehrung in Hämozyten.**

n.i.: nicht-infiziert, *E. coli*: Injektion von  $10^5$  Zellen *E. coli* 682, ABPV: Injektion von  $10^3$  Partikeln. Alle Proben wurden 24 h p.i. entnommen. Die normalen Hämolympfproben (Häm) stammen von einzelnen Individuen. Für die Proben der Überstände (ÜS) und Sedimente (Sed) wurde die Hämolymphe von jeweils 5 Bienen vereinigt und direkt im Anschluss für 15 min bei 12.000 Upm zentrifugiert. Auf die jeweilige Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) wurden je 1,3 µl der Häm- und ÜS-Proben und je 6 µl der Sediment-Proben, die zuvor in 15 µl 2xSP (10µl 2xSP bei ABPV, da wenig Hämolymphe) in Lösung gebracht wurden, aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Serva 39208.01.

ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4. Die roten Pfeile zeigen die in der Hämolymphe bzw. den Hämozyten der ABPV-infizierten Bienen exprimierten Capsidproteine VP 1/4, VP 2 und VP 3.

#### 4.8. Unterschiedliche Virusvermehrung in 8d-alten Bienen, Sammel- und Winterbienen

In Kapitel 4.3.3. wird beschrieben, dass in Sammelbienen und Winterbienen die Expression von IRp30 und Carboxylesterase1 einem leicht anderen Muster folgt als in Jungbienen. Zudem zeigt Kapitel 4.4.2., dass die Abnahme koloniebildender Einheiten in älteren Bienen schneller vonstatten geht. Es liegt also nahe, dass auch eine ABPV-Infektion in älteren Bienen einem anderen Muster folgt als in Jungbienen. Für eine Infektion von 8d-alten Bienen wurden zum besseren Vergleich dieselben ABPV-Konzentrationen gewählt wie für Jungbienen. Während bei Jungbienen (Abb. 36C) allerdings nach 18 und 24 h schon eine deutliche Virusvermehrung in Form der starken Capsidproteinbanden nachweisbar ist, so ist bei 8d-alten Bienen erst 24 h p.i. und dann auch nur bei der hohen Konzentration von  $10^4$  injizierten Partikeln eine leichte Virusvermehrung erkennbar (Abb. 39A, C).



**Abb. 39: Vermehrung von ABPV in 8d-alten Bienen.**

n.i.: nicht-infiziert, *E. coli*: Injektion von  $10^5$  Zellen lebende *E. coli* 682, ABPV  $10^4$  und  $10^3$ : Injektion von  $10^4$  und  $10^3$  Partikeln. Die markierten Bienen wurden direkt aus dem Honigraum gesammelt, Hämolympfproben wurden 18 und 24 h p.i. entnommen. (A, C) Je 1,2  $\mu$ l Hämolymphe der 8d-alten Bienen wurden auf die jeweilige Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen (Laemmli-Puffersystem). Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendete Längenstandards: Fermentas SM0431. Grün markiert sind die Proteine, die in älteren Bienen exprimiert werden (s. Tabelle 28): Alpha-Gluc = Alpha-Glucosidase-II, CE1 = Carboxylesterase1, Enolase und SP = Serinprotease. Schwarz markiert sind die bekannten ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II und IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor 4. Rot markiert sind IRp30 und die viralen Capsidproteine VP 1/4, VP 2 und VP 3. (B, D) Hemmhoft-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität. Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *M. flavus*. 1,5  $\mu$ l der gleichen Hämolympfproben wie auf den Gelen (1-8) wurden aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 1,5  $\mu$ l Lysozym (L, 10 mg/ml) diente als Kontrolle.

Weitaus auffälliger ist jedoch das Ergebnis des Hemmhof-Tests. Anders als bei Jungbienen, deren Hämolymphe nach ABPV-Infektion keinerlei antimikrobielle Aktivität aufweist (Abb. 36B, D), ist in der Hämolymphe der 8d-alten Bienen nach Virus-Infektion eine starke antimikrobielle Aktivität nachweisbar, wenn auch immer noch schwächer als nach *E. coli* Injektion (Abb. 39B, D). Nicht irritieren lassen darf man sich von der dunklen Färbung der Auftropfstelle der n.i.-Proben. Diese dunkle Färbung bei den Hemmhof-Tests ist typisch für Hämolympfproben von älteren Bienen und führt leider dazu, dass sie auf Fotos leicht mit echten Hemmhöfen verwechselt werden können, während bei Betrachtung der Original-Hemmhöfe auf der Agarplatte eindeutig der Bakterienrasen erkennbar ist.

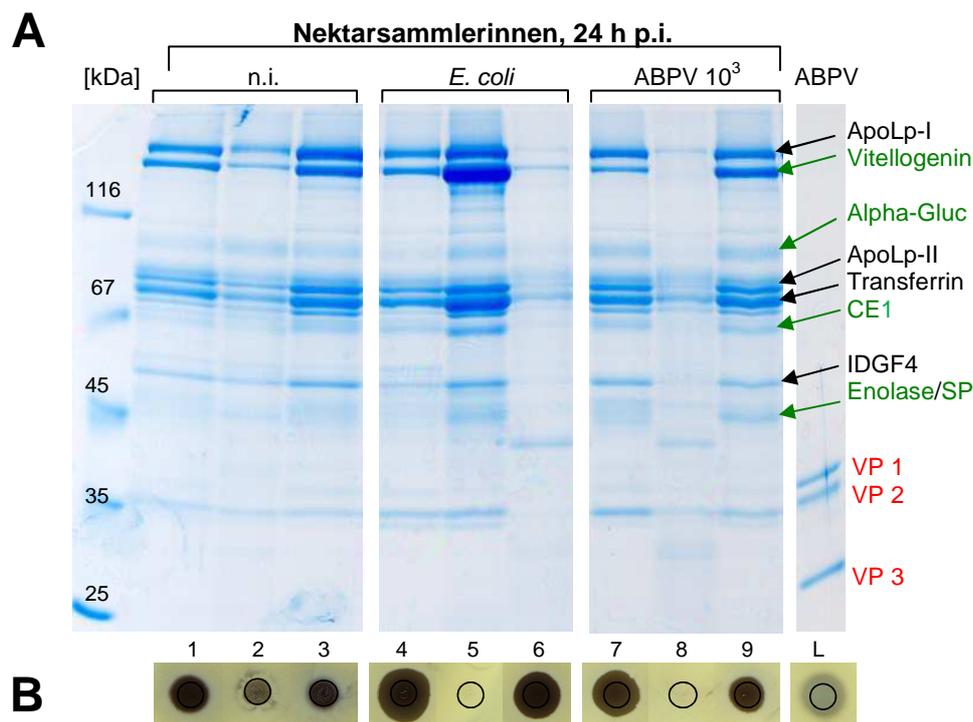
Betrachtet man die Anzahl überlebender 8d-alter Bienen in diesem Versuch, dann zeigt sich vor allem, dass eine erkennbare Virusvermehrung im Hämolympf-Proteinmuster 24 h p.i. (Abb. 39C) wohl nicht ausreicht, um die Bienen im weiteren Verlauf zu töten (Tabelle 35).

**Tabelle 35: Anzahl überlebender 8d-alter Bienen (%) zu verschiedenen Zeitpunkten nach ABPV-Infektion.**

Stunden (h) p.i.	nicht-infiziert (n.i.)	<i>E. coli</i> 10 <sup>5</sup>	ABPV-Partikel	
			10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
6	<b>100</b> (25/25)*	<b>100</b> (15/15)	<b>100</b> (15/15)	<b>100</b> (15/15)
12	<b>100</b> (21/21)	<b>100</b> (12/12)	<b>100</b> (12/12)	<b>100</b> (12/12)
18	<b>100</b> (16/16)	<b>100</b> (7/7)	<b>100</b> (6/6)	<b>100</b> (6/6)
24	<b>100</b> (10/10)	<b>100</b> (10/10)	<b>100</b> (11/11)	<b>100</b> (11/11)
48	<b>80</b> (4/5)	<b>100</b> (8/8)	<b>100</b> (7/7)	<b>100</b> (5/5)

\* In Klammern: Anzahl überlebender Bienen im Verhältnis zur Gesamtanzahl

Bei der Betrachtung von Nektarsammlerinnen (Abb. 13), erkennt man im Hämolympf-Proteinmuster auch bei gleichaltrigen Individuen individuelle Unterschiede. Bei unterschiedlich alten Nektarsammlerinnen (Abb. 40) sind diese Unterschiede noch etwas extremer und erschweren Aussagen über eine mögliche Reaktion auf Injektion von *E. coli* oder ABPV. Das betrifft auch die Ergebnisse des Hemmhof-Tests, denn bei zwei Individuen gibt es als Reaktion nicht einmal die ansonsten typische Braunfärbung (Abb. 40, Spur 5 und 8). Man kann zumindest sagen, dass es innerhalb der ersten 24 h p.i. zu keiner sichtbaren Virusvermehrung kommt.



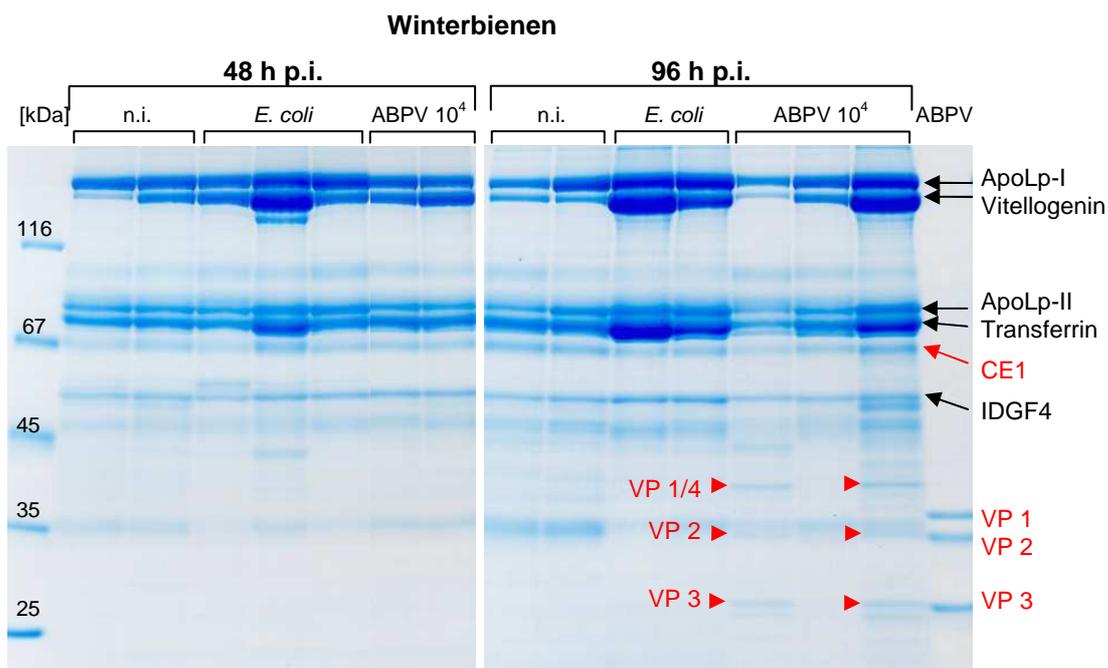
**Abb. 40: Vermehrung von ABPV in Nektarsammlerinnen.**

n.i.: nicht-infiziert, *E. coli*: Injektion von  $10^4$  Zellen lebende *E. coli* 682, ABPV  $10^3$ : Injektion von  $10^3$  Partikeln. Die Nektarsammlerinnen wurden vor dem Flugloch abgefangen. (A) Je 1,2  $\mu$ l Hämolymphe wurden auf die jeweilige Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen und anschließend im Laemmli-Puffersystem einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431.

Grün markiert sind diejenigen Proteine, die in älteren Bienen exprimiert werden: Vitellogenin, Alpha-Gluc = Alpha-Glucosidase, CE1 = Carboxylesterase1, Enolase und SP = Serinprotease. Schwarz markiert sind ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, Transferrin und IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor4. Rot markiert sind die viralen Capsidproteine VP 1, VP 2 und VP 3.

(B) Hemmhof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität. Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *M. flavus*. 1,5  $\mu$ l der gleichen Hämolympfproben wie auf den Gelen (1-9) wurden aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 1,5  $\mu$ l Lysozym (L, 10 mg/ml) diente als Kontrolle.

Während eine injizierte ABPV-Partikelzahl von  $10^4$  bei Jungbienen schon 18 h p.i. zu einer deutlichen Virusvermehrung führt (Abb. 36) und bei 8d-alten Bienen immerhin 24 h p.i. eine leichte Virusvermehrung sichtbar wird, so hat diese ABPV-Infektion auf Winterbienen nur eine äußerst schwache Auswirkung. Erst 96 h p.i. wird bei  $10^4$  injizierten Viruspartikeln eine leichte Virusvermehrung sichtbar und die Zahl an Überlebenden sinkt deutlich, allerdings ist anzumerken, dass die Anzahl an Überlebenden nach ABPV-Infektion ebenso stark zurückgeht wie nach Injektion von *E. coli* (Abb. 41, Tabelle 36).



**Abb. 41: Sichtbare Vermehrung von ABPV in Winterbienen nach 96 h.**

n.i.: nicht-infiziert, *E. coli*: Injektion von  $10^5$  Zellen lebende *E. coli* 682, ABPV  $10^4$ : Injektion von  $10^4$  Partikeln. Die Winterbienen wurden am 1.3.10 direkt aus der Wintertraube gesammelt. Die Hämolympfproben wurden 48 und 96 h p.i. entnommen. Je 1,2  $\mu$ l Hämolymphe wurden auf die jeweilige Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen und anschließend im Laemmli-Puffersystem einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431.

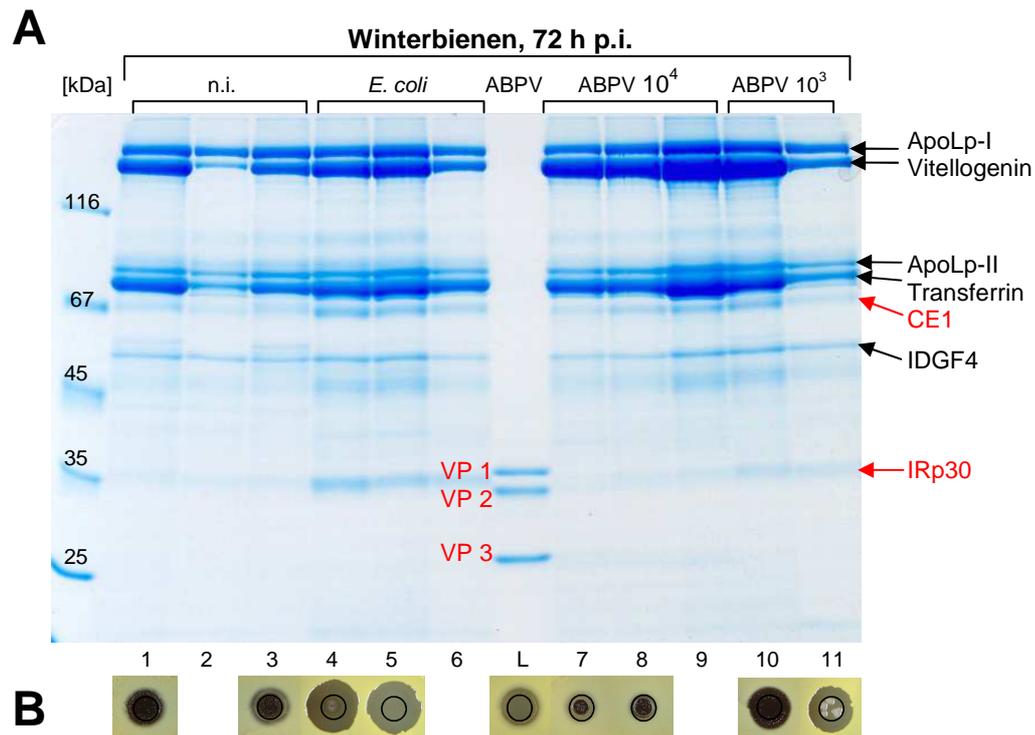
ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, Vitellogenin, Transferrin, CE1 = Carboxylesterase1, IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor4.

**Tabelle 36: Anzahl überlebender Winterbienen (%) zu verschiedenen Zeitpunkten nach ABPV-Infektion.**

Stunden (h) p.i.	nicht-infiziert	<i>E. coli</i>	ABPV-Partikel	
	(n.i.)	$10^5$	$10^4$	$10^3$
24	<b>100</b> (22/22)*	<b>100</b> (26/26)	<b>84</b> (25/21)	<b>100</b> (25/25)
48	<b>100</b> (18/18)	<b>91</b> (22/20)	<b>94</b> (17/16)	<b>100</b> (21/21)
72	<b>100</b> (14/14)	<b>88</b> (16/14)	<b>83</b> (12/10)	<b>100</b> (17/17)
96	<b>100</b> (10/10)	<b>70</b> (10/7)	<b>67</b> (6/4)	<b>92</b> (13/12)

\* In Klammern: Anzahl überlebender Bienen im Verhältnis zur Gesamtanzahl

Interessanterweise zeigt die Hämolymphe von Winterbienen selbst bei nicht-infizierten Individuen antimikrobielle Aktivität und auch die Hämolymphe ABPV-infizierter Winterbienen ist antimikrobiell aktiv, wenn auch bei der höheren Partikelzahl nicht ganz so aktiv (Abb. 42B, Proben 7-8).



**Abb. 42: Vermehrung von ABPV in Winterbienen.**

n.i.: nicht-infiziert, *E. coli*: Injektion von  $10^5$  Zellen lebende *E. coli* 682, ABPV  $10^4$  und  $10^3$ : Injektion von  $10^4$  bzw.  $10^3$  Partikeln. Die Winterbienen wurden am 15.2.10 direkt aus der Wintertraube gesammelt. Die Hämolympfproben wurden 72 h p.i. entnommen. (A) Je 1,2  $\mu$ l Hämolymphe wurden auf die jeweilige Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels aufgetragen und anschließend im Laemmli-Puffersystem einer Elektrophorese unterzogen. Die anschließende Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431.

ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, Vitellogenin, Transferrin, CE1 = Carboxylesterase1, IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor4. Sowohl konstitutiv in der Hämolymphe vorhandene, als auch nach Injektion von *E. coli* hochregulierte Proteine sind rot markiert: Carboxylesterase1 und IRp30 = Immune-Responsive protein 30.

(B) Hemmehof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität. Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *M. flavus*. 1,5  $\mu$ l der gleichen Hämolympfproben wie auf den Gelen (1-11) wurden aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit den Proben der Spuren 2, 6 und 9 wurde kein Hemmehof-Test gemacht. 1,5  $\mu$ l Lysozym (L, 10 mg/ml) diente als Kontrolle.

#### 4.9. Doppelinfektion mit ABPV und *E. coli*

Wie bereits gezeigt, reagieren sowohl Larven als auch Jungbienen auf die Injektion von Elizitoren wie lebende *E. coli* Bakterien mit einer starken humoralen Immunantwort, die sowohl im Gel, in Form von Hymenoptaecin und Defensin1, als auch im Hemmehof-Test nachweisbar ist. Zwei zusätzliche Proteine, die parallel zu Bestandteilen der humoralen Immunantwort exprimiert werden, sind IRp30 und Carboxylesterase1. Bei einer ABPV-Infektion ist es jedoch so, dass Larven und Jungbienen stark unterschiedlich reagieren, allerdings für beide nie eine humorale Immunantwort im Hemmehof-Test nachgewiesen

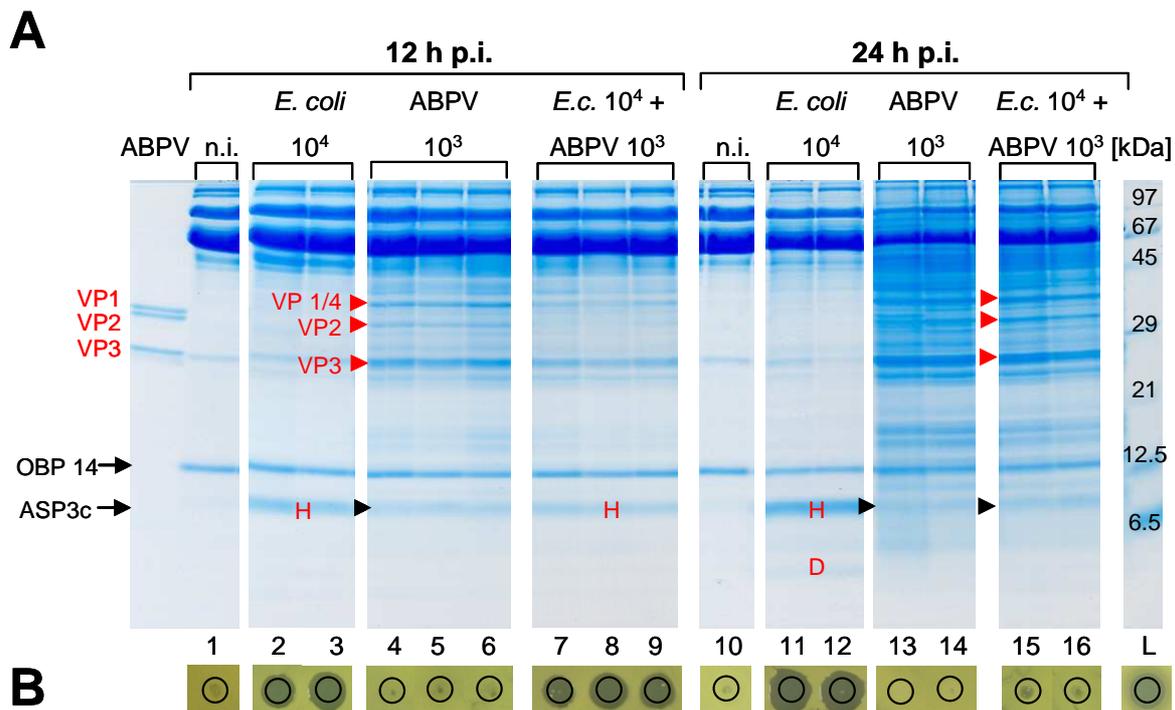
werden konnte. Die beobachtete antimikrobielle Aktivität in den wenigen Hemmhof-Tests von ABPV-infizierten älteren Bienen wird in der weiteren Betrachtung vorerst vernachlässigt, da dazu nur wenige Ergebnisse vorliegen und sowohl bei Nektarsammlerinnen als auch bei Winterbienen auch nicht-infizierte Individuen antimikrobielle Substanzen in der Hämolymphe aufweisen.

Es stellt sich nun die Frage, ob die ABPV-Infektion die angeborene humorale Immunantwort komplett unterdrückt oder ob die humorale Immunantwort in Form von neu-synthetisierten Proteinen während einer ablaufenden Virusinfektion einfach auf der Strecke bleibt, da die Proteinsynthese-Maschinerie des Wirts auf Virusproteine umgestellt wird. Um dies zu prüfen, wurde die Reaktion von Larven und Jungbienen auf Injektion von *E. coli* und ABPV allein untersucht, aber auch die Reaktion auf eine gleichzeitige Injektion beider Pathogene.

#### 4.9.1. Doppelinfektion von Larven

Bereits 12 h nach Injektion von  $10^3$  ABPV-Partikeln kann man die Virusvermehrung in Form der exprimierten Capsidproteine VP 1/4, VP 2 und VP 3 erkennen. Ebenso erkennt man die deutliche Expression von Hymenoptaecin (H) nach Injektion von *E. coli*-Zellen, als auch nach einer Doppelinfektion von ABPV und *E. coli* (Abb. 43A). Auch zeigen die Hämolympfproben dieser beider Gruppen im Hemmhof-Test starke antimikrobielle Aktivität (Abb. 43B). Im Gegensatz dazu weist das Hämolympf-Proteinmuster der ABPV-infizierten Larven, wie bereits bekannt, keinerlei Expression immunspezifischer Peptide auf, ebenso wenig konnte eine antimikrobielle Aktivität dieser Hämolympfproben im Hemmhof-Test nachgewiesen werden. Ein Protein, das auf den ersten Blick leider leicht mit Hymenoptaecin verwechselt werden kann, da es die gleiche molekulare Masse aufweist, ist ASP3c, ein antennenspezifisches Protein, dessen Expression in älteren Larven beginnt. Mittels nano-LC-ESI-MS/MS-Analyse konnte allerdings die Anwesenheit von ASP3c und vollständige Abwesenheit von Hymenoptaecin in nicht-infizierten Individuen und in ABPV-infizierten Individuen bestätigt werden (Abb. 43A).

Nach 24 h p.i. ist nur noch im Hämolympf-Proteinmuster der *E. coli*-Gruppe Hymenoptaecin nachweisbar, außerdem ist Defensin1 (D) hinzugekommen. Es ist auch nur noch für die Hämolympfproben dieser Gruppe antimikrobielle Aktivität im Hemmhof-Test nachweisbar. Die Hämolympfproben der doppelinfizierten Gruppe (ABPV und *E. coli*), die 12 h p.i. antimikrobielle Aktivität zeigten, sind 24 h p.i. negativ. Allerdings erkennt man nun im Proteinmuster der doppelinfizierten Gruppe eine starke Virusvermehrung (Abb. 43A).



**Abb. 43: Zeitlicher Verlauf einer Doppelinfektion von Larven.**

n.i.: nicht-infiziert, *E. coli* 10<sup>4</sup>: Injektion von 10<sup>4</sup> lebenden *E. coli* Zellen, ABPV 10<sup>3</sup>: Anzahl der injizierten ABPV-Partikel, *E.c. 10<sup>4</sup> +* ABPV 10<sup>3</sup>: gleichzeitige Injektion der beiden Elizitoren in der angegebenen Konzentration. Die Hämolympfproben wurden 12 und 24 h p.i. entnommen. (A) Je 1,2 µl der Hämolymphe eines einzelnen Individuums wurde auf eine Spur eines 15 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendete Längenstandards: Serva 39208.01 und 39209.01. Als Kontrolle (ABPV) dienten 7 µl der ABPV-Suspension. OBP 14 = Odorant binding protein 14, ASP3c = Antennal-specific protein 3c. Rot markiert: induzierte virale Capsidproteine VP 1/4, VP 2, VP 3 und induzierte AMPs: H = Hymenoptaecin und D = Defensin1. (B) Hemmhof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität. Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *M. flavus*, die als Rasen auf eine Agarplatte ausgebracht wurde. 1,5 µl der gleichen Hämolympfproben wie auf den Gelen (1-16) wurden aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 1,5 µl Lysozym (L, 10 mg/ml) diente als Kontrolle.

So wie es aussieht, führt eine reine ABPV-Infektion in Larven zwar zu keiner humoralen Immunantwort, allerdings wird sie wohl auch nicht durch eine ABPV-Infektion unterdrückt, da es bei einer Doppelinfektion in den ersten 12 h p.i. zur Expression von AMPs kommt. Allerdings beginnt die Virusvermehrung in doppelinfizierten Larven zeitlich etwas verzögert, auch wenn sie 24 h p.i. genauso stark scheint wie in den ABPV-infizierten Larven. Und erst dann, 24 h p.i., wenn die Virusvermehrung auf Hochtouren läuft, ist keine Expression von AMPs mehr nachweisbar. Betrachtet man die Überlebensraten von doppelinfizierten Larven, so erkennt man, dass zwischen dem Überleben einer Doppelinfektion oder einer reinen ABPV-Infektion kein allzu starker Unterschied besteht (Tabelle 37). Der auf den ersten Blick stark anmutende Unterschied in diesem Versuch ist bei genauerer Betrachtung nur auf eine einzige Larve zurückzuführen und relativiert sich damit.

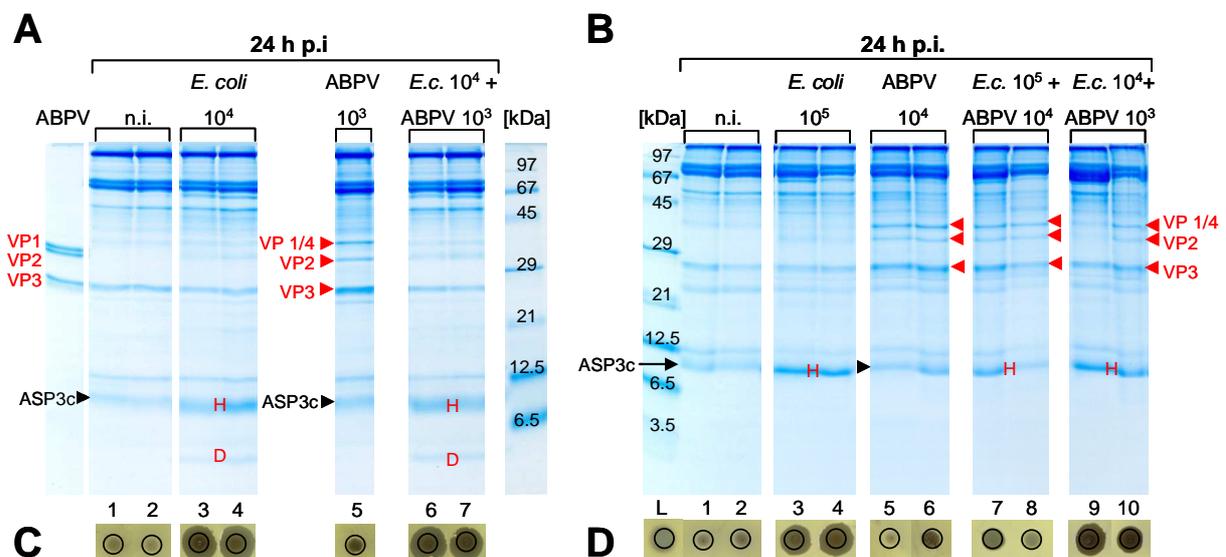
**Tabelle 37: Anzahl überlebender doppelinfizierter Larven (%) zu verschiedenen Zeiten nach Infektion.**

Stunden (h) p.i.	nicht-infiziert (n.i.)	<i>E. coli</i> 10 <sup>5</sup>	ABPV 10 <sup>3</sup>	<i>E.c.</i> 10 <sup>4+</sup> ABPV 10 <sup>3</sup>
12	<b>100</b> (10/10)*	<b>100</b> (10/10)	<b>80</b> (8/10)	<b>80</b> (8/10)
24	<b>100</b> (5/5)	<b>80</b> (4/5)	<b>20</b> (1/5)	<b>0</b> (0/5)

\* In Klammern: Anzahl überlebender Larven im Verhältnis zur Gesamtanzahl.

#### 4.9.2. Doppelinfektion von Jungbienen

Für die Auswirkung einer Doppelinfektion in Jungbienen wird lediglich der 24 h-Zeitwert betrachtet, da vorher noch keine ausreichende Virusvermehrung in Jungbienen nachweisbar ist und Hämolympfproben von späteren Zeitwerten als 24 h, in denen eine noch stärkere Virusvermehrung sichtbar wäre, sehr schwer erhältlich sind, da die Bienen nach ihrem Tod schnell austrocknen.

**Abb. 44: Auswirkung einer Doppelinfektion von Jungbienen.**

n.i.: nicht-infiziert, *E. coli* 10<sup>4</sup>: Injektion von 10<sup>4</sup> lebenden *E. coli* Zellen, ABPV 10<sup>3</sup> bzw. 10<sup>4</sup>: Anzahl der injizierten ABPV-Partikel, *E.c.* 10<sup>x</sup> + ABPV 10<sup>x</sup>: gleichzeitige Injektion der beiden Elizitoren in der angegebenen Konzentration. Die Hämolympfproben wurden 24 h nach Injektion (p.i.) entnommen.

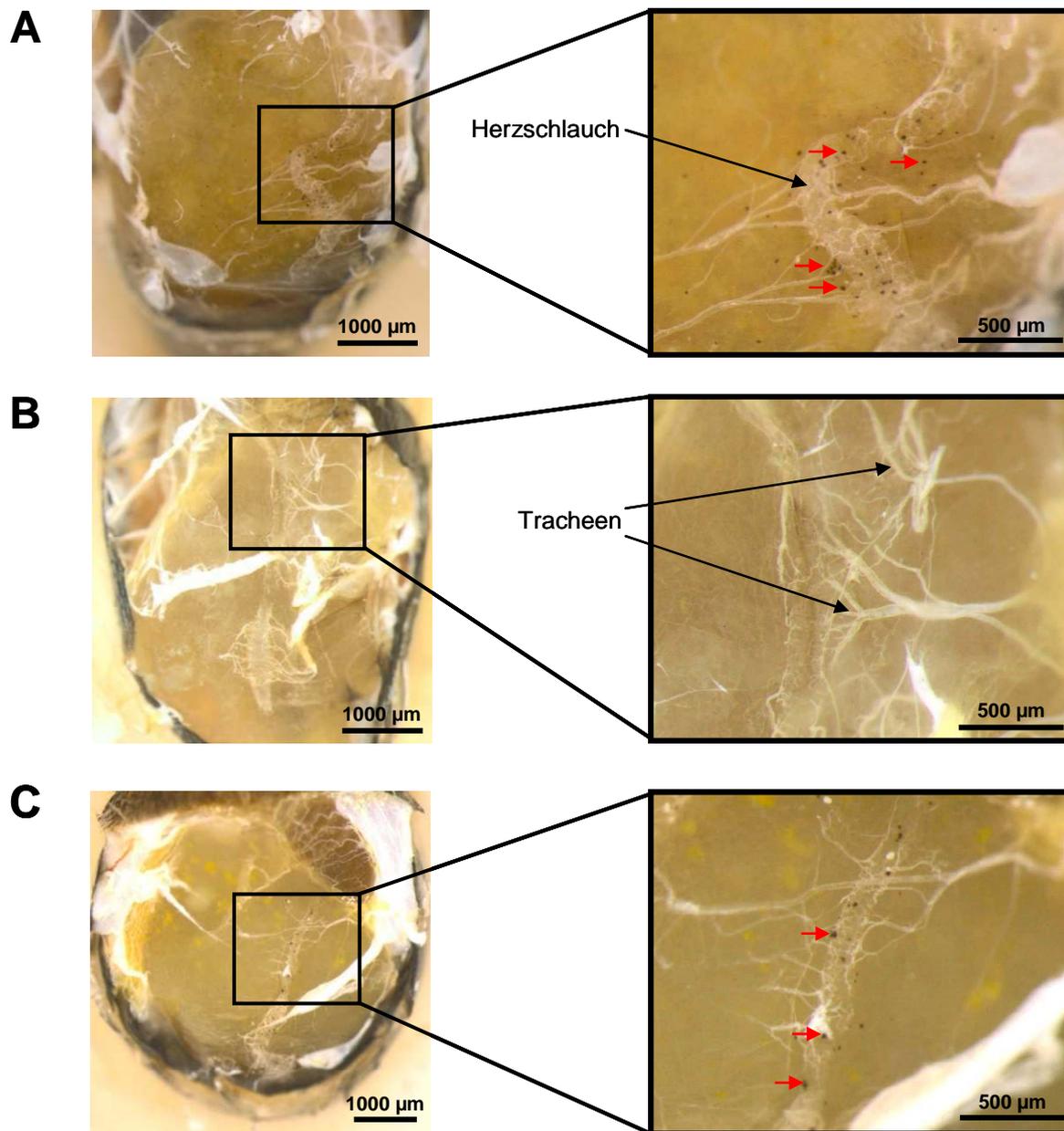
(A, B) Je 1,2 µl der Hämolymphe eines einzelnen Individuums wurde auf eine Spur eines 15 % PAA/0,1 % SDS Gels (A = Laemmli-Puffersystem, B = Tricine-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendete Längenstandards: Serva 39208.01 und 39209.01. Als Kontrolle (ABPV) dienten 7 µl der ABPV-Suspension. ASP3c = Antennal-specific protein 3c. Rot markiert: induzierte virale Capsidproteine: VP 1/4, VP 2 und VP 3 und induzierte AMPs: H = Hymenoptaecin und D = Defensin1. (C, D) Hemmhof-Test zum Nachweis antimikrobieller Aktivität. Als Indikatorbakterium diente eine frische Übernachtskultur von *M. flavus*, die als Rasen auf eine Agarplatte ausgebracht wurde. 1,5 µl der gleichen Hämolympfproben wie auf den Gelen (1-7) wurden aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Lysozym (L, 10 mg/ml) diente als Kontrolle.

In beiden ABPV-Gruppen (Abb. 44A, B) ist 24 h p.i. eine starke Virusvermehrung in Form der Capsidproteine VP 1/4, VP 2 und VP 3 ersichtlich. Ebenso ist in den Hämolympf-Proteinmustern der beiden *E. coli*-Gruppen und der doppelinfizierten Gruppen die Expression von Hymenoptaecin und teilweise auch Defensin1 erkennbar (Abb. 44A, B). Leider macht, ebenso wie bei Larven, das Vorhandensein des Antennal-specific protein 3c eine Aussage allein anhand des Gelbildes unmöglich, da ASP3c die gleiche molekulare Masse wie Hymenoptaecin aufweist. Jedoch wurde auch hier das Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein des jeweiligen Proteins mittels MS-Analysen bestätigt. Die Hemmhof-Tests zeigen starke antimikrobielle Aktivität in den Hämolympfproben der *E. coli*-Gruppen und der doppelinfizierten Gruppen, allerdings nicht ganz so starke Aktivität in der doppelinfizierten Gruppe mit der höheren Viruskonzentration (*E. coli* + ABPV  $10^4$ , Abb. 44B). Zusätzlich zeigen auch die Hämolympfproben der ABPV-Gruppen leichte antimikrobielle Aktivität, was gelegentlich in ABPV-infizierten Jungbienen vorkommt. Genau wie bei Larven führt eine ABPV-Infektion bei Jungbienen offensichtlich zu keiner Unterdrückung der humoralen Immunantwort auf eine gleichzeitige *E. coli*-Injektion. Bei einer Doppelinfektion in Jungbienen kommt es zu Schwankungen zwischen einzelnen Versuchsreihen. Bei einigen Versuchen konnten nur Hymenoptaecin und eventuell auch Defensin1 entdeckt werden, jedoch gab es keine Zeichen für eine Virusvermehrung (Abb. 44A). In wieweit die Virusvermehrung möglicherweise in den folgenden Stunden aufholt, konnte leider nicht überprüft werden, da die doppelinfizierten Bienen relativ rasch starben. In anderen Fällen jedoch konnte sowohl Hymenoptaecin, als auch die viralen Capsidproteine in der Hämolymphe nachgewiesen werden (Abb. 44B).

#### 4.9.3. Auswirkungen einer ABPV-Infektion auf die Nodulation

Eine wichtige Form der zellulären Immunabwehr ist die Nodulation. Ein erster Schritt ist die Mikroaggregation, das heißt 10-20 Hämozyten bilden zusammen mit Bakterien kleine Aggregate. Diese wachsen weiter und bilden schließlich Noduli, die mit einer abschließenden Schicht aus Hämozyten umschlossen werden. Durch Melanisierung dieser Schicht werden die Noduli dunkel (Stanley und Miller, 2006). So kann man z.B. nach Injektion von  $10^4$  Zellen lebender *E. coli* Bakterien die entstandenen Noduli leicht als schwarze Punkte unter der Stereolupe erkennen, sie befinden sich hauptsächlich entlang des Herzschlauches und der Tracheen (Abb. 45A).

In Experimenten mit Larven der parasitischen Wespe *Pimpla turionellae* und der Wachsmotte *Galleria melonella* wurde nachgewiesen, dass diese beiden Insekten auch auf Injektion des Bovinen Herpes Simplex Virus-1 mit Nodulibildung reagieren (Büyükgüzel et al., 2007; Durmuş et al., 2008). Daher lag es nahe diese Möglichkeit auch für ABPV zu prüfen.



**Abb. 45: Nodulibildung nach einer septischen Injektion.**

Jeweils 10 Jungbienen wurden (A)  $10^4$  Zellen lebende *E. coli*, (B)  $10^3$  ABPV-Partikel und (C)  $10^4$  Zellen lebende *E. coli* +  $10^3$  ABPV-Partikel injiziert. 24 h p.i. wurden unter einem Stereomikroskop (Olympus SZX7) die abdominalen Tergite entfernt und mit einer Olympus UC30-Kamera mehrere Fotos gemacht. Die Vergrößerung beträgt 25 für das gesamte Abdomen und 75 für die Detail-Aufnahme. Die roten Pfeile zeigen auf melanisierte Noduli.

Es wurden Jungbienen als Versuchsobjekte gewählt, da sie auf eine *E. coli*-Injektion eine starke Nodulibildung zeigen, während Larven nur äußerst schwach mit Nodulibildung reagieren (persönliche Kommunikation, H. Gätschenberger). Es wurden in drei Versuchsreihen Jungbienen  $10^3$  oder  $10^4$  Viruspartikel injiziert und 24 h p.i. überprüft, ob sich Noduli gebildet haben (Abb. 45B). Bei keiner dieser Bienen kam es zu einer Nodulireaktion, während es bei allen Bienen, denen *E. coli* injiziert wurden, zu einer starken Reaktion kam (durchschnittlich 108 Noduli pro Biene; Abb. 45A). Außerdem wird ergänzend zu den Ergebnissen der Auswirkung einer Doppelinjektion auf die humorale Immunantwort hiermit auch für die zelluläre Immunantwort gezeigt, dass sie zumindest nicht vollständig von einer ABPV-Infektion unterdrückt wird, da die gleichzeitige Injektion von ABPV-Partikeln und *E. coli* Bakterien ebenfalls zur Bildung von Noduli führt, wenn auch nicht so stark wie nach alleiniger Injektion von *E. coli* (durchschnittlich 52 Noduli pro Biene; Abb. 45C).

#### **4.10. Reaktion von Puppen auf eine ABPV-Infektion**

In Kapitel 4.1.2. wird gezeigt, dass Puppen zumindest in den ersten 24 h p.i. keine humorale Immunantwort exprimieren. Zudem wird in Kapitel 4.4.3. gezeigt, dass sich injizierte *E. coli* Bakterien offensichtlich in Puppen vermehren und so zu ihrem Tod führen, der begleitet ist von einer ungewöhnlichen Graufärbung des ganzen Körpers. *Varroa*-Milben, die Hauptüberträger von Virusinfektionen, vermehren sich in verdeckelten Brutwaben, d.h. sie vermehren sich auf Puppen und ernähren sich von ihrer Hämolymphe. Damit erhalten Puppen natürlich eine hohe Virusmenge. Was passiert nun mit dem Virus in der Puppe? Laut Abb. 46 kommt es von Tag 1 bis 5 nur zu einer äußerst schwachen Virusvermehrung, erkennbar am Auftauchen des Capsidproteins VP 2 in allen virusinfizierten Puppen. Ebenso wie Larven und adulte Bienen reagieren auch Puppen nicht mit der Expression von antimikrobiellen Peptiden auf eine Virusinfektion. Man könnte daher meinen, die Virusinfektion hätte so gut wie keine Auswirkung auf Puppen. Betrachtet man allerdings das äußere Erscheinungsbild, so stellt man fest, dass sich ABPV-infizierte Puppen nicht mehr weiterentwickeln. Während die Körperhülle der nicht-infizierten Puppen ab Tag 4 p.i. anfängt zu melanisieren, geschieht nichts dergleichen bei Virus-infizierten Puppen (Abb. 47).

Obwohl das Hämolymphe-Proteinmuster und der Hemmhof-Test nur schwache Anzeichen für eine Auswirkung der Virusinfektion liefern, muss irgendetwas in den Puppen vor sich gehen, dass zu einem Entwicklungsstillstand führt.

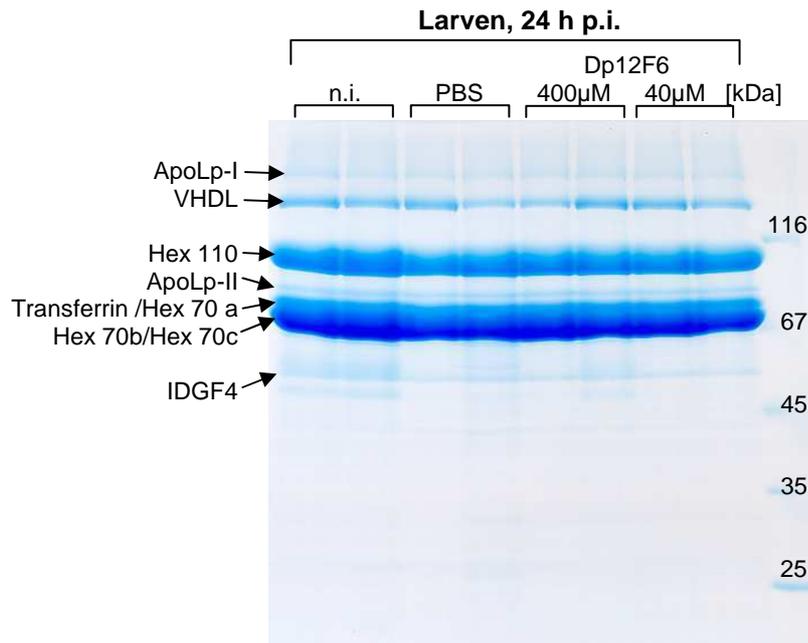


#### **4.11. Die Behandlung von ABPV mit einer künstlichen RNase (aRNase) führt zu einer Inaktivierung des Virus**

Künstliche RNasen (aRNasen) sind kleine, synthetische Moleküle, die das Phosphodiester-Rückgrat von RNA schneiden (Kuznetsova et al., 2005) und dem Virus dadurch die Möglichkeit nehmen sich in der Zelle vermehren zu können. Da die Virushülle beim Einsatz von künstlichen RNasen intakt bleibt, also ihre Antigen-Eigenschaften behält, eignen sich künstliche RNasen zur Herstellung von Impfstoffen (Goncharova et al., 2009). Fast alle Bienenviren besitzen ein RNA-Genom und eignen sich damit für eine Studie mit aRNasen. Im Besonderen eignet sich aber ABPV, da von Govan et al. (2000) die komplette Genomsequenz entschlüsselt wurde, von Bailey et al. (1963) die physico-chemischen Eigenschaften des Virions beschrieben wurden und die Auswirkungen einer ABPV-Infektion auf Honigbienen weitreichend untersucht wurden (Bailey et al., 1963; Genersch und Aubert, 2010). Außerdem kann eine ABPV-Suspension bei -20 °C stabil gelagert werden. Ein weiterer wichtiger Vorteil von ABPV liegt zudem darin, dass es bei einer Infektion von Bienenlarven zu einem schnellen Tod führt. Mit der künstlichen Larvenaufzucht liegt ein einfacher, im Labor zu handhabender Versuchsaufbau vor, der es ermöglicht innerhalb kürzester Zeit eine ganze Reihe an künstlichen RNasen auf ihre Wirksamkeit zu testen.

##### **4.11.1. Toxizitäts-Test an Larven**

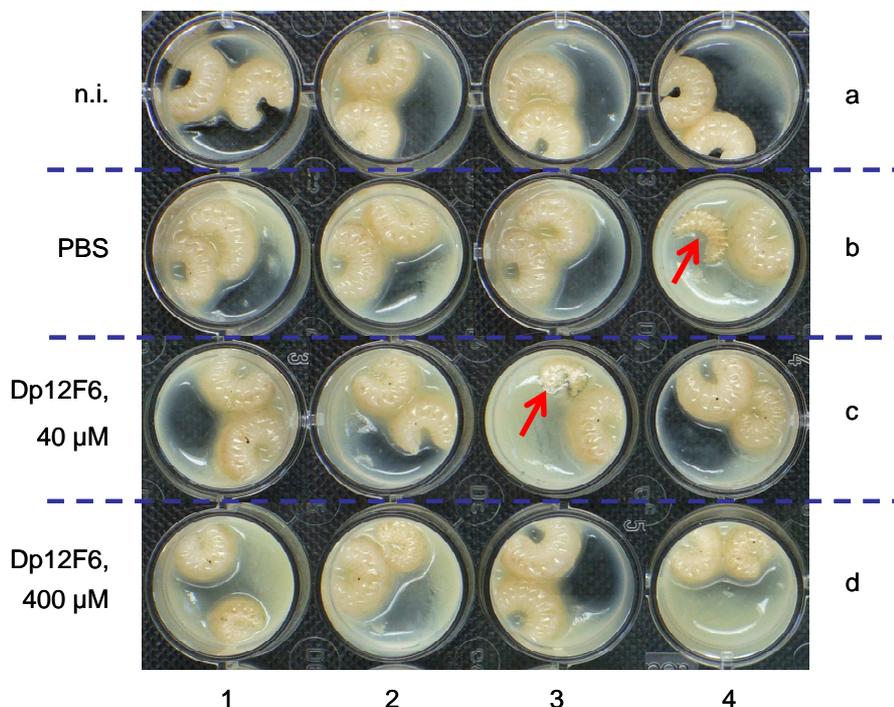
Die verwendete aRNase Dp12F6 wurde am „Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine“ in Novosibirsk (Russland) entwickelt und im Rahmen einer Zusammenarbeit von Frau Prof. Marina Zenkova zur Verfügung gestellt. In Vorversuchen stellte sie sich als wirksamste von fünf aRNasen bei der Inaktivierung von ABPV heraus (Fedorova et al., 2011). Eine Prüfung der Toxizität dieser aRNase zeigt, dass selbst hohe Konzentrationen von 400 und 40 µM keinerlei Auswirkungen auf das Hämolymp-Proteinmuster (Abb. 48) oder das äußere Erscheinungsbild haben (Abb. 49). Auch die in diesem Versuch ermittelte Sterblichkeit von 88 % bei 400 µM und 75 % bei 40 µM ist nicht erhöht im Vergleich zur Sterblichkeit von 75 % der Kontrollgruppe nach Verwundung (PBS-Injektion). Diese beiden doch sehr hohen Konzentrationen sind für Larven damit ungefährlich und haben keine Auswirkung auf das Überleben und das äußere Erscheinungsbild. Injiziert man nun eine ABPV-Lösung, die vorher mit Dp12F6 in den getesteten oder niedrigeren Konzentrationen behandelt wurde, so kann man sicher sein, dass die Ergebnisse allein auf ABPV und/oder dessen Inaktivierung zurückzuführen sind und kein Artefakt der aRNase sind.



**Abb. 48: Auswirkungen einer Injektion der künstlichen RNase Dp12F6 in Larven.**

n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, Dp12F6: Injektion einer 400 und 40 µM Lösung der künstlichen RNase Dp12F6. Alle Hämolympfproben wurden 24 h p.i. entnommen. Je 1,2 µl der Hämolymphe eines einzelnen Individuums wurde auf eine Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) aufgetragen und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431.

ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, VHDL = Very High Density Lipoprotein, Hex 110 = Hexamerin 110, Hex 70a/b/c = Hexamerin 70a/b/c, IDGF4 = Imaginal Disc Growth Factor4.



**Abb. 49: Äußeres Erscheinungsbild von Larven nach Injektion zweier unterschiedlicher Konzentrationen der aRNase Dp12F6 (24 h p.i.).**

n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, Dp12F6: Injektion einer 40 und 400 µM Lösung. Die roten Pfeile zeigen auf tote Larven.

#### 4.11.2. Wirksamkeit der künstlichen RNase Dp12F6

Nachdem geklärt war, welche Konzentrationen an Dp12F6 keine negativen Effekte auf Larven haben, wurde mit diesen und verschiedenen darunter liegenden Konzentrationen versucht, eine ABPV-Konzentration von  $10^4$  Partikeln/ $\mu$ l, d.h. der 100fachen  $LD_{50}$ , zu inaktivieren. Die hier gezeigten Ergebnisse dienten zum Ermitteln der niedrigsten Konzentration an Dp12F6, die noch in der Lage war, ABPV effizient zu inaktivieren. Als Kontrolle diente dieselbe ABPV-Konzentration mit derselben Vorbehandlung, allerdings ohne Zusatz der künstlichen RNase.

Anfänglich wurde die Lösung von ABPV+Dp12F6 vor der Injektion in Larven um eine Zehnerpotenz von  $10^4$  auf  $10^3$  Partikel verdünnt. Tabelle 38 zeigt die resultierenden Überlebensraten einer Versuchsreihe.

**Tabelle 38: Anzahl überlebender Larven nach Injektion von  $10^3$  ABPV-Partikeln inkubiert mit Dp12F6.**

ABPV + Dp12F6 ( $\mu$ M)	ABPV-Konzentration während Inkubation	ABPV-Konzentration für die Injektion	Überlebensrate (%) 25 h p.i.
40	$10^4$	$10^3$	<b>100</b> (10/10)*
4	$10^4$	$10^3$	<b>100</b> (10/10)
0,4	$10^4$	$10^3$	<b>9</b> (1/12)
0,04	$10^4$	$10^3$	<b>0</b> (0/12)
Kontrolle ABPV (-Dp12F6)	$10^4$	$10^3$	<b>0</b> (0/12)
n.i.	-	-	<b>100</b> (10/10)
PBS	-	-	<b>100</b> (4/4)

\* In Klammern: Anzahl überlebender Larven im Verhältnis zur Gesamtanzahl.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine 4  $\mu$ M Dp12F6 Lösung noch in der Lage ist, eine ABPV-Suspension mit  $10^4$  Partikeln/ $\mu$ l erfolgreich zu inaktivieren. Eine geringere Dosierung der aRNase von einer Zehnerpotenz führt in diesem Versuch schon zu einem massiven Rückgang der Überlebenden auf 9 %.

Dieser Versuch wurde für die Grenzwerte von 0,4 und 0,04  $\mu$ M wiederholt, gleichzeitig wurde parallel für die gleichen Konzentrationen an Dp12F6 die ABPV-Suspension auf dieselbe Art vorbehandelt, allerdings erfolgte vor der Injektion in Larven keine Verdünnung der fertigen Lösung ABPV+Dp12F6 mehr (Tabelle 39). Damit liegt die dann injizierte

ABPV-Lösung mit  $10^4$  Partikeln/ $\mu\text{l}$  insgesamt zwei Zehnerpotenzen über der  $\text{LD}_{50}$  von  $10^2$  Partikeln/ $\mu\text{l}$ , statt nur eine Zehnerpotenz wie in Tabelle 38 gezeigt. Eine unvollständige Inaktivierung hat bei der höheren Konzentration stärkere Auswirkungen und wird dadurch leichter ersichtlich.

Tatsächlich war es so, dass im Folgeversuch das Ergebnis der Wiederholung mit 17 % Überlebenden für eine  $0,4 \mu\text{M}$  Dp12F6-Lösung und 0 % für eine  $0,04 \mu\text{M}$  Dp12F6-Lösung in der gleichen Größenordnung lag wie zuvor beobachtet (Tabelle 38). Wurde nun für die gleichen Konzentrationen an Dp12F6 die inkubierte ABPV-Suspension vor Injektion nicht mehr verdünnt, so sank die Zahl Überlebender im Vergleich von 100 % auf 92 % für die  $40 \mu\text{M}$  Dp12F6-Lösung, von 100 % auf 4 % für die  $4 \mu\text{M}$  Dp12F6-Lösung und von hier 17 % auf 0 % für die  $0,4 \mu\text{M}$  Dp12F6-Lösung. Anders als im ersten Versuch suggeriert führt weder die  $4 \mu\text{M}$ , noch die  $40 \mu\text{M}$  Dp12F6-Lösung zu einer vollständigen Inaktivierung des Virus, auch wenn die  $40 \mu\text{M}$  Dp12F6-Lösung sehr nahe daran liegt. Es gilt zu beachten, dass vollständige Inaktivierung hier bedeutet, dass ausreichend ABPV-Partikel inaktiviert wurden, um keine Infektion der Larven mehr hervorzurufen. Es bedeutet nicht, dass auch tatsächlich alle vorhandenen Viruspartikel ausgeschaltet wurden.

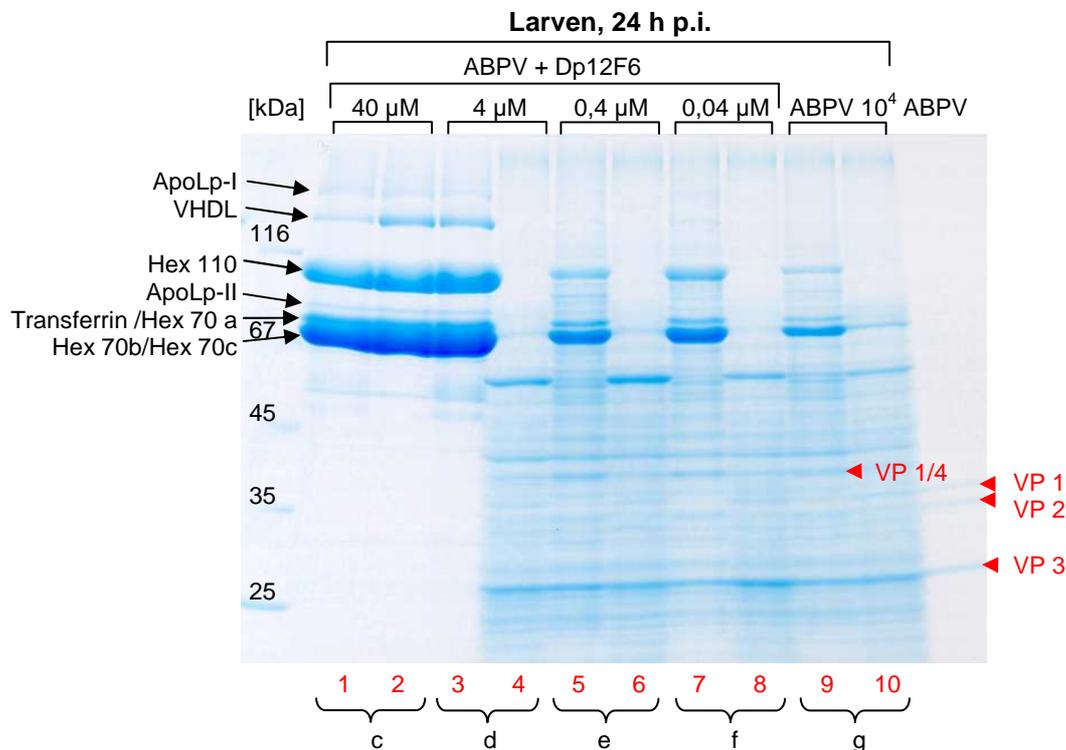
**Tabelle 39: Anzahl überlebender Larven nach Injektion von  $10^3$  und  $10^4$  ABPV-Partikeln inkubiert mit Dp12F6.**

ABPV + Dp12F6 ( $\mu\text{M}$ )	ABPV- Konzentration während Inkubation	ABPV- Konzentration für die Injektion	Überlebensrate (%) 24 h p.i.	Durchschnitts- gewichte der Larven
0,4	$10^4$	$10^3$	<b>17</b> (2/12)*	~ 96 mg
0,04	$10^4$	$10^3$	<b>0</b> (0/12)	~ 72 mg
40	$10^4$	$10^4$	<b>92</b> (11/12)	~ 123 mg
4	$10^4$	$10^4$	<b>50</b> (7/14)	~ 111 mg
0,4	$10^4$	$10^4$	<b>0</b> (0/14)	~ 62 mg
0,04	$10^4$	$10^4$	<b>0</b> (0/14)	~ 59 mg
Kontrolle ABPV (-Dp12F6)	$10^4$	$10^3$	<b>0</b> (0/12)	~ 67 mg
n.i.	-	-	<b>100</b> (8/8)	~ 142 mg
PBS	-	-	<b>75</b> (9/12)	~ 148 mg

\* In Klammern: Anzahl überlebender Larven im Verhältnis zur Gesamtanzahl.

Den überlebenden und toten Larven dieses Versuchs wurde Hämolymphe abgenommen und diese gelelektrophoretisch analysiert um zu prüfen, ob es zu Degradation oder zu einer

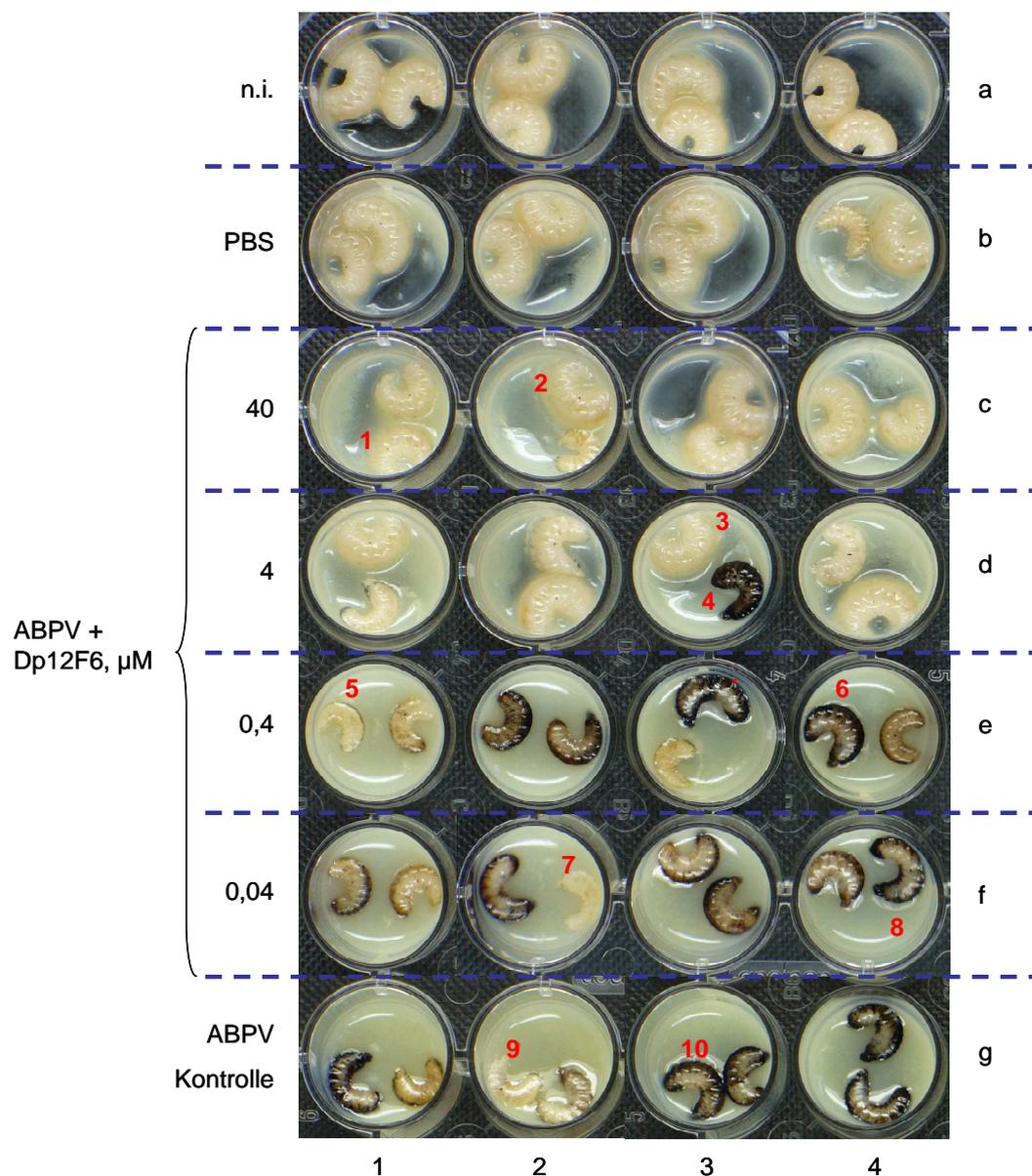
erkennbaren Virusvermehrung kam. Die dafür verwendeten Hämolympfproben und Larven sind sowohl in Abb. 50, als auch in Abb. 51 mit roten arabischen Ziffern markiert.



**Abb. 50: Injektion einer inaktivierten ABPV-Suspension in Larven.**

n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, ABPV+Dp12F6: Injektion einer ABPV-Suspension, die jeweils mit 40  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 0,4  $\mu$ M und 0,04  $\mu$ M der künstlichen RNase Dp12F6 inkubiert wurde. ABPV  $10^4$ : Injektion von  $10^4$  ABPV-Partikeln zur Kontrolle. Alle Hämolympfproben wurden 24 h p.i. entnommen und auf eine Spur eines 10 % PAA/0,1 % SDS Gels (Laemmli-Puffersystem) aufgetragen und einer Elektrophorese unterzogen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau G250. Verwendeter Längenstandard: Fermentas SM0431. Die roten Pfeile zeigen auf die viralen Capsidproteine VP 1, VP 2 und VP 3. Die roten Ziffern beziehen sich auf die Larven in Abb. 50, deren Hämolymphe hier aufgetragen wurde. Die schwarzen Buchstaben zeigen die jeweiligen Konzentrations-Gruppen wie sie in Abb. 50 zu finden sind. ApoLp-I und -II = Apolipoprotein-I und -II, VHDL = Very High Density Lipoprotein, Hex 110 = Hexamerin 110, Hex 70a/b/c = Hexamerin 70a/b/c.

Spur 1 und 2 (ABPV+Dp12F6, 40  $\mu$ M) zeigen das typische Proteinmuster zweier unauffälliger, lebender Larven ohne Anzeichen einer Virusvermehrung oder Degradation. Auch das äußere Erscheinungsbild dieser zwei Larven (Abb. 51) ist unauffällig. Es ist offensichtlich eine ausreichende Menge der injizierten  $10^4$  ABPV-Partikel inaktiviert wurden. Dasselbe trifft für Spur 3 (ABPV+Dp12F6, 4  $\mu$ M) zu. Spur 4 hingegen zeigt das Hämolympf-Proteinmuster einer toten, schwarzen Larve (Abb. 50 und 51) und die aufgrund des Aussehens zu erwartende starke Degradation der hochmolekularen Proteine plus die zusätzlichen Banden der neu-induzierten Proteine. Die Hämolympfproben der Gruppen e, f und g stammen allesamt von toten Larven. Wobei jeweils die erste Spur einer Gruppe von einer toten, hellen Larve stammt und die zweite Spur von einer toten, schwarzen Larve (5-10 in Abb. 50 und 51).



**Abb. 51: Äußeres Erscheinungsbild von Larven 24 h nach Injektion inaktivierter ABPV-Suspensionen.** n.i.: nicht-infiziert, PBS: Injektion von Puffer = Verwundung, ABPV+Dp12F6: Injektion von  $10^4$  ABPV-Partikeln, die in Anwesenheit einer Dp12F6-Lösung von 40, 4, 0,4 und 0,04  $\mu\text{M}$  inkubierten, ABPV Kontrolle: Injektion von  $10^4$  ABPV-Partikeln, die auf dieselbe Art vorbehandelt wurden, allerdings ohne aRNase. Die roten arabischen Ziffern bezeichnen die Larven, deren Hämolymp-Proteinmuster in Abb. 49 gezeigt wird.

Das äußere Erscheinungsbild und das Hämolymp-Proteinmuster der Larven, die nach Injektion von offensichtlich unzureichend inaktivierten ABPV-Partikeln sterben, unterscheiden sich nicht vom äußeren Erscheinungsbild und vom Hämolymp-Proteinmuster der Larven, die nach alleiniger Injektion von  $10^3$  ABPV-Partikeln sterben. In den toten, hellen Larven zeigt sich die Virusvermehrung durch die Capsidproteinbanden VP 1/4, VP2 und VP 3, während in den toten, schwarzen Larven die Capsidproteinbanden VP 1, VP 2 und VP 3 stärker zutage treten.

## 5. Diskussion

Wie bereits erwähnt gibt es verschiedene Krankheiten, die oftmals als spezifisch für verschiedene Entwicklungsstadien der Honigbiene bezeichnet werden (Sanford, 1987). Bei näherer Betrachtung heißt spezifisch allerdings häufig, dass sich nur für ein bestimmtes Entwicklungsstadium spezifische Symptome nennen lassen. Es heißt jedoch nicht, dass sich diese Krankheiten nicht auch schädlich auf andere Entwicklungsstadien auswirken können. Eine genauere Betrachtung der Sackbrut zeigt, dass die eindeutigen Symptome nur bei der Brut beobachtet werden können, Ammenbienen allerdings als symptomlose Trägerinnen fungieren. Sie stecken sich an, infizieren eventuell noch eine Zeitlang andere Larven, fangen dann aber vorzeitig mit Nektar sammeln an und stellen somit keine Gefahr mehr für den Nachwuchs dar. Zusätzlich ist es wohl so, dass SBV-infizierte Bienen einen niedrigeren Energieumsatz aufweisen, dadurch schneller abkühlen, aus der Wintertraube fallen und sterben (Bailey und Ball, 1991).

In den letzten Jahren wird immer deutlicher, dass schädliche Effekte, vor allem von Viruserkrankungen, nicht nur auf ein Entwicklungsstadium beschränkt sind. Chen et al. (2006) untersuchten z.B. die vertikale Übertragung von KBV, SBV, DWV, BQCV und CBPV von infizierten Königinnen auf ihre Nachkommen und fanden heraus, dass der Prozentsatz an infizierten Nachkommen mit voranschreitender Entwicklung abnimmt. Waren z.B. Königinnen gleichzeitig mit BQCV und DWV infiziert, so waren es auch 100 % ihrer Eier, aber nur noch 22 bzw. 65 % der Larven und sogar nur noch 5 bzw. 13 % der adulten Bienen. Leider wurden keine möglichen Gründe angegeben, aber es ist wahrscheinlich, dass stark infizierte Individuen entweder von Ammenbienen entfernt werden oder aber nicht überleben. Im Gegensatz dazu werden neben DWV vor allem ABPV, KBV und IAPV über *Varroa* auf Puppen und adulte Bienen übertragen (de Miranda et al., 2010a; Genersch und Aubert, 2010), was z.B. im Fall von ABPV erwiesenermaßen schon bei Puppen zu einer erhöhten Sterblichkeit führt (Brødsgaard et al., 2000). Es kann also sein, dass es tendenziell zu starken Verlusten in der Bienenkolonie kommt, die einem Beobachter aber nicht auffallen, da das Volk im Frühjahr und Sommer einen Nettozuwachs zeigt. Erst im Winter wird es sehr wahrscheinlich nicht mehr in der Lage sein zu überleben (Genersch und Aubert, 2010).

Da sich Larven, Puppen und adulte Bienen morphologisch und physiologisch (Abb. 5) voneinander unterscheiden und offensichtlich zum Teil sehr unterschiedlich auf Infektionen reagieren, ist es naheliegend die Immunreaktionen aller drei Entwicklungsstadien separat zu betrachten und zu vergleichen. Zum Einen die Immunreaktion des Organismus auf einen

generell starken Aktivator des Immunsystems: das gram-negative Bakterium *Escherichia coli*, zum Anderen die Reaktion auf eine virale Infektion.

### **5.1. Aufbau und Prozessierung des Polyproteins ORF2 von ABPV**

Da die ABPV-Vermehrung in der Hämolymphe über Capsidproteinsynthese verfolgt werden konnte, wird im Folgenden darauf eingegangen, warum die in dieser Arbeit verwendete Benennung der Capsidproteine von anderen, neueren Arbeiten abweicht. Wie in Abb. 27 schematisch dargestellt, codiert ORF2 für ein Polyprotein, das in vier Capsidproteine prozessiert werden muss. Dabei wird in neueren Arbeiten (Tate et al., 1999; de Miranda et al., 2010a) von VP2/VP4/VP1/VP3 als Reihenfolge dieser Capsidproteine ausgegangen, wobei VP2 das größte Capsidprotein bezeichnet. Dies widerspricht allerdings 1. der Reihenfolge der Capsidproteine in Picornaviren (VP4/VP2/VP3/VP1; Kitamura et al., 1981), bei denen die Ziffern 1-4 die Capsidproteine in abnehmender Größe bezeichnen, 2. beispielsweise den tatsächlichen Größen der Capsidproteine des ebenfalls dicistronischen Cricket Paralyse Virus (CrPV), was in der Reihenfolge VP2/VP4/VP1/VP3 resultieren würde (Moore et al., 1980) und 3. ebenso der ursprünglichen Benennung der Capsidproteine von ABPV mit VP 1 als größtem Capsidprotein (Govan et al., 2000). Bleibt man dabei die Capsidproteine aufgrund ihrer Größe zu ordnen, kommt man zu der in dieser Arbeit dargestellten Reihenfolge VP1/VP4/VP2/VP3.

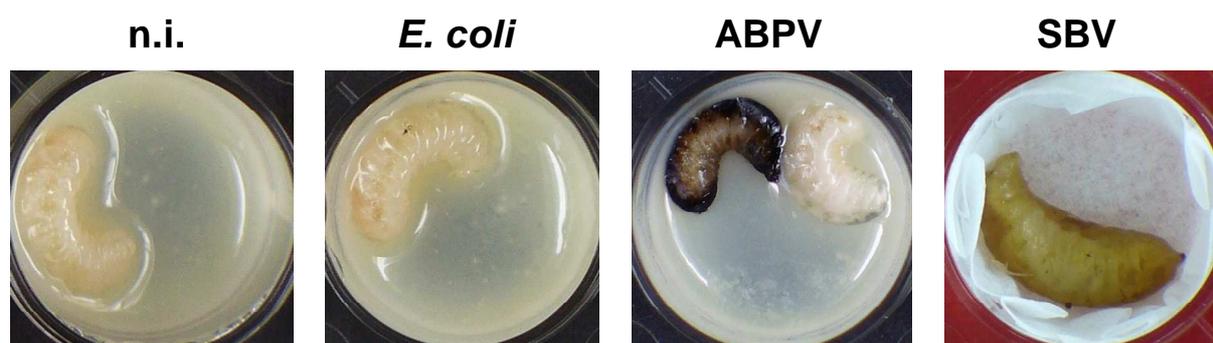
Die Generierung von vier Capsidproteinen aus einem Polyprotein verlangt drei Schnittstellen (Abb. 27 und 29). Schnittstelle I befindet sich zwischen VP1/VP4, Schnittstelle II zwischen VP4/VP2 und Schnittstelle III zwischen VP2/VP3 (Abb. 27). Die Schnittstellen I und III werden sehr wahrscheinlich von der viruseigenen 3C-Protease geschnitten, bei der es sich um eine chymotrypsin-ähnliche Cysteinprotease handelt, die nach einem konservierten Glutamin (Q) schneidet (Ryan und Flint, 1997; de Miranda et al., 2010a). Das Motiv von Schnittstelle II hingegen ist hochkonserviert in allen Dicistroviren (van Munster et al., 2002). Jedoch ist noch nicht genau bekannt wie an Schnittstelle II geschnitten wird. Tate et al. (1999) und Liljas et al. (2002) vermuten eine autokatalytische Prozessierung innerhalb des fertigen Viruspartikels, also zu einem sehr späten Zeitpunkt. Anstelle einer autokatalytischen Reaktion könnte aber auch ein noch unbekannter Prozess innerhalb der Wirtszelle eine Rolle spielen.

Bei der Virusvermehrung in Larven (Abb. 34) und adulten Bienen (Abb. 36) taucht zeitgleich und in denselben Mengen wie VP 2 und VP 3 ein Vorläuferprotein VP 0 auf, das aus VP 1 und VP 4 besteht. Das bedeutet, dass im Falle von ABPV nicht die Prozessierung der

Schnittstelle II, sondern vielmehr die Prozessierung der Schnittstelle I erst viel später erfolgt. In der Tat konnte VP 1 als einzelnes Protein erst kurz nach dem Zelltod detektiert werden (Abb. 34C). Dies stimmt überein mit Ergebnissen zur Vermehrung von CrPV und *Drosophila* C Virus (DCV) in *Drosophila* Zellen, wo ein Vorläuferprotein entdeckt wurde, das zu VP1/VP4 analog ist (Moore et al., 1980, 1981), was auch bei diesen beiden Viren den Schluss nahe legt, dass die Prozessierung der Schnittstelle I erst viel später stattfindet.

## 5.2. Reaktionen von Larven

ABPV-Infektionen sorgen erst seit der Verbreitung des Virus über die *Varroa*-Milbe für viele Völkerverluste, während ABPV-Infektionen vor der Einschleppung von *Varroa* als relativ harmlos betrachtet wurden (Ball, 1985; Genersch und Aubert, 2010). Da die Milbe nur Puppen und adulte Bienen parasitiert, überträgt sie das Virus auch nur auf diese beiden Entwicklungsstadien. Jedoch wurden ABPV und einige andere Viren, die Krankheiten hervorrufen, die man als spezifisch für adulte Bienen betrachtet, auch schon in Larven nachgewiesen (Ball, 1985; Chen et al., 2006). Ist nun das Immunsystem von Larven so stark, dass es Virusinfektionen ohne größere Probleme zurückdrängen kann oder sterben infizierte Larven einfach nur sehr schnell und werden schnell ersetzt, sodass in der Folge davon die Virusinfektion weitgehend unentdeckt bleibt?



**Abb. 52: Symptome einer viralen Infektion in Larven.** Nicht-infizierte (n.i.) Larven und Larven, denen LPS injiziert wurde, im Vergleich zu ABPV-infizierten Larven 24 h p.i. und SBV-infizierten Larven mind. 6 d p.i..

### 5.2.1. Auswirkungen einer Bakterieninfektion

Oberflächlich betrachtet scheint eine Injektion von *E. coli* keine Auswirkung auf Larven zu haben (Abb. 52). Ebenso verhält es sich bei Injektion anderer Elizitoren wie LPS oder Laminarin. Betrachtet man allerdings die Auswirkungen auf Proteinebene, so entdeckt man

nach Injektion verschiedener Elizitoren die Expression der bekannten, teils bienenspezifischen AMPs Hymenoptaecin, Defensin1 und Abaecin (Abb. 6A und 10). Diese Expression beginnt relativ früh und ist schon zwischen 6 und 12 h p.i. im Proteingel oder Hemmhof-Test nachweisbar (Abb. 9). Interessanterweise werden diese AMPs einzig und allein bei Larven auch schon nach bloßer Verwundung, d.h. Injektion eines Puffers, induziert. Es scheint als werden Larven, denen ein schützender Chitinpanzer fehlt, nach einer Verwundung zumindest durch die relativ rasche Expression von Hymenoptaecin, Defensin1 und Abaecin ziemlich gut geschützt. Die so induzierten AMPs werden allerdings viel rascher wieder abgebaut, als z.B. nach einer *E. coli*-Injektion (Abb. 7). Andere immunspezifische Proteine, wie sie z.B. in adulten Bienen exprimiert werden (Abb. 6B, Kap. 5.4.1.), werden in Larven nicht induziert.

### 5.2.2. Auswirkungen einer ABPV- oder SBV-Infektion

Wesentlich dramatischere Auswirkungen auf das äußere Erscheinungsbild der Larven haben einige Virusinfektionen (Abb. 52). Die Sackbrut wird als brutspezifische Erkrankung bezeichnet, da eine Infektion mit SBV dazu führt, dass die Larven nicht in der Lage sind sich zu verpuppen und sterben, was in stark durchseuchten Völkern zu einem beobachtbaren, massiven Brutverlust führt. Im Gegensatz dazu hat eine ABPV-Infektion einen negativen Effekt auf Puppen und adulte Bienen (Ball, 1985; Genersch und Aubert, 2010). Die vorliegende Arbeit zeigt darüber hinaus die wesentlich dramatischeren Effekte auf Larven (Abb. 34E und 52). Allerdings ist hier anzumerken, dass derart starke Symptome in der Natur sehr wahrscheinlich nicht vorkommen. Die dafür benötigte Partikelzahl ist zwar nicht allzu hoch, muss aber direkt in das Hämocoel injiziert werden. Ein Infektionsweg, dem Larven nicht ausgesetzt sind, da erst die weiterentwickelten Puppen von der *Varroa*-Milbe parasitiert werden. Für eine Infektion über das Futter sind wesentlich mehr ABPV-Partikel notwendig (Bailey et al., 1963). Dennoch ist dieser Infektionsweg in der Natur auch für Larven nicht auszuschließen, denn Bailey und Gibbs (1964) konnten zumindest für adulte Bienen zeigen, dass bei einer Fütterung durch infizierte Bienen die ABPV-Menge in den gefütterten Individuen zunimmt. Das Gleiche ist also für Larven denkbar, die von infizierten Ammenbienen gefüttert werden.

Betrachten wir die experimentelle Situation etwas genauer: während Injektionen von 10 Partikeln von den meisten Larven noch überlebt werden, so überleben nur noch 50 % der Larven eine Injektion von 100 Partikeln (=LD<sub>50</sub>; Tabelle 30; Fedorova et al., 2011). Eine

Injektion von 1000 Partikeln führt immer innerhalb weniger Stunden zu einer raschen Virusvermehrung in der Larve und damit zum Tod. Neben den viralen Proteinen werden in den letzten Stunden auch zahlreiche andere Proteine exprimiert, darunter allein vier Heatshock-Proteine, aber auch andere Proteine, die entweder an der Translation, dem Energiehaushalt oder dem Schutz vor oxidativem Stress beteiligt sind (Abb. 32 und 34, Tabelle 31). Die Reaktion von Larven auf eine ABPV-Infektion ist damit wesentlich dramatischer als die Reaktion von Jungbienen, denn 1. führen schon wesentlich geringere injizierte Virusmengen in Larven zum Tod (Tabelle 30, Abb. 31), zudem kommt es 2. zur Expression vieler neuer Proteine, und mit fortschreitender Virusvermehrung auch zum Abbau hochmolekularer Speicherproteine (Abb. 34) und 3. verläuft die Virusvermehrung relativ schnell und der Tod tritt meistens innerhalb von 24 h p.i. ein (Tabelle 32).

Während bislang davon ausgegangen wird, dass sich ABPV während einer Infektion im Gehirn und den Hypopharynxdrüsen anreichert, wobei eine aktive Virusvermehrung in diesen beiden Organen nicht nachgewiesen wurde (Bailey und Milne, 1969), zeigt Abb. 38, dass sich ABPV in Hämozyten vermehrt. Dass es sich dabei nicht bloß um Phagozytose infizierter Zellen handelt, sondern um eine echte Virusvermehrung, erkennt man am Vorhandensein von VP1/VP4 und der Abwesenheit von singulärem VP 1, wie es nur in der reinen Virus-Suspension (Abb. 28) oder kurz nach dem Tod nachzuweisen ist (Abb. 34C). Vielleicht führt eine ABPV-Vermehrung in Hämozyten dazu, dass die Virusvermehrung in Larven so viel schneller vonstatten geht als in Jungbienen, denn Larven besitzen mehr Hämozyten als adulte Bienen (Wilson-Rich, 2008). Für *Drosophila* und einige Lepidoptera-Arten konnte gezeigt werden, dass nur in Larven hämozytenbildende Organe vorhanden sind und auch nur in Larven Proliferation stattfindet (Lemaitre und Hoffmann, 2007; Strand, 2008). Andere zusätzliche Orte der Virusvermehrung, wie z.B. eben Gehirn oder Hypopharynxdrüsen, sind jedoch nicht auszuschließen, denn obwohl bei nur 10 injizierten Partikeln keine Virusvermehrung in der Hämolymphe nachweisbar ist (Abb. 31) geht die Anzahl an Überlebenden zurück (Tabelle 32).

Die Hauptabwehrstrategie gegen Virusinfektionen ist RNA-Interferenz (RNAi). Da in *Drosophila* die wesentliche Beteiligung der RNAi an der antiviralen Abwehr bei Infektionen mit den Dicistroviren DCV und CrPV nachgewiesen werden konnten (van Rij et al., 2006), und auch in Honigbienen die Funktionalität der RNAi-Maschinerie schon im Embryonalstadium erfolgreich nachgewiesen wurde (Beye et al., 2002), ist RNAi sehr wahrscheinlich auch die Hauptabwehrstrategie in Larven. Allerdings scheint RNAi im Falle einer Virusinfektion, die ins Hämocoel gelangt, nicht sonderlich gut zu funktionieren, da 1000

injizierte ABPV-Partikel innerhalb von 24 h zum Tod führen und auch die Injektion von nur 10 Partikeln bei einem Teil der Larven 24 h p.i. zum Tod führt (Tabelle 32). Aber wie bereits erwähnt ist diese Methode, zumindest für Larven, auch nicht dem natürlichen Injektionsweg nachempfunden. Larven werden entweder direkt über die Königin infiziert oder über das Futter, das von Ammenbienen zubereitet wird. Bei einer Infektion über die Königin können schon viele Nachkommen sterben, so dass vermutlich nur die Larven übrig bleiben, die wenig Partikel mitbekamen (Chen et al., 2006). Bei einer oralen Aufnahme über das Futter wurde schon von Bailey et al. (1963) nachgewiesen, dass wesentlich höhere Virusmengen aufgenommen werden müssen, um zum Ausbruch der Krankheit zu führen. Dies könnte am anti-viralen pH des Darms liegen, an vorhandenen Proteasen, Lipasen, aber auch an Bestandteilen des Futters (Sparks et al., 2008).

Eine Expression antimikrobieller Peptide wie Hymenoptaecin, Defensin1, Abaecin oder auch anderer immunspezifischer Proteine kann nach einer ABPV-Infektion zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden und ist auch nicht im Hemmhof-Test nachweisbar (Abb. 34). Daher stellt sich die Frage, ob eine Virusinfektion möglicherweise in der Lage ist, das angeborene Immunsystem zu unterdrücken. Nach einer gleichzeitigen Injektion des starken Elizitors *E. coli* und ABPV, und vor allem durch die Beobachtung eines frühen Zeitwerts (Abb. 43), erkennt man, dass wie erwartet 12 h p.i. die bekannten AMPs in der *E. coli*-injizierten Gruppe exprimiert werden, aber nicht in der ABPV-infizierten Gruppe. In der doppelinfizierten Gruppe hingegen wird neben der beginnenden Expression der viralen Capsidproteine auch die Expression von AMPs deutlich. Das angeborene Immunsystem wird also offensichtlich nicht unterdrückt. Nach 24 h p.i. bleibt für die reine *E. coli*-Gruppe und die reine ABPV-Gruppe prinzipiell dasselbe Bild bestehen, in der doppelinfizierten Gruppe hingegen erkennt man eine deutlich stärkere Virusvermehrung, dafür aber so gut wie keine Expression an AMPs mehr, was auch im Hemmhof-Test bestätigt wurde. Es sieht so aus, als ob das humorale Immunsystem zwar nicht unterdrückt wird, dafür aber 24 h p.i. nicht mehr in der Lage ist AMPs zu produzieren. Der Grund dafür könnte in der voranschreitenden Virusvermehrung liegen und daran, dass die mRNAs, die AMPs codieren, an den Ribosomen mit den mRNAs konkurrieren müssen, die virusspezifische Proteine codieren. Die Zelle wird bei einer Virusinfektion mit viralen mRNAs überflutet, wobei man im Fall von ABPV und je einem IRES vor jedem ORF wirklich von einer Flut sprechen kann. Da ist es wahrscheinlich, dass andere mRNAs nicht mehr translatiert werden. Ob mRNAs von Hymenoptaecin, Defensin1 und Abaecin zwar transkribiert, aber nicht mehr translatiert werden, könnte in zukünftigen Experimenten mittels qRT-PCR überprüft werden.

### 5.3. Reaktionen während des Puppenstadiums

Obwohl das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung der Immunantwort von Larven und adulten Bienen lag, da über diese beiden Entwicklungsstadien mehr bekannt ist, erwies sich das Puppenstadium als sehr interessant.

Normalerweise verläuft die Metamorphose unter natürlichen Bedingungen ziemlich behütet in verdeckelten Brutzellen im Stock. Das hat sich allerdings seit Einschleppung der *Varroa*-Milbe vor über 30 Jahren drastisch geändert, da über die Milbe vor allem DWV, ABPV, KBV und IAPV auf Puppen übertragen werden (Genersch und Aubert, 2010). Es stellt sich daher die Frage wie gut sich Puppen gegenüber Pathogenen verteidigen können. Um eine Antwort zu finden, wurden Puppen lebende *E. coli*-Zellen injiziert, um die Reaktionsbereitschaft des angeborenen Immunsystems zu prüfen. Zudem wurde mit ABPV aber auch ein pathogenes Bienenvirus injiziert, wie es von *Varroa* übertragen wird. Allein schon eine oberflächliche Betrachtung der infizierten Puppen führt zu einer aufschlussreichen Erkenntnis (Abb. 53): Puppen sind einer Infektion anscheinend schutzlos ausgeliefert, denn selbst eine relativ harmlose Infektion mit *E. coli* Bakterien führt zu einer Graufärbung des Körpers und zum Tod.

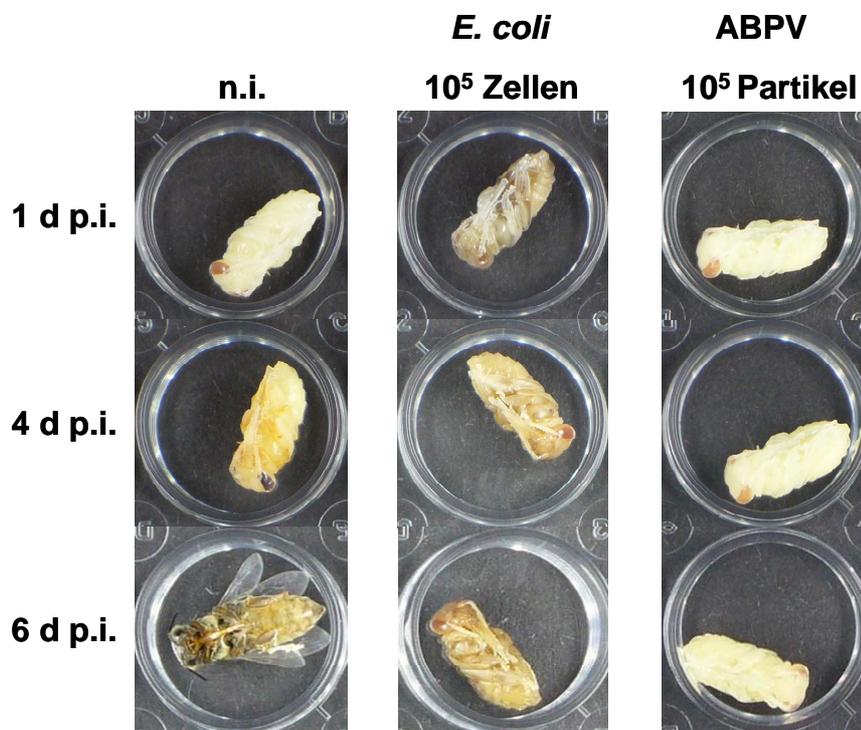


Abb. 53: Äußeres Erscheinungsbild von Puppen nach bakterieller oder viraler Infektion.

### 5.3.1. Auswirkungen einer Bakterieninfektion auf das Puppenstadium

Während eine Injektion von *E. coli* in Larven oder adulten Bienen zu keiner Veränderung des äußeren Erscheinungsbilds führt, so führt sie in Puppen zu einem tödlichen Kollaps. Dieser Kollaps kann durch die untypische Graufärbung der Puppen auch mit dem bloßen Auge beobachtet werden (Abb. 26 und 53). Bei Injektion lebender *E. coli*-Zellen in Jungbienen kommt es innerhalb weniger Stunden zu einer drastischen Abnahme an koloniebildenden Einheiten. Für injizierte *M. flavus*-Zellen erfolgt die Abnahme sogar noch schneller (Abb. 22A). Im Gegensatz dazu kommt es in Puppen bei Injektion von *E. coli*-Zellen zu keiner Abnahme bzw. bei injizierten *M. flavus*-Zellen zu einer schwachen Abnahme (Abb. 24A). Es scheint sogar so, als ob sich die *E. coli* Bakterien optimal bei den 35 °C Aufzuchttemperatur der Puppen vermehren, und zwar schon innerhalb der ersten 24 h p.i. fast um eine Zehnerpotenz von ca.  $4 \times 10^5$  auf ca.  $2 \times 10^6$  Zellen. Es ist stark anzunehmen, dass es sich bei den grauen Kolonien, die in Hemmhof-Tests mit Puppenhämolymph erscheinen ebenfalls um *E. coli* handelt (Abb. 24B). Eine Betrachtung der humoralen Immunantwort von Puppen gibt auch eine mögliche Erklärung für die beschriebene Beobachtung d.h. für die starke Vermehrung der Bakterien, denn es lassen sich weder im Hämolymph-Proteinmuster noch im Hemmhof-Test AMPs oder andere immunspezifische Proteine nachweisen, ganz im Gegensatz zu Larven oder adulten Bienen in denen exprimierte AMPs schon innerhalb von 6-12 h p.i. nachweisbar sind (Abb. 9). Selten kommt es in weiterentwickelten, rotäugigen Puppen zu einer schwachen Expression von Hymenoptaecin (Abb. 8).

Nun bleibt aber die Frage offen, was für die Beseitigung der lebenden *M. flavus*-Zellen sorgt. Es könnte sich um eine schwache Form der direkten zellulären Immunabwehr handeln, bei der gram-positive Bakterien schneller phagozytiert werden als gram-negative *E. coli*-Zellen, deren Mureinschicht zusätzlich von einer komplexen Membran umgeben ist. In diesem Fall wäre die äußerst langsame Phagozytose ein Hinweis auf nur wenige aktive Hämozyten in Puppen. Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen von Wilson-Rich et al. (2008), die in Puppen im Durchschnitt mehr als doppelt so viele Hämozyten fanden als in Larven oder adulten Bienen. Allerdings wird nicht beschrieben, ob diese Hämozyten aktiv sind und um was für eine Art von Hämozyten es sich handelt, denn nicht alle Hämozyten zeigen phagozytotische Eigenschaften (Trenczek, 1998). Eventuell verläuft eine Immunreaktion in Puppen auch einfach nur viel langsamer als in Larven oder Jungbienen. Ergebnisse mit Drohnen (H. Gätschenberger, BEEgroup) zeigen, dass in Drohnenpuppen AMPs nach Injektion von *E. coli*-Zellen exprimiert werden, allerdings erst 48 h p.i.. Die eigentliche

Induktion dieser äußerst langsam verlaufenden Expression begann aber sehr wahrscheinlich gleich nach Injektion der Bakterien. Es könnte sein, dass erste niedrige Mengen an AMPs ausreichen um die gram-positiven *M. flavus* Bakterien auszuschalten, allerdings müsste sich das auch im Hemmhof-Test bemerkbar machen. Zudem bliebe dann immer noch die Frage offen, warum die Anzahl an *M. flavus*-Zellen im weiteren zeitlichen Verlauf nicht noch weiter reduziert wird, sondern eher in Richtung einer konstanten Menge tendiert. Sind *M. flavus* Bakterien vielleicht nicht in der Lage sich so schnell diesem neuen Medium ‚Puppenkörperflüssigkeit‘ anzupassen wie *E. coli* Bakterien und einige sterben daher zu Beginn der Infektion? Für genauere Aussagen müssen weitere Experimente über längere Zeiträume durchgeführt werden. Mittels qRT-PCR ließe sich dann z.B. auch prüfen, ob eventuell das Immunsystem von Puppen genauso schnell und effizient aktiviert wird wie das Immunsystem von Larven oder Jungbienen, aber eventuell die mRNAs der AMPs zu stark mit den mRNAs der neu entstehenden Proteine und Strukturen kompetitieren müssen und daher die Expression langsamer von statten geht. Vielleicht ist ein langsam funktionierendes Immunsystem in Puppen aber auch evolutionär von Vorteil. Während der Metamorphose kommt es zu einer kompletten Umstrukturierung des Körpers. Ein schnell reagierendes Immunsystem könnte in dieser Phase zu kostenintensiv sein oder auch störend, falls es sich neuentwickelnde Strukturen plötzlich als körperfremd einstuft und versucht zu eliminieren. Ein andere, oder auch ergänzende, mögliche Erklärung für die zumindest in den ersten 24 h äußerst schwache bis fehlende Immunantwort wäre die Umgebung, in der das Puppenstadium abläuft: eine vollständig verdeckelte Wachszelle. Ein funktionierendes Immunsystem ist in einer derartig geschützten Umgebung nicht notwendig, hat sich daher eventuell nie entwickelt oder mit voranschreitender Sozialisierung wieder zurückentwickelt. Eine Betrachtung des Immunsystems von Puppen solitär lebender Bienen wäre daher interessant. Am Besten von Arten, deren Puppenstadium unterschiedlich gut geschützt abläuft, bzw. von Arten, deren Metamorphose z.B. in Erdlöchern abläuft, einer Umgebung, reich an Mikroorganismen.

### **5.3.2. Auswirkungen einer ABPV-Infektion auf das Puppenstadium**

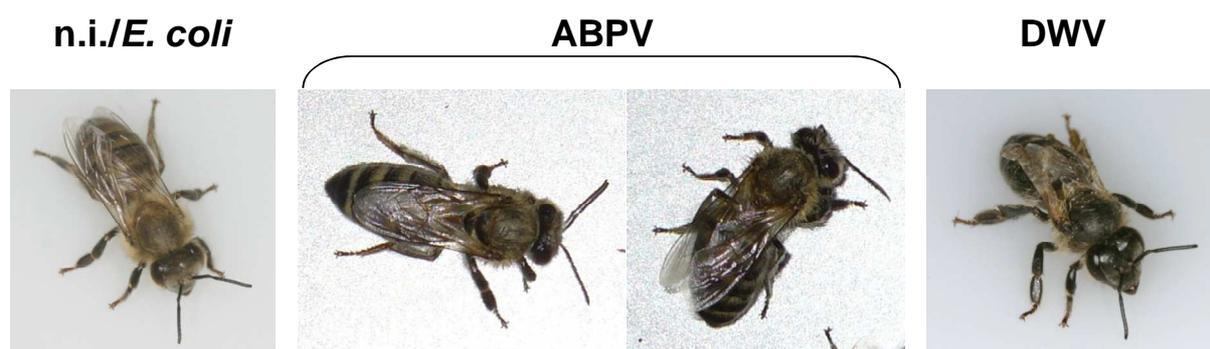
Wie diese Arbeit zeigt, sind Puppen bakteriellen Erregern so gut wie schutzlos ausgeliefert. Im Fall von *Varroa* handelt es sich jedoch bei den übertragenen Erregern ausschließlich um Viren wie z.B. ABPV. Leider können sich Puppen aber auch Viren gegenüber nicht schützen. Zwar zeigen sie keine starke Änderung ihres äußeren Erscheinungsbildes wie nach einer *E. coli*-Injektion, jedoch wird spätestens 4 d p.i. deutlich, dass ABPV-infizierte Puppen in

ihrer Entwicklung nicht nur verzögert sind, sondern komplett stehenbleiben (Abb. 47). Das Virus muss sich daher so stark in den Puppen vermehren, dass keine Ressourcen mehr übrig bleiben, um die Umstrukturierung des Körpers voranzubringen. Leider konnte eine derart starke Virusvermehrung nicht nachgewiesen werden. Abb. 46 gibt nur Hinweise auf eine relativ schwache Virusvermehrung, erkennbar an einer Bande, bei der es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um VP 2 handelt. Es lässt sich innerhalb der nächsten Tage keine Verstärkung der Virusvermehrung beobachten, sondern sieht vielmehr so aus, als ob die Virusvermehrung selbst 5 d p.i. auf derselben Stufe steht wie am Anfang. Dies steht in starkem Kontrast zur Virusvermehrung in Larven, die schon innerhalb von 12 h p.i. im Hämolymp-*Proteinmuster* zutage tritt (Abb. 34C). Die Zentrifugation der Hämolympproben von Puppen war viel zu schwach, um freie Viruspartikel oder -proteine in großer Menge zu sedimentieren, daher kann sie sich nicht negativ auf den Nachweis der Virusvermehrung ausgewirkt haben. Zentrifugiert wurde deswegen, da Puppen so gut wie keine festen inneren Körperstrukturen aufweisen und daher nicht direkt reine Hämolymphe gewonnen werden konnte. Vielmehr wurde eine dickflüssige, trübe Körperflüssigkeit entnommen, die sowohl die Hämolymphe als auch alle möglichen, gelösten anderen Stoffe enthält. Der durch die Zentrifugation erhaltene Überstand kann als Hämolymphe bezeichnet werden, da er sowohl typische Proteine der beiden anderen Entwicklungsstadien, als auch puppenspezifische Proteine enthält (Abb. 5). Um eine starke Virusvermehrung sicher ausschließen zu können, wurde auch das Sediment gelelektrophoretisch analysiert. Das resultierende Proteinmuster (nicht abgebildet) zeigt neben unzähligen Banden bei den ABPV-infizierten Puppen ebenfalls eine Bande auf der Höhe von VP 2, und zwar in der gleichen Intensität wie in Abb. 46. Die Virusvermehrung ist also tatsächlich nicht so stark wie man angesichts des Entwicklungsstillstands vermuten würde, d.h. bei weitem nicht so stark wie in Larven. Möglicherweise gibt es noch ein Gewebe in Puppen, das auch während der Metamorphose intakt genug ist um den Viren die Möglichkeit zu geben sich dort zu vermehren, eventuell das Darmepithel, der Fettkörper oder das Hautepithel. Es bleibt also weiterhin die Frage offen, wo sich ABPV in den für eine natürliche Infektion äußerst empfänglichen Puppen vermehrt. Eventuell in den Hämocyten, die bis ins adulte Stadium überdauern? Laut Wilson-Rich et al. (2008) haben Puppen mehr als doppelt so viele Hämocyten wie Larven. Warum vermehrt sich ABPV in diesen Hämocyten nicht so stark wie in denen des vorhergehenden Larvenstadiums? Lassen sich die Hämocyten eventuell irgendwo nieder, was in einigen anderen Insekten nachgewiesen wurde (Strand, 2008), und verbleiben so bei einer Abnahme der Hämolymphe im Körper? Diese sessilen Hämocyten

können zwar schnell reaktiviert werden, allerdings wurde das noch nicht in Puppen nachgewiesen. Inaktive Hämocyten wären eine Erklärung für beide Phänomene: die geringe Abnahme an koloniebildenden Einheiten in Puppen nach Bakterieninfektion und der fehlende Nachweis der starken Virusvermehrung, die ganz sicher irgendwo in Puppen vonstatten geht.

#### **5.4. Reaktionen von adulten Bienen**

Das Akute Bienen Paralyse Virus hat seinen Namen von den für adulte Bienen typischen Zeichen von Paralyse (Bailey et al., 1963). Während nicht-infizierte, oder auch *E. coli*-infizierte Jungbienen eine normale Beinstellung zeigen und sich unauffällig bewegen, so zeigen ABPV-infizierte Bienen eine anormale Beinstellung und eine unsichere Körperhaltung im Stehen oder Laufen. Abb. 54 zeigt dazu im Vergleich eine Biene mit den für eine DWV-Infektion typischen deformierten Flügeln.



**Abb. 54: Nicht-infizierte und virusinfizierte Jungbienen.** Die nicht-infizierte Biene und die mit den verkrüppelten Flügeln, die offensichtlich an DWV erkrankt ist, wurden direkt nach dem Schlupf fotografiert, die ABPV-infizierten Bienen 24 h nach Injektion von  $10^4$  Viruspartikeln. (Fotos: Mario Pahl, Klara Azzami)

##### **5.4.1. Auswirkungen einer Bakterieninfektion auf adulte Bienen**

Wie bereits bekannt exprimieren Jungbienen, ebenso wie Larven, nach Infektion bzw. Injektion von *E. coli* die AMPs Hymenoptaecin, Defensin1 und Abaecin (Abb. 6). Ebenso konnte im Hemmhof-Test antimikrobielle Aktivität der Hämolympheproben von immunstimulierten Jungbienen nachgewiesen werden, wobei diese antimikrobielle Aktivität den gleichen zeitlichen Verlauf zeigt wie in immunstimulierten Larven und schon innerhalb weniger Stunden nachgewiesen werden kann (Abb. 9).

Darüber hinaus wurde aber auch die Expression von vier anderen immunspezifischen Proteinen beobachtet (Abb. 6 und 15): 1. die bekannte Prophenoloxidase (ProPO), 2. das

Peptidoglycan Recognition Protein-S2 (PGRP-S2), 3. eine Carboxylesterase, die zur besseren Spezifizierung als Carboxylesterase1 (CE1) bezeichnet wird, und 4. das noch relativ unbekanntes Immune-Responsive Protein 30 (IRp30).

Die ProPO, die in Jungbienen sowohl nach Verwundung als auch nach Infektion auftaucht, liegt im Organismus als inaktives Vorläuferprotein vor und wird bei Bedarf durch Abspaltung einer N-terminalen Sequenz in die aktive Phenoloxidase (PO) umgewandelt. Die aktive PO ist hauptverantwortlich für die Melaninbildung zum Wundverschluss, gleichzeitig werden aber auch Chinone mit cytotoxischen Eigenschaften produziert, die eindringende Pathogene abtöten. In Bienen wurde ProPO gleichmäßig verteilt im ganzen Körper von Arbeiterinnen gefunden (Lourenço et al., 2005). In *Drosophila* z.B. wird das Zymogen ProPO in einer speziellen Art von Hämocyten, den „Crystal cells“ gespeichert, die bei einer Verwundung aufreißen und das Zymogen freisetzen, das dann erst in die aktive PO umgewandelt wird (Lemaitre und Hoffmann, 2007).

In *Drosophila* wurden verschiedene Arten von PGRPs gefunden, die je nach Art den Toll- oder Imd-Signalweg aktivieren, wobei einige PGRPs wohl auch in der Lage sind Peptidoglycan zu spalten (Steiner, 2004). Garver et al. (2006) fanden zudem, dass das lösliche PGRP-SC1a in *Drosophila* wichtig ist für die Phagozytose von *Staphylococcus aureus*. Über die Funktion von PGRP-S2 in Honigbienen ist jedoch leider noch nichts bekannt. Die Expression von PGRP-S2, CE1 und IRp30 wird nicht nach einer bloßen Verwundung, sondern nur nach Injektion von Elizitoren, wie z.B. *E. coli*, induziert (Abb. 11B). Dabei zeigt die Expression den gleichen zeitlichen Verlauf wie die Expression von AMPs (Abb. 9 und 15). Dass es sich im Fall von CE1 und IRp30 dabei um eine echte Expression handelt, und diese Proteine nicht wie ProPO irgendwo gespeichert vorliegen und schnell aktiviert werden, ist daran ersichtlich, dass es ca. 12 h dauert bis sie mittels Western-Blot erstmalig in der Hämolymphe detektiert werden können (Abb. 15). Zudem wurden von Albert et al. (2011) nach Injektion von *E. coli*-Zellen erhöhte mRNA Mengen an IRp30 gefunden. Sowohl CE1, als auch IRp30 weisen eine Signalsequenz auf, es handelt sich daher um sekretierte Proteine, die an die Hämolymphe abgegeben werden, bleibt nur noch die Frage nach dem Ort ihrer Synthese. Durch Zentrifugation der Hämolympheproben konnte das Vorhandensein der beiden Proteine in der Hämolymphe und die Abwesenheit in den Hämocyten nachgewiesen werden (Abb. 16), was zumindest Hämocyten als Ort der Synthese ausschließt. Albert et al. (2011) fanden, dass IRp30 mRNA in Sommerbienen nach Infektion gleichmäßig im ganzen Körper verteilt ist, was für eine Vermehrung in einem weit verbreiteten Epithel spricht, während allerdings in Winterbienen IRp30 mRNA hauptsächlich im Fettkörper zu finden ist.

Allerdings zeigen Winterbienen auch insgesamt ein anderes Muster bei der IRp30 Expression als Sommerbienen (Abb. 20). Die exakte Funktion von IRp30 und CE1 konnte leider noch nicht geklärt werden. Bei IRp30 handelt es sich um ein Protein mit einem LRR („leucine-rich repeat“) und einem echten Leucin-Reissverschlussmotiv, was eine Interaktion mit anderen Proteinen nahelegt. In *Anopheles* z.B. spielen Proteine mit LRR-Motiven eine wichtige Rolle in der zellulären Immunabwehr (Povelones et al., 2009). Bei Carboxylesterasen von Insekten geht man davon aus, dass sie zusammen mit anderen Enzymen wie sauren Phosphatasen und Proteasen Bestandteile der Hämocyten sind (Lanzrein et al., 1998). Interessanterweise weist CE1 als einzige von 24 in *Apis* gefundenen Carboxylesterasen genauso wie IRp30 ein Leucin-Reissverschlussmotiv auf (Albert et al., 2011). Evans et al. (2006) fanden, dass die Biene nur ca. ein Drittel der Gene für Paraloge der Signalkaskaden des angeborenen Immunsystems besitzt wie *Drosophila* oder *Anopheles*. Die Chancen stehen also gut mit IRp30 und CE1 bienenspezifische, oder genauer gesagt hymenopterenspezifische Immunproteine gefunden zu haben, die unabhängig von den bereits bekannten Signalkaskaden agieren oder diesen Signalkaskaden eventuell vorgeschaltet sind. In der Tat konnten Albert et al. (2011) das IRp30-Gen in 23 Hymenopteren-Arten nachweisen, allerdings nicht in 27 Nicht-Hymenopteren. *Nasonia vitripennis* ist dabei die einzige nicht-soziale Hymenoptere, in der das Gen nachgewiesen wurde, wobei es hier phylogenetisch weit entfernt von den IRp30-Genen der anderen Hymenopteren scheint. Aufgrund dieser Befunde wird von Albert et al. (2011) die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass es sich zumindest bei IRp30 um ein Protein handelt, das eine Rolle im sozialen Zusammenleben spielen könnte. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass IRp30 ursprünglich in allen Hymenopteren vorhanden war, im Laufe der Evolution allerdings in einigen Arten verschwand oder verändert wurde, wie am Beispiel von *Nasonia* und zwei Myrmicinen-Arten gezeigt wird.

Abgesehen von der Expression von AMPs und vier anderen immunspezifischen Proteinen konnte bei Jungbienen nach Injektion lebender Bakterien eine weitere Beobachtung gemacht werden, und zwar eine relativ rasche Abnahme der koloniebildenden Einheiten in der Hämolymphe (Abb. 22A). Während sich *E. coli*-Zellen in Puppen offensichtlich noch vermehren, so werden sie in Jungbienen schon innerhalb von zwei Stunden deutlich in ihrer Zahl reduziert. Gram-positive *M. flavus*-Zellen, bei denen in Puppen lediglich eine sehr schwache Abnahme beobachtet wurde, werden sogar noch wesentlich schneller und fast vollständig aus der Hämolymphe entfernt. Und das innerhalb eines Zeitraumes, in dem es noch zu keiner gesteigerten Expression an AMPs oder immunspezifischen Proteinen kommt

(Abb. 9B, 15 und 22B). Mögliche Ursachen sind schwer zu nennen. Es könnte sich um einen Teil der zellulären Immunantwort handeln, wobei z.B. Nodulation allerdings erst nach ca. 4 h beobachtet werden kann, was nicht heißt, dass die Hämocyten nicht schon früher anfangen zusammen mit den Bakterien Aggregate zu bilden und diese womöglich erst nach 4 h erkennbar sind. Eine weitere Möglichkeit wäre Phagozytose, wobei *M. flavus*-Zellen aufgrund ihres Aufbaus vielleicht schneller phagozytiert werden könnten als *E. coli*-Zellen. Ein konstitutiv in der Hämolymphe vorhandenes antimikrobielles Peptid, wie z.B. Lysozym oder Defensin1, das in der Lage wäre speziell *M. flavus* schnell zu eliminieren, kann ausgeschlossen werden, da es auch im Hemmhof-Test zu einem deutlich positiven Ergebnis führen würde, was nicht der Fall ist (Abb. 22B). Die letzte mögliche Erklärung liegt in der raschen Verfügbarkeit der Phenoloxidase, die lediglich mittels Proteolyse der ProPO gewonnen werden muss (Lourenço et al., 2005). Die produzierten Chinone weisen cytotoxische Aktivität auf und könnten so zu einem schnellen Rückgang an koloniebildenden Einheiten in der Hämolymphe beitragen. Vielleicht wirkt sich auch hier der unterschiedliche Aufbau der bakteriellen Zellwand aus, was z.B. dazu führt, dass gram-positive Bakterien schneller durch Chinone zerstört werden als gram-negative Bakterien. Was auch immer der Grund für die schnelle Eliminierung der koloniebildenden Einheiten auch ist, ist sehr wahrscheinlich auch ein Grund dafür, dass es keine bekannten bakteriellen Krankheiten bei adulten Bienen gibt. Ein anderer Grund ist natürlich die bereits erwähnte Expression an AMPs, die ein breites Wirkspektrum haben. So wurde z.B. für Apidaecine (Casteels et al., 1989) nachgewiesen, dass sie hocheffektiv gegen einige pflanzenassoziierte, aber auch pflanzenpathogene Bakterien wirken, mit denen Bienen sehr wahrscheinlich auf ihren Sammelflügen in Kontakt kommen.

Versucht man nun die Erkenntnisse aus den Experimenten mit Jungbienen auszuweiten auf ältere Bienen, wie z.B. Nektarsammlerinnen oder Winterbienen, kommt man zu überraschenden Ergebnissen, was auch nicht allzu verwunderlich ist. Jungbienen und Sammlerinnen oder Winterbienen zeigen schon im nicht-infizierten Zustand deutliche Unterschiede in ihren Hämolymphe-Proteinmustern (Abb. 12 und 18), wobei nur in älteren Bienen jede Menge zusätzliche Proteine exprimiert werden (Tabelle 28), wie z.B. eine Serinprotease, die wahrscheinlich Bestandteil der Serinprotease-Kaskade ist und das Zymogen ProPO in die aktive PO umwandelt. Außerdem ein Toll-like receptor 13-like mit LRR, was eine Interaktion mit anderen Proteinen nahelegt, über dessen Funktion allerdings leider nichts bekannt ist, und zudem eine Alpha-Glucosidase-II, die in der Hämolymphe und

im Ventriculus vorkommt und Saccharose in Glucose und Fructose spaltet, die dann ca. 50 % des Blutzuckers ausmachen, während die restlichen 50 % aus Trehalose bestehen (Kubota et al., 2004). Betrachtet man aus Neugierde das Proteinmuster von Kopfextrakten, so tauchen noch wesentlich mehr unterschiedlich exprimierte Proteine auf, die allerdings hauptsächlich mit dem Energiehaushalt und Stoffwechsel, aber auch mit der Futtersaftproduktion (MRJPs) assoziiert sind (Tabelle 29) und auf die Aktivität bestimmter Kopfdrüsen in Ammenbienen und Nektarsammlerinnen zurückzuführen sind.

Interessanter war dagegen der Befund, dass Vitellogenin in Sammelbienen immer noch in größeren Mengen vorhanden ist (Abb. 12 und 13). Laut Guidugli et al. (2005) ist eine reduzierte Menge an Vitellogenin der Auslöser für das Sammelverhalten. Amdam und Omholt (2002) zeigen sogar, dass in Sammelbienen überhaupt kein Vitellogenin mehr zu finden ist. Vielleicht ist aber einfach so, dass nicht die reduzierte Menge an Vitellogenin Bienen zu Sammlerinnen macht, sondern vielmehr Sammelbienen aufgrund ihrer erhöhten Muskelaktivität einen erhöhten Verbrauch aufweisen. Denn die Zink-bindende Domäne des Vitellogenins soll vor oxidativem Stress schützen (Seehuus et al., 2006), wie er ja auch bei erhöhter Muskelaktivität entsteht. Die Beobachtung konnte auch bei Winterbienen gemacht werden: die Individuen einer Kolonie, die durch Öffnen des Stocks häufig in ihrer Winterruhe gestört wurden, wiesen im Frühjahr geringere Mengen an Vitellogenin auf als Individuen einer Kolonie, die den Winter über nicht geöffnet wurde (eigene Beobachtung, nicht abgebildet). Zudem konnte in Winterbienen eine spezifische N-terminale Sequenz von Vitellogenin, die als Vitellogenin-N bezeichnet wurde, nachgewiesen werden (Abb. 18). Vitellogenin-N beinhaltet sowohl den Teil, der für den Lipid-Transport verantwortlich ist, als auch die Zink-Bindestelle (Abb. 19). Allerdings stellte sich bald heraus, dass dieses Protein nicht als Winterbienen-spezifisch bezeichnet werden kann, da schon Amdam et al. (2003) dieses Protein mittels Immunodetektion in den Hypopharynxdrüsen von Ammenbienen nachweisen konnten, während Pinto et al. (2000) es in der Hämolymphe von 4-6 Tage alten Bienen fanden. Möglicherweise findet man es einfach deswegen in Winterbienen gehäuft, da sie generell mehr Vitellogenin, und damit auch mehr Vitellogenin-N aufweisen.

Kommen wir zurück auf die Immunantwort: während z.B. IRp30 und CE1 in nicht-infizierten Nektarsammlerinnen wie erwartet auch nicht exprimiert werden, so werden sie in diesen deutlich älteren Sammelbienen nicht nur nach Injektion eines echten Elizitors wie *E. coli*, sondern auch schon nach bloßer Verwundung exprimiert (Abb. 17). In noch älteren Winterbienen zeigen sogar schon nicht-infizierte Individuen eine geringe, konstitutiv

exprimierte Menge an IRp30 und CE1 (Abb. 18). Darüber hinaus kann zumindest die Expression von IRp30 durch Injektion von *E. coli*-Zellen, aber auch schon durch bloße Verwundung, noch gesteigert werden (Abb. 20). Hauptsyntheseort von IRp30 ist in Winterbienen, wie bereits erwähnt, der Fettkörper (Albert et al., 2011). Warum in Winterbienen diese beiden immunspezifischen Proteine, ganz im Gegensatz zu Sommerbienen, ausgerechnet im Fettkörper in großen Mengen und dazu noch konstitutiv synthetisiert werden, ist nicht bekannt. Falls IRp30 und CE1 tatsächlich an einer aktiven Immunantwort beteiligt sind, so würde die stärkere Expression zur allgemein beobachtbaren stärkeren Immunkompetenz von Winterbienen passen. Denn betrachtet man die Abnahme koloniebildender Einheiten nach Injektion lebender *E. coli*-Zellen, so lässt sich feststellen, dass im Vergleich zu Jungbienen, diese Abnahme in älteren Bienen wesentlich schneller bis zur vollständigen Eliminierung der injizierten Bakterien vonstatten geht (Abb. 23A). Diese schnelle Abnahme könnte auch hier auf Phagozytose zurückzuführen sein. Zwar kann in Winterbienen keine Nodulation beobachtet werden (H. Gätschenberger, BEEgroup), für Nodulation ist allerdings auch ein anderer Hämozytentyp verantwortlich als für Phagozytose (Trenczek, 1998). Und obwohl Amdam et al. (2004b) und Schmid et al. (2008) zeigen, dass in älteren Bienen, d.h. Sammelbienen, wesentlich weniger Hämozyten vorhanden sind, so konnten Fluri et al. (1977) zeigen, dass im Gegensatz dazu Winterbienen sehr viele Hämozyten aufweisen.

Allerdings könnte auch die höhere Phenoloxidase-Aktivität der Grund für die rasche Abnahme koloniebildender Einheiten sein. Denn Schmid et al. (2008) konnten bei Untersuchungen zum Immunsystem der Honigbiene zeigen, dass zwar die Anzahl an Hämozyten mit steigendem Alter der Bienen zurückgeht, im Gegensatz dazu aber die Phenoloxidase-Aktivität zunimmt. Und da, wie bereits erwähnt, die entstehenden Chinone cytotoxische Eigenschaften besitzen, werden sie vermutlich in älteren Bienen einen wesentlichen Anteil an der Eliminierung eingedrungener Bakterien haben. Die stärkere Aktivität der Phenoloxidase ist übrigens auch im Hemmhof-Test erkennbar (Abb. 23C), der schon gleich zu Beginn eine deutlich Braunfärbung zeigt, vermutlich aufgrund der Melaninsynthese der aktiven Phenoloxidase. Allerdings muss es im Organismus Schutzfunktionen geben, um körpereigene Zellen vor diesen cytotoxischen Chinonen zu schützen. Vielleicht sind IRp30 und CE1 Inhibitoren des ProPO-aktivierenden Systems oder zumindest Bestandteile des Signalweges, der zur Inhibierung des ProPO-aktivierenden Systems führt. Denn wie die Inaktivierung der Phenoloxidase im Detail abläuft, konnte noch nicht geklärt werden (Cerenius et al., 2008). Für diese Hypothese spricht, dass IRp30 und

CE1 mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung nur in den Entwicklungsstadien exprimiert werden, in denen die Phenoloxidase aktiv wird und zudem in älteren Bienen, die stärkere Phenoloxidase-Aktivität zeigen (Abb. 17 und 18). Gegen diese Hypothese spricht allerdings die Tatsache, dass Jungbienen nach Verwundung und damit einhergehender Phenoloxidase-Aktivierung keine Expression von IRp30 und CE1 zeigen. Theoretisch ausgeschlossen werden sollte diese Möglichkeit dennoch nicht, da es zwischen den Entwicklungsstadien der Honigbiene, als auch zwischen adulten Bienen unterschiedlichen Alters so viele Unterschiede in der Expression oder Aktivierung von Proteinen als Antwort auf eine Verwundung oder Infektion gibt, dass es sich auch bei der fehlenden Expression von IRp30 und CE1 in Jungbienen nach Verwundung um eine entwicklungspezifische Varianz handeln könnte. Sehr wahrscheinlich gibt es mehrere Möglichkeiten die aktive Phenoloxidase zu inhibieren. Daher könnte die im Vergleich zu älteren Bienen schwächere Phenoloxidase-Aktivität in jüngeren Bienen auch über einen anderen Mechanismus herunterreguliert werden.

Eine weitere mögliche Rolle könnten IRp30 und CE1 auch in der adaptiven Immunantwort spielen. Insekten sind zwar nicht in der Lage Antikörper zu generieren, jedoch konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass auch Insekten eine gewisse adaptive Immunantwort zeigen können. So ist *Drosophila* nach einer überstandenen Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* gegen eine zweite Infektion mit diesen Bakterien geschützt. Phagozytose und der Toll-Signalweg sind dabei wesentlich an dieser zweiten, schnelleren Immunantwort beteiligt (Pham et al., 2007). Eine Art adaptive Immunantwort konnte auch schon in anderen Insekten nachgewiesen werden, jedoch sind die genauen Mechanismen, die zu dieser Art Immungedächtnis führen noch weitestgehend unbekannt (Pham und Schneider, 2008). Es ist also nicht auszuschließen, dass IRp30 und CE1 dabei eine Rolle spielen. Vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass größere Mengen hauptsächlich in älteren Bienen exprimiert werden, wie z.B. Nektarsammlerinnen, die bei ihren Sammelflügen verstärkt pflanzenassoziierten Bakterien ausgesetzt sind, oder Winterbienen, die eng aufeinander sitzen und dadurch Pathogene schnell weitergeben können. Vor allem in Winterbienen, die lange überleben sollen, wäre ein Immungedächtnis von Vorteil.

#### **5.4.2. Auswirkungen einer ABPV-Infektion**

Wie bereits erwähnt, verkraften Jungbienen eine ABPV-Infektion besser als Larven. Während in Larven eine sichtbare Virusvermehrung begleitet ist von einer starken Veränderung des Hämolymp-Proteinmusters, d.h. von der Expression neuer Proteine und der Degradation

hochmolekularer Speicherproteine (Abb. 34, Tabelle 31), so führt eine sichtbare Virusvermehrung in Jungbienen zu keiner starken Veränderung des Hämolympf-Proteinmusters (Abb. 36). Ob es kurz vor oder nach dem Tod der Bienen zu einer starken Veränderung der Zusammensetzung der Hämolymphe kommt, konnte leider nicht geprüft werden, da aus toten Bienen keine Hämolymphe mehr gewonnen werden konnte.

Auch eine für Larven typische, starke Veränderung des äußeren Erscheinungsbildes (Abb. 34E) kann bei Jungbienen nicht beobachtet werden (Abb. 37). Dafür zeigen Bienen die typischen Symptome von Paralyse wie sie schon von Bailey et al. (1963) beschrieben werden: zitternde, kraftlose Bewegungen.

Ein weiterer, wichtiger Unterschied: Jungbienen überleben länger als Larven bei höheren, injizierten Partikelzahlen. Injiziert man Jungbienen beispielsweise  $10^2$  ABPV-Partikel, eine Dosis, die nur 50 % der Larven überleben (Tabelle 30), so zeigt sich erst nach 72 h eine schwache Auswirkung auf die Überlebensrate (Tabelle 33). Zudem ist es so, dass ABPV-infizierte Jungbienen bei einer 10-fach erhöhten Dosis ( $10^3$  Partikel) zwar eine Virusvermehrung in Form der exprimierten Capsidproteine zeigen (Abb. 36), allerdings verläuft diese Vermehrung nicht ganz so schnell wie in Larven (Abb. 34), in denen eine Virusvermehrung ausgehend von  $10^3$  Partikeln immer innerhalb von 24 h p.i. zum Tod führt (Tabelle 30). In Jungbienen führt eine Injektion von  $10^3$  Partikeln erst innerhalb von 72 h p.i. zum Tod. Eine Injektion von  $10^4$  Partikeln führt dann schon innerhalb von 48 h p.i. zum Tod (Tabelle 33). Das Virus tötet Jungbienen also wesentlich langsamer als Larven. Doch was ist der Grund dafür? Die langsamere Virusvermehrung in Jungbienen könnte ein Hinweis auf effizientere, antivirale Abwehrmechanismen dieses Entwicklungsstadiums sein. Die hohen Standardabweichungen der Überlebensraten nach Injektion von  $10^3$  und  $10^4$  Partikeln wären dann ein Indiz dafür, dass sich der angeborene, antivirale Mechanismus bei diesen Partikelzahlen in einem kritischen Bereich seiner Fähigkeiten bewegt das Virus auszuschalten. Oder aber das Virus ändert seinen Aufenthaltsort und damit den Ort seiner Synthese. Prinzipiell konnte nachgewiesen werden, dass sich ABPV in Hämocyten vermehrt (Abb. 38). Und wie bereits erwähnt, handelt es sich dabei um eine echte Virusvermehrung, da noch das Vorläuferprotein VP1/VP4 zu sehen ist und nicht schon das prozessierte, singuläre VP 1. Zum Einen könnte es nun sein, dass sich ABPV deswegen langsamer in adulten Bienen vermehrt, da adulte Bienen weniger Hämocyten aufweisen als Larven (Wilson-Rich et al., 2008), allerdings könnte es auch sein, dass das Virus sich nach einer Anfangsphase in den Hämocyten vorzugsweise im Gehirn befindet, wo es auch von Bailey und Milne (1969) nachgewiesen wurde, und sich dort weiter vermehrt. Für letztere Möglichkeit spricht die

Tatsache, dass obwohl 72 h und 96 h p.i. keinerlei Veränderung des Hämolymphe-Proteinmusters zu erkennen ist (Abb. 35), die Überlebensraten ganz langsam zurückgehen (Tabelle 33). Hierzu müssen dringend noch weitere Versuche über längere Zeiträume erfolgen.

Zumindest kann mit Sicherheit gesagt werden, dass es sowohl in Larven, als auch in Jungbienen nach einer reinen Virusinfektion zu keiner Expression von AMPs kommt, erkennbar an den negativen Hemmhof-Tests (Abb. 34 und 36). Und auch Nodulation als Form einer zellulären Immunantwort tritt nicht als Reaktion auf eine Virusinfektion auf (Abb. 45B). Das letzteres der Fall sein könnte, wurde nach Injektion des Bovinen Herpes Simplex Virus-1 (BHSV1) in *Galleria melonella* und *Pimpla turionellae* nachgewiesen (Büyükgüzel et al., 2007; Durmuş et al., 2008).

Ebenso wie in Larven, wurde auch in Jungbienen mittels gleichzeitiger Injektion von *E. coli*-Zellen und ABPV geprüft, ob eine Virusinfektion das angeborene Immunsystem unterdrückt. Zumindest für die humorale Immunantwort sieht es nicht danach aus (Abb. 44), denn neben einer Virusvermehrung in Form der Capsidproteinbanden, wird auch die Expression von Hymenoptaecin und teilweise Defensin1 erkennbar. Leider wird diese Expression überdeckt vom vorhandenen ASP3c, einem antennenspezifischen Protein in Jungbienen, das die gleiche molekulare Masse wie Hymenoptaecin aufweist. Mittels MS-Analyse konnte allerdings zweifelsfrei das Vorhandensein von Hymenoptaecin in den doppelinfizierten und den *E. coli*-Gruppen bestätigt werden. Zudem sind ebenso wie nach Injektion von *E. coli* deutliche Hemmhöfe bei den doppelinfizierten Gruppen zu erkennen. Um Aussagen über zeitliche Verläufe machen zu können oder darüber ob, wie bei Larven, die Expression der AMPs wieder abnimmt, sind weitere Versuche über längere Zeiträume erforderlich, zudem mit niedrigeren Konzentrationen an *E. coli* und ABPV in den doppelinfizierten Gruppen, so dass diese Gruppen auch lange genug überleben bzw. das Sterben so langsam verläuft, dass in den letzten Stunden vor ihrem Ableben häufiger Hämolymphe entnommen werden kann.

Eine Betrachtung der Nodulation (Abb. 45) führt zu einem teilweise überraschenden Ergebnis. Zwar ist wie erwartet die Nodulation in der doppelinfizierten Gruppe nicht unterdrückt, denn auch die humorale Immunreaktion ist nicht unterdrückt, und außerdem eignet sich ABPV (30 nm) allein aufgrund seiner Größe nicht so gut für die Nodulation, d.h. die Auflagerung von Hämocyten bzw. Lamelloyten, wie das BHSV1 (160-240 nm). Allerdings werden in der doppelinfizierten Gruppe nur ungefähr die Hälfte an Noduli gebildet wie in den *E. coli*-injizierten Individuen (Abb. 45C), was nun wiederum für eine Virusvermehrung in den Hämocyten spricht, denn durch voranschreitende Virusvermehrung

würden befallene Hämocyten entweder in ihrer Zahl vermindert oder aber vermutlich doch stark in ihren eigentlichen Aufgaben behindert.

So interessant diese Ergebnisse auch sein mögen, vor allem im Vergleich zu der larvalen Reaktion auf eine ABPV-Infektion, das eigentlich Erstaunliche liefert auch hier ein Vergleich der Reaktion von Jungbienen und älteren Bienen. Denn ebenso wie gegen eine *E. coli*-Injektion scheinen ältere Bienen auch gegen eine ABPV-Infektion besser gewappnet zu sein. Schon in 8d-alten Bienen geht die sichtbare Virusvermehrung wesentlich langsamer vonstatten als in Jungbienen (Abb. 39). Auch überleben alle Individuen Partikelzahlen, die sich schon negativ auf die Überlebensraten von Jungbienen auswirken (Tabelle 33 und 35). Ergebnisse mit Nektarsammlerinnen waren leider nicht ganz so eindeutig, da diese Gruppe starke individuelle Unterschiede aufweist (Abb. 40), es sieht aber nicht so aus, als ob es bei  $10^3$  injizierten ABPV-Partikeln innerhalb von 24 h p.i. zu einer Virusvermehrung gekommen wäre, so wie es in Jungbienen der Fall ist (Abb. 36C). Wirklich faszinierend ist aber die Reaktion von Winterbienen: denn selbst  $10^4$  injizierte ABPV-Partikel, die in Jungbienen spätestens innerhalb von 72 h p.i. zum Tod führen (Tabelle 33) und sich auch schon innerhalb von 12 h p.i. im Hämolymp-Protteinmuster bemerkbar machen, wirken sich in Winterbienen nur äußerst schwach aus. Eine Virusvermehrung ist erst ab 96 h p.i. im Hämolymp-Protteinmuster erkennbar (Abb. 41) und auch die Überlebensrate wird im Vergleich zu Jungbienen (Tabelle 33) nur geringfügig beeinträchtigt, jedenfalls nicht stärker als nach einer *E. coli*-Injektion (Tabelle 36). Aufgrund dieser Beobachtungen und der Tatsache, dass langlebige Winterbienen für den Fortbestand der Kolonie verantwortlich sind, wären Langzeitauswirkungen einer ABPV-Infektion auf Winterbienen sehr interessant.

Eine der offenen Fragen in Winterbienen ist: warum vermehrt sich ABPV langsamer als in Jungbienen? Könnte es sein, dass ältere Bienen weniger Hämocyten haben (Wilson-Rich et al., 2008)? Dies trifft allerdings nicht für Winterbienen zu, die sehr große Mengen an Hämocyten aufweisen (Fluri et al., 1977). Wobei diese Hämocytenpopulation sicher wiederum eine andere Zusammensetzung hat als die von Jungbienen oder Sammelbienen. Es kann daher die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass sich das Virus in unterschiedlichen Arten von Hämocyten unterschiedlich gut vermehren kann.

Betrachten wir Abb. 39, 40 und 42 noch einmal etwas genauer, so fällt auf, dass in älteren Bienen auch die Hämolymp-proben der ABPV-infizierten Individuen deutliche antimikrobielle Aktivität im Hemmhof-Test zeigen. Dass die beobachtbaren Hemmhöfe in älteren Bienen zudem alle braun gefärbt sind, spricht sehr für eine aktive Phenoloxidase in der

Hämolymphe. Wie bereits erwähnt, konnten Schmid et al. (2008) zeigen, dass zwar die Anzahl an Hämozyten mit steigendem Alter der Bienen zurückgeht, im Gegensatz dazu aber die Phenoloxidase-Aktivität zunimmt. Es ist anzunehmen und konnte teilweise auch schon gezeigt werden, dass Phenoloxidase antivirale Eigenschaften besitzt (Sparks et al., 2008). Daher ist nicht auszuschließen, dass dies ebenfalls für die Phenoloxidase der Honigbiene gilt, vor allem angesichts der Tatsache, dass vor allem ältere Bienen mit erhöhter Phenoloxidase-Aktivität immunkompetenter zu sein scheinen, sowohl im Hinblick auf eine Bakterieninfektion, als auch auf eine ABPV-Infektion.

Da die Erforschung der antiviralen Abwehr gerade erst begonnen hat, sind in den nächsten Jahren eine Menge neuer Erkenntnisse zu erwarten. Neben RNAi als antiviralem Mechanismus in *Drosophila* (van Rij et al., 2006), *Anopheles* und *Aedes* (Arjona et al., 2011), wurde inzwischen sowohl in *Drosophila* als auch in Moskitos die Beteiligung der verschiedenen Signalkaskaden wie Toll-, Imd-, aber auch der Jak/STAT-Signalkaskade an einer antiviralen Abwehr beobachtet (Dostert et al., 2005; Zambon et al., 2005; Costa et al., 2009; Arjona et al., 2011). Strand (2008) vermutet darüber hinaus, dass Hämozyten ebenfalls, eine wichtige Rolle in der Virusabwehr spielen, da die meisten Viren sich innerhalb des Hämocoels vermehren.

### **5.5. Vorteile des ABPV-Larven-Modells zum Überprüfen der Wirksamkeit künstlicher RNasen**

In einer Zusammenarbeit mit dem „Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine“ der Russischen Akademie der Wissenschaften in Novosibirsk wurde eine von fünf künstlichen RNasen (aRNase) auf ihre Fähigkeit überprüft ABPV zu inaktivieren. aRNasen sind organische Moleküle, die klein genug sind, um die Virushülle passieren zu können. Im Virus selbst schneiden sie die Phosphodiesterbindungen des RNA-Genoms und zerstören bzw. inaktivieren es auf diese Weise. Die aRNase Dp12F6 erwies sich in Vorversuchen als die Wirksamste (Fedorova et al., 2011). In ihrer Struktur beherbergt sie zwei DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan) – Reste, die starke Affinität zu RNA aufweisen, zudem einen Benzolring und zwei Fluoropolymere, die zu ihrer Stabilität beitragen. Ein Vorteil von Dp12F6 gegenüber den anderen aRNasen ist z.B. ihre geringe toxische Wirkung auf Larven, selbst hohe Konzentrationen von 400 µM zeigen keine Auswirkung auf das Hämolymphe-Proteinmuster oder das äußere Erscheinungsbild (Abb. 48 und 49). Zudem konnte klar gezeigt werden, dass Dp12F6 auch in niedrigen Konzentrationen in der Lage ist ABPV effizient zu

inaktivieren, erkennbar an den hohen Überlebensraten der Larven und der normalen Gewichtsentwicklung (Tabelle 38 und 39). Es sollte jedoch erwähnt werden, dass die aRNase nicht in der Lage ist sämtliche ABPV-Partikel zu inaktivieren, jedoch bei weitem genügend Partikel, um keine Infektion mehr hervorzurufen.

Dass künstliche RNasen irgendwann zur Behandlung virusinfizierter Bienenstöcke eingesetzt werden, ist äußerst unwahrscheinlich, da diese Moleküle zum Einen sehr teuer sind und zum Anderen noch nichts darüber bekannt ist, wie und ob diese Moleküle RNA-Viren *in vivo*, d.h. ohne vorherige Inkubation, überhaupt inaktivieren können. Bei einer oralen Verabreichung müssten dann zudem wieder größere Mengen eingesetzt werden als bei einer Injektion, zudem ist dann die aufgenommene Menge pro Biene in einem ganzen Bienenvolk sehr schwer einzuschätzen. Falls die Bienen die künstlichen RNasen überhaupt als Futter annehmen würden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse und Weitere, die in der Arbeit von Fedorova et al. (2011) zusammengefasst sind, sind insofern bemerkenswert, da sich hier mit dem erstmaligen Einsatz der Honigbiene in der Virusforschung und der erstmaligen erfolgreichen Inaktivierung von ABPV die Möglichkeit ergibt, das ABPV-Larven-Modell zum Überprüfen der Wirksamkeit antiviraler, künstlicher Ribonukleasen heranzuziehen, anstelle der üblichen Mäuse- oder Rattenmodelle. Vorteile des ABPV-Larven-Modells sind zum Einen die *In-vitro*-Aufzucht von Bienenlarven, die eine einfache, schnelle und reproduzierbare Bereitstellung einer beliebigen Anzahl von Versuchstieren ermöglicht (Randolt et al., 2008). Zum Anderen ist die starke Reaktion von Larven auf eine ABPV-Infektion, d.h. eine starke Änderung des äußeren Erscheinungsbildes (Abb. 52) und das Absterben der Larven innerhalb von 12 bis 24 h p.i., bestens geeignet, um neue Wirkstoffe gegen RNA-Viren am Beispiel von ABPV zu testen. Mittels Inaktivierung durch künstliche RNasen können zudem neue Impfstoffe gegen RNA-Viren entwickelt werden, da künstliche RNasen die Virushülle nicht zerstören (Goncharova et al., 2009; Fedorova et al., 2011). Diese Virushülle ist das eigentliche Ziel der Antikörper bei der adaptiven Immunantwort und wird häufig bei der Impfstoffherstellung mittels Inaktivierung durch Formaldehyd oder Hitze verändert.

## **6. Zusammenfassung**

Das angeborene Immunsystem von Insekten besteht aus einer humoralen Komponente, die die Expression spezifischer antimikrobieller Peptide (AMPs) reguliert, einer zellulären Komponente, die Hämocyten aktiviert und Phagozytose sowie Einkapselungen zur Folge hat, und dem Prophenoloxidase-aktivierenden System, das zur Synthese von Chinonen und Melanin führt. Fast alle Erkenntnisse über das angeborene Immunsystem stammen von Arbeiten mit Modellorganismen wie z.B. *Drosophila*, *Manduca sexta* oder *Anopheles gambiae*. Wie genau das Immunsystem der Honigbiene (*Apis mellifera*) funktioniert, ist noch relativ unbekannt. Doch erfährt die Honigbiene immer mehr Aufmerksamkeit, da sie seit der starken Verbreitung der *Varroa*-Milbe in den letzten Jahren extrem gefährdet ist. Gründe sind die Schwächung des Immunsystems durch die Milbe und die Vielzahl von Viren, die *Varroa* übertragen kann. In der vorliegenden Arbeit wurden die unterschiedlichen Immunreaktionen aller drei Entwicklungsstadien der Honigbiene nach artifizieller Infektion mit Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien (*Escherichia coli* und *Micrococcus flavus*) und dem Akuten Bienen Paralyse Virus (ABPV) untersucht und verglichen.

Nach einer *E. coli*-Injektion ( $10^4$  bzw.  $10^5$  Zellen) kommt es in Larven und adulten Arbeiterinnen zu keiner Änderung des äußeren Erscheinungsbildes und keiner signifikanten Verringerung der Überlebensrate. In beiden Entwicklungsstadien wird die humorale Immunantwort stark induziert, erkennbar an der Expression der antimikrobiellen Peptide Hymenoptaecin, Defensin1 und Abaecin. Weitere immunspezifische Proteine sind in larvaler Hämolymphe nicht nachweisbar. Dafür werden in Jungbienen nach bakterieller Infektion vier weitere immunspezifische Proteine exprimiert: 1. die Prophenoloxidase, 2. das Peptidoglycan Recognition Protein-S2 (PGRP-S2), 3. eine Carboxylesterase (CE1) und 4. das hymenopteren-spezifische Immune-Responsive Protein 30 (IRp30). Die Expression von CE1 und IRp30 zeigt den gleichen zeitlichen Verlauf wie die der AMPs, d.h. sie beginnt frühestens 6 h nach der Infektion (p.i.). Über die genaue Funktion von CE1 und IRp30 ist allerdings noch nichts bekannt, doch weisen beide Proteine ein Leucin-Reissverschlussmotiv auf, was eine Interaktion mit anderen Proteinen nahelegt. In Jungbienen kommt es zudem nach *E. coli*-Injektion innerhalb von 2 h p.i. zu einer raschen Abnahme an lebenden Bakterien in der Hämolymphe, was auf eine Aktivierung der zellulären Immunantwort schließen lässt. Gram-positive *M. flavus*-Zellen werden sogar noch schneller und fast vollständig aus dem Hämocoel entfernt.

Ältere Bienen (z.B. Ammenbienen, Nektarsammlerinnen) und Winterbienen zeigen eine in vieler Hinsicht stärkere Immunkompetenz als Jungbienen. In Winterbienen exprimieren nicht-infizierte Individuen konstitutiv geringe Mengen der immunspezifischen Proteine IRp30 und CE1. Die Expression von IRp30 kann dabei durch Verwundung oder Injektion von *E. coli* noch gesteigert werden. Eine weitere Besonderheit in älteren Bienen ist die im Vergleich zu Jungbienen raschere Abnahme an lebenden Bakterien in der Hämolymphe bis hin zur vollständigen Eliminierung. Gründe hierfür könnten eine stärkere zelluläre Immunantwort sein, da Winterbienen auch mehr Hämocyten besitzen als Jungbienen oder aber eine stärkere Aktivität der Phenoloxidase, die unter anderem an der Synthese cytotoxischer Chinone beteiligt ist.

Im Gegensatz zu Larven und adulten Bienen lieferten Puppen völlig unerwartete Ergebnisse nach bakterieller Infektion. Nach Injektion von  $10^3$  oder  $10^5$  *E. coli*-Zellen kommt es innerhalb von 24 h p.i. zu einem tödlichen Kollaps, der sich in einer Graufärbung des gesamten Körpers der Puppen äußert. Da keine Expression von AMPs nachzuweisen war, wird die humorale Immunantwort offensichtlich nicht induziert. Auch die zelluläre Immunantwort scheint nicht aktiviert zu werden, denn es konnte keine Abnahme an lebenden *E. coli*-Zellen beobachtet werden. Aufgrund fehlender humoraler und zellulärer Immunreaktionen vermehrt sich *E. coli* im Hämocoel infizierter Puppen und scheint damit deren Tod herbeizuführen.

Nach viraler Infektion wurden in allen drei Entwicklungsstadien der Honigbiene gänzlich andere Reaktionen beobachtet als nach bakterieller Infektion. Bei dem verwendeten Akuten Bienen Paralyse Virus (ABPV) handelt es sich um ein Picorna-ähnliches Virus mit einem positiv-orientierten, einzelsträngigen RNA-Genom in einer nackten Capsidproteinhülle, dessen Vermehrung in der Hämolymphe über die massive Synthese der Capsidproteine verfolgt werden kann. Eine Injektion von sehr wenigen ABPV-Partikeln ins Hämocoel hat im Gegensatz zu einer bakteriellen Infektion dramatische Auswirkungen auf Larven. Bei  $10^3$  injizierten Viruspartikeln kommt es innerhalb weniger Stunden zu einer raschen Virusvermehrung und schon 24 h p.i. zum Tod, häufig begleitet von einer Schwarzfärbung der gesamten Larve. Kurz vor dem Ableben kommt es neben dem Abbau hochmolekularer Speicherproteine zur Expression zahlreicher Proteine, die an der Translation, dem Energiehaushalt oder dem Schutz vor oxidativem Stress beteiligt sind. Ob diese Reaktion auf Nekrose oder Apoptose, d.h. gezieltem Zelltod, beruht, bleibt zu untersuchen. Auf Jungbienen

hat eine ABPV-Infektion keine so dramatischen Auswirkungen wie auf Larven. Sie zeigen lediglich eine anormale Beinstellung und eine unsichere Körperhaltung im Stehen oder Laufen. Jungbienen überleben länger als Larven bei höheren injizierten Partikelzahlen, die Virusvermehrung ist langsamer und es kommt zu keiner starken Veränderung des Hämolymp-Protteinmusters. Es konnte gezeigt werden, dass es in ABPV-infizierten Larven oder adulten Bienen zu keiner erkennbaren Aktivierung des humoralen Immunsystems in Form von exprimierten AMPs kommt. Zudem scheint die humorale Immunantwort auch nicht unterdrückt zu werden, denn nach gleichzeitiger Injektion von *E. coli* und ABPV kommt es neben der Expression viraler Capsidproteine auch zur Expression von AMPs. Zusätzlich konnte in Jungbienen nach Infektion mit ABPV eine zelluläre Immunantwort in Form von Nodulation ausgeschlossen werden.

Ältere Bienen scheinen nicht nur mit bakteriellen Infektionen, sondern auch mit einer ABPV-Infektion besser zurechtzukommen. Bei einer Menge an ABPV-Partikeln, die in Jungbienen spätestens 72 h p.i. zum Tod führt, ist in Winterbienen eine Virusvermehrung erst ab 96 h p.i. erkennbar und diese beeinträchtigt die Überlebensrate kaum. Interessanterweise zeigen die Hämolympproben der ABPV-infizierten älteren Bienen deutliche antimikrobielle Aktivität im Hemmhof-Test, was möglicherweise auf bakterielle Infektionen im Verlauf der längeren Lebensdauer der Bienen zurückzuführen ist.

Puppen sind einer Virusinfektion genauso schutzlos ausgeliefert wie einer Bakterieninfektion. Es kommt zwar zu keiner starken Änderung des äußeren Erscheinungsbildes, jedoch bleiben Puppen in ihrer Entwicklung komplett stehen. Das Virus muss sich daher stark vermehren, allerdings nicht überwiegend - wie bei Larven und adulten Bienen - in der Hämolymphe.

Künstliche RNasen (aRNasen) sind kleine organische Moleküle, die Virushüllen passieren und das RNA-Genom zerstören können. Die aRNase Dp12F6 zeigt eine geringe toxische Wirkung auf Larven und ist selbst bei niedrigen Konzentrationen ( $\leq 40 \mu\text{M}$ ) in der Lage, ABPV zu inaktivieren. Der Einsatz künstlicher RNasen in der imkerlichen Praxis ist aus finanziellen und praktischen Gründen nicht realisierbar. Dafür wurden neue Möglichkeiten aufgezeigt, die Honigbiene als Versuchstier und besonders das ABPV-Larven-Modell in der Virusforschung bei der Entwicklung und Prüfung neuer antiviraler Wirkstoffe einzusetzen.

## **7. Summary**

The innate immune system of insects comprises of a humoral component, which regulates the expression of specific antimicrobial peptides (AMPs), a cellular component, which activates haemocytes and is therefore responsible for phagocytosis and encapsulation, and the prophenoloxidase-activating system, which leads to the synthesis of quinones and melanin. Almost all knowledge about the innate immune system derives from model organisms like *Drosophila*, *Manduca sexta* or *Anopheles gambiae*. The exact mechanisms of the innate immune system of the honey bee (*Apis mellifera*) have yet to be discovered. But the honey bee attracts more and more attention since it is extremely endangered by the almost worldwide spread of the mite *Varroa destructor* during the last years. Reasons are the weakening of the immune system by the mite and the fact that numerous viruses can be transmitted by *Varroa*. This work investigates and compares the immune reactions of all three developmental stages of the honey bee after artificial infection with Gram-negative and Gram-positive bacteria (*Escherichia coli* and *Micrococcus flavus*) and the Acute bee paralysis virus (ABPV).

After injection of *E. coli* ( $10^4$  and  $10^5$  cells, respectively) neither a change in the outer appearance nor a significant reduction of the survival rate of larvae or adult worker bees can be observed. In both developmental stages, a strong induction of the humoral immune response visible by the expression of the antimicrobial peptides hymenoptaecin, defensin1 and abaecin occurs. Other immune-specific proteins can not be detected in larval haemolymph. However, bacterial challenge of young adult worker bees leads to the expression of four additional immune-specific proteins: 1. prophenoloxidase, 2. peptidoglycan recognition protein-S2 (PGRP-S2), 3. a carboxylesterase (CE1) and 4. the hymenoptera-specific immune-responsive protein (IRp30). The expressions of CE1 and IRp30 show the same time course as the expression of AMPs; that is it starts as early as 6 h post-infection (p.i.). The exact functions of CE1 and IRp30 are still unknown, but both proteins possess a leucine-zipper motif, which indicates an interaction with other proteins. Furthermore, after injection of *E. coli*-cells into the haemocoel of young adult worker bees a fast decrease of living bacteria in the haemolymph could be observed, possibly due to the activation of the cellular immune response. Gram-positive *M. flavus*-cells vanish even faster and almost completely.

Older bees (e.g. nurse bees, nectar foragers) and winter bees show a stronger immune competence in many ways. In winter bees even non-infected individuals express constitutively low amounts of the immune-responsive proteins IRp30 and CE1. The expression of IRp30 can still be enhanced by wounding or injection of *E. coli*. Moreover, older bees display a drastic reduction of living bacteria in the haemolymph as compared to young adult worker bees resulting in an almost complete elimination. The reason for this impressive immune reaction may be a stronger cellular immune response since winter bees possess more haemocytes than young adult worker bees, or a more active phenoloxidase, amongst other features responsible for the synthesis of cytotoxic quinones.

In contrast to larvae and young adult worker bees, pupae react surprisingly different to a bacterial challenge. Injection of  $10^3$  or  $10^5$  living *E. coli*-cells leads to a deadly collapse within 24 h p.i. accompanied by a colour change of the whole pupal body from white to grey. Since no visible expression of AMPs could be detected, the humoral immune response obviously was not induced. The same appears to be true for the cellular immune response, as no decrease in living *E. coli*-cells was observed upon infection. Because of this lack of humoral and cellular immune reactions, *E. coli* can proliferate in the haemocoel of infected pupae and potentially cause their death.

All three developmental stages of the honey bee show completely different reactions to a viral infection than to a bacterial challenge. The Acute bee paralysis virus (ABPV) used in this study is a picorna-like virus with a positive, single-stranded RNA-genome and a non-enveloped protein capsid. Its proliferation in the haemocoel can be monitored by a massive synthesis of capsid proteins in the haemolymph. In contrast to a bacterial challenge, injection of only a few ABPV-particles into the haemocoel has tremendous effects on larvae. Injection of  $10^3$  viral particles leads to a strong viral multiplication within hours and to death 24 h p.i. often accompanied by a colour change of the whole larva from pale-white to black. In addition to a visible degradation of high-molecular storage proteins shortly before the larvae die, the expression of proteins involved in translation, energy metabolism or protection against oxidative stress can be observed. If these reactions are due to necrosis or apoptosis, which means controlled cell-death, remains to be elucidated. Young adult worker bees do not show such a tremendous reaction as larvae to a viral infection. They just display an abnormal leg posture and an insecure locomotion. In contrast to larvae, young adult worker bees show better survival rates for higher numbers of injected virus-particles, the viral multiplication

proceeds slower and there is no strong visible change of the haemolymph protein pattern. It could be demonstrated that no expression of AMPs and therefore no detectable activation of the humoral immune system by the virus occurs. But the humoral immune response also does not seem to be suppressed, since a simultaneous injection of *E. coli* and ABPV leads to the expression of viral capsid proteins in concert with the expression of AMPs. Additionally, nodulation, a prominent cellular immune response of young adult worker bees to bacterial infection, is likewise not initiated by ABPV-infection.

Older bees apparently are not only capable of better fighting a bacterial infection, but also in surviving an ABPV-infection. Injection of an amount of viral particles leading to death of young adult worker bees within 72 h p.i., only leads to just detectable amounts of virus in winter bees 96 h p.i.. At the same time, the survival rate is not more impaired than after *E. coli*-injection. Interestingly, haemolymph samples of ABPV-infected older bees show antimicrobial activity in a zone-inhibition assay, possibly due to bacterial infections acquired during their longer lifespan.

Pupae are as susceptible to a viral infection as to bacterial challenge. Although there is no strong visible change in the outer appearance, the pupae's development ceases within 3 d p.i.. This is possibly due to a strong multiplication of the virus, but obviously not mainly in the haemolymph, as it can be observed in larvae and adult bees as well.

Artificial RNases (aRNases) are small organic molecules capable of passing the virus capsid and destroying the RNA-genome by cleaving the phosphodiester bonds. The aRNase Dp12F6 is only slightly toxic to larvae and has the ability to inactivate ABPV efficiently even at low concentrations ( $\leq 40 \mu\text{M}$ ). The use of aRNases in beekeeping is not feasible for financial and practical reasons. However, the honey bee has been established as a novel model organism - especially the ABPV/larvae model - in virus research for the development and screening of new potential antiviral drugs.

## **8. Literaturverzeichnis**

- Albert, Š., Gätschenberger, H., Azzami, K., Gimple, O., Grimmer, G., Fujiyuki, T., Sumner, S., Tautz, J., Mueller, M.J. (2011).** Evidence of a novel immune responsive protein in the Hymenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.ibmb.2011.09.006
- Allen, M., Ball, B. (1996).** The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* **77**, 141-162.
- Amdam, G. V. und Omholt, S. W. (2002).** The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *J. theor. Biol.* **216**, 209-228.
- Amdam, G.V., Simões, Z.L.P., Guidugli, K.R., Norberg, K., Omholt, S.W. (2003).** Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology* **3**:1.
- Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W. (2004a).** Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 1799-1802.
- Amdam, G.V, Simões, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schröder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T.B.L. und Omholt, S.W. (2004b).** Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Ger.* **39**, 767-773.
- Anderson, D.L., Trueman, J.W.H. (2000).** *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarology* **24**, 165-189.
- Arjona, A., Wang, P., Montgomery, R.R., Fikrig, E. (2011).** Innate immune control of West Nile virus infection. *Cell. Microbiol.* doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01649.x
- Arrese, E.L., Soulagés, J.L. (2010).** Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 207-255.
- Ball, B. V. (1985).** Acute paralysis virus isolates from honeybee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *J. Apicult. Res.* **24**, 115-119.
- Ball, B.V., Allen, M.F. (1988).** The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann. Appl. Biol.* **113**, 237-244.
- Bailey, L. (1955).** The infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* (Zander). *Parasitology*, **45**, 86-94.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, R.D. (1963).** Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* **21**, 390-395.
- Bailey, L., Gibbs, A.J. (1964).** Acute infection of bees with paralysis virus. *J. Insect Pathol.* **6**, 395-407.
- Bailey, L., Milne, R.G. (1969).** The multiplication regions and interaction of Acute and Chronic bee-paralysis viruses in adult honey bees. *J. Gen. Virol.* **4**, 9-14.

- Bailey, L., Ball, B.V. (1991).** Honey bee pathology. Second edition, *Academic Press*.
- Bakonyi, T., Grabensteiner, E., Kolodziejek, J., Rusvai, M., Topolska, G., Ritter, W., Nowotny, N. (2002).** Phylogenetic analysis of acute bee paralysis virus strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 6446-6450.
- Bedick, J.C., Tunaz, H., Nor Aliza, A.R., Putnam, S.M., Ellis, M.D., Stanley, D.W. (2001).** Eicosanoids act in nodulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, *Apis mellifera*, but not in older foragers. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **130**, 107-117.
- Beye, M., Härtel, S., Hagen, A., Hasselmann, M., Omholt, S.W. (2002).** Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Ins. Mol. Biol.* **11**, 527-532.
- Bíliková, K., Wu, G., Šimúth J. (2001).** Isolation of a peptide fraction of honeybee royal jelly as a potential anti-foulbrood factor. *Apidologie* **32**, 275-283.
- Bowen-Walker, P.L., Martin, S.J., Gunn, A. (1999).** The transmission of Deformed Wing Virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invertebr. Pathol.* **73**, 101-106.
- Brødsgaard, C.J., Ritter, W., Hansen, H., Brødsgaard, H.F. (2000).** Interactions among *Varroa jacobsoni* mites, acute paralysis virus, and *Paenibacillus larvae larvae* and their influence on mortality of larval honeybees in vitro. *Apidologie* **31**, 543-554.
- Büyükgüzel, E., Tunaz, H., Stanley, D., Büyükgüzel, K. (2007).** Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *J. Insect Physiol.* **53**, 99-105.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., Tempst, P. (1989).** Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* **8**, 2387-2391.
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., van Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., Tempst, P. (1990).** Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* **187**, 381-386.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Tempst, P. (1993).** Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.* **268**, 7044-7054.
- Casteels-Josson, K., Capaci, T., Casteels, P., Tempst, P. (1993).** Apidaecin multi-peptide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. *EMBO J.* **12**, 1569-1578.
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., Tempst, P. (1994).** Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *J. Biol. Chem.* **269**, 28569-28575.
- Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhall, K. (2008).** The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology* **29**, 263-271.

- Chen, Y.P., Pettis, J.S., Collins, A., Feldlaufer, M.F. (2006).** Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 606-611.
- Chen, Y.P., Siede, R. (2007).** Honey bee viruses. *Adv. Virus Res.* **70**, 33-80.
- Corbett, J.M., Dunn, M.J., Posch, A., Görg, A. (1994).** Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* **15**, 1205-1211.
- Costa, A., Jan, E., Sarnow, P., Schneider, D. (2009).** The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. *PLoS ONE* **4**(10); e7436.
- Cox-Foster, D., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Phenix-Lan, Q., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I. (2007).** A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**, 283-286.
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, H.F.Jr., Evans, J.D., Chen, Y. (2011).** *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Gen. Virol.* **92**, 151-155.
- de Miranda, J.R., Drebot, M., Tyler, S., Shen, M., Cameron, C.E., Stoltz, D.B., Camazine, S.M. (2004).** Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *J. Gen. Virol.* **85**, 2263-2270.
- de Miranda, J.R., Cordoni, G., Budge, G. (2010a).** The Acute bee paralysis-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, S30-S47.
- de Miranda, J.R., Dainat, B., Locke, B., Cordoni, G., Berthoud, H., Gauthier, L., Neumann, P., Budge, G.E., Ball, B.V., Stoltz, D.B. (2010b).** Genetic characterization of slow bee paralysis virus of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Gen. Virol.* **91**, 2524-2530.
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Imler, J.-L. (2005).** The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nature Immunology* **6**, 946-953.
- Durmuş, Y., Büyükgüzel, E., Terzi, B., Tunaz, H., Stanley, D., Büyükgüzel, K. (2008).** Eicosanoids mediate melanotic nodulation reactions to viral infection in larvae of the parasitic wasp, *Pimpla turionellae*. *J. Insect Physiol.* **54**, 17-24.
- European Union (2010).** Honeybee Health. Directorate-General for Health & Consumers.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D. (2006).** Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* **15**, 645-656.
- Fedorova, A.A., Azzami, K., Ryabchikova, E.I., Spitsyna, Y.E., Silnikov, V.N., Ritter, W., Gross, H.J., Tautz, J., Vlassov, V.V., Beier, H., Zenkova, M.A. (2011).** Inactivation of a non-enveloped RNA virus by artificial ribonucleases: honey bees and Acute bee paralysis

virus as a new experimental model for in vivo antiviral activity assessment. *Antiviral Res.* **91**, 267-277.

**Fluri, P., Wille, H., Gerig, L., Lüscher, M. (1977).** Juvenile hormone, vitellogenin and haemocyte composition in winter worker honeybees (*Apis mellifera*). *Experientia* **33/9**, 1240-1241.

**Fluri, P. (1993).** Die Regulation der Lebensdauer bei Bienenarbeiterinnen. *Schweizerische Bienenzeitung* **116**, 624-629.

**Free, J.B. (1967).** Factors determining the collection of pollen by honeybee foragers. *Anim. Behav.* **15**, 134-144.

**Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K. (1990).** A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J. Biol. Chem.* **265**, 11333-11337.

**Fujiyuki, T., Takeuchi, H., Ono, M., Ohka, S., Sasaki, T., Nomoto, A., Kubo, T. (2004).** Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honeybees. *J. Virol.* **78**, 1093-1100.

**Garver, L.S., Wu, J., Wu, L.P. (2006).** The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 660-665.

**Genersch, E., Aubert, M. (2010).** Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet Res* **41:54**.

**Ghosh, R.C., Ball, B.V., Willcocks, M.M., Carter, M.J. (1999).** The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *J. Gen. Virol.* **80**, 1541-1549.

**Gisder, S., Aumeier, P., Genersch, E. (2009).** Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* **90**, 463-467.

**Goncharova, E.P., Kovpak, M.P., Ryabchikova, E.I., Konevets, D.A., Sil'nikov, V.N., Zenkova, M.A., Vlasov, V.V. (2009).** Viral genome cleavage with artificial ribonucleases: a new method to inactivate RNA-containing viruses. *Doklady Biochem. Biophys.* **427**, 221-224.

**Govan, V.A., Leat, N., Allsopp, M., Davison, S. (2000).** Analysis of the complete genome sequence of Acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology* **277**, 457-463.

**Guidugli, K.R., Nascimento, A.M., Amdam, G.V., Barchuk, A.R., Omholt, S., Simões, Z.L.P., Hartfelder, K. (2005).** Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters* **579**, 4961-4965.

**Handbook 2D-Electrophoresis Principles and Methods (2010).** *GE Healthcare*.

**Hedges, L.M., Johnson, K.N. (2008).** Induction of host defence responses by *Drosophila C* virus. *J. Gen. Virol.* **89**, 1497-1501.

- Heine, H. (2004).** Wie das angeborene Immunsystem Pathogene erkennt. *BIOforum* **9/2004**, 36-37.
- Higes, M., Martín, R., Meana, A. (2006).** *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* **92**, 93–95.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Aránzazu, M. (2007).** Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invert. Path.* **94**, 211–217.
- Hölldobler, B., Wilson, E. O. (2009).** Der Superorganismus. *Springer-Verlag Heidelberg*.
- Imdorf, A., Ruoff, K., Fluri, P. (2008).** Volksenwicklung bei der Honigbiene. *ALP forum* 2008, Nr. 68d.
- Johnson, R. (2010).** Honey bee colony collapse disorder. *Congressional Research Service*, 7-5700, www.crs.gov, RL33938.
- Kitamura, N., Semler, B.L., Rothberg, P.G., Larsen, G.R., Adler, C.J., Dorner, A.J., Emini, E.A., Hanecak, R., Lee, J.J., van der Werf, S., Anderson, C.W., Wimmer, E. (1981).** Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* **291**, 547-553.
- Klaudiny, J., Albert, Š., Bachanová, K., Kopernický, J. und Šimúth, J. (2005).** Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 11-22.
- Klee, J., Besana, A., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R. (2007).** Widespread dispersal of the microsporidium *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* **96**, 1–10.
- Klose, J. (1975).** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231-243.
- Kralj, J., Brockmann, A., Fuchs, S., Tautz, J. (2006).** The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *J. Comp. Physiol. A* **193**, 363-370.
- Kubota, M., Tsuji, M., Nishimoto, M., Wongchawalit, J., Okuyama, M., Mori, H., Matsui, H., Surarit, R., Svasti, J., Kimura, A., Chiba, S. (2004).** Localization of  $\alpha$ -Glucosidases I, II and III in organs of European honeybees, *Apis mellifera* L., and the origin of  $\alpha$ -Glucosidase in honey. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 2346-2352.
- Kuznetsova, I.L., Zenkova, M.A., Gross, H.J., Vlassov, V.V. (2005).** Enhanced RNA cleavage within bulge-loops by an artificial ribonuclease. *Nucleic Acids Res.* **33**, 1201-1212.
- Lanzi, G., de Miranda, J.R., Boniotti, M.B., Cameron, C.E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S.M., Rossi, C. (2006).** Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.* **80**, 4998-5009.

- Lanzrein, B., Pfister-Wilhelm, R., Wyler, T., Trenczek, T., Stettler, P. (1998).** Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. *J. Insect Physiol.* **44**, 817-831.
- Liljas, L., Tate, J., Lin, T., Christian, P., Johnson, J.E. (2002).** Evolutionary and taxonomic implications of conserved structural motifs between picornaviruses and insect picorna-like viruses. *Arch. Virol.* **147**, 59-84.
- Leat, N., Ball, B., Govan, V., Davison, S. (2000).** Analysis of the complete genome sequence of black queen cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J. Gen. Virol.* **81**, 2111-2119.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J. (2007).** The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 697-743.
- Lipke, P.N., Ovalle, R. (1998).** Cell wall architecture in Yeast: a new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **180**, 3735-3740.
- Lourenço, A.P., Zufelato, M.S., Bitondi, M.M. G. und Simoes, Z.L.P. (2005).** Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 541-552.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E., Sela, I. (2007).** Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J. Gen. Virol.* **88**, 3428-3438.
- Mayo, M.A. (2002).** Virus Taxonomy-Houston 2002. *Arch. Virol.* **147**, 1071-1076.
- Meister, G., Tuschl, T. (2004).** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-349.
- Moore, N.F., Kearns, A., Pullin, J.S. (1980).** Characterization of Cricket paralysis virus-induced polypeptides in *Drosophila* cells. *J. Virol.* **33**, 1-9.
- Moore, N.F., Reavy, B., Pullin, J.S.K., Plus, N. (1981).** The polypeptides induced in *Drosophila* cells by *Drosophila C* virus (strain Ouarzazate). *Virology* **112**, 411-416.
- Mülhardt, C. (2009).** Der Experimentator, Molekularbiologie/Genomics, 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Nakashima, N., Uchiumi, T. (2009).** Functional analysis of structural motifs in dicistroviruses. *Virus Res.* **139**, 137-147.
- Nitschmann, J., Hüsing, J.O. (1987).** Lexikon der Bienenkunde. Tosa Verlag, Wien.
- O'Farrell, P. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.

- Page, R.E., Peng, C.Y.-S. (2001).** Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* **36**, 695-711.
- Peng, Y.-S.C., Mussen, E., Fong, A., Montague, M.A., Tyler, T. (1992).** Effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared *in vitro*. *J. Invertebr. Pathol.* **60**, 127-133.
- Pham, L.N., Dionne, M.S., Shirasu-Hiza, M., Schneider, D.S. (2007).** A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathogens* **3**, e26.
- Pham, L.N., Schneider, D.S. (2008).** Evidence for specificity and memory in the insect innate immune response. In: Beckage N.E. (ed) *Insect Immunology*, *Academic Press*, pp. 97-127.
- Pinto, L.Z., Bitoni, M.M.G., Simões, Z.L.P. (2000).** Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J. Insect Sci.* **46**, 153-160.
- Povelones, M., Waterhouse, R.M., Kafatos, F.C., Christophides, G.K. (2009).** Leucine-rich repeat protein complex activates mosquito complement in defense against *Plasmodium* parasites. *Science* **324**, 258-261.
- Randolt, K., Gimple, O., Geissendörfer, J., Reinders, J., Prusko, C., Mueller, M.J., Albert, S., Tautz, J., Beier, H. (2008).** Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **69**, 155-167.
- Ratnieks, F.L.W., Carreck, N.L. (2010).** Clarity on honey bee collapse? *Science* **327**, 152-153.
- Rath, W. (1999).** Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**, 97-110.
- Rehm, H. und Letzel, T. (2010).** Der Experimentator, Proteinbiochemie/Proteomics, 6. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*.
- Rink, L., Gabriel, P. (2000).** Zinc and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society* **59**, 541-552.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2009).** Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, S96-S119.
- Ryan, M.D., Flint, M. (1997).** Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J. Gen. Virol.* **78**, 699-723.
- Sadler, J. E. (1998).** Biochemistry and genetics of Von Willebrand Factor. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 395-424.
- Sambrook, J. und Russel, D. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed., *CSH Press, Cold Spring Harbor NY*.

- Sanford, M.T. (1987).** Diseases and pests of the honey bee. *Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, Circular 766.*
- Schmid, M.R., Brockmann, A., Pirk, C.W.W., Stanley, D.W., Tautz, J. (2008).** Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *J. Ins. Physiol.* **54**, 439-444.
- Seehus, S.-C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G.V. (2006).** Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 962-967.
- Seeley, T. D. (1995).** The Wisdom of the Hive-The Social Physiology of Honey Bee Colonies. *Harvard University Press, Cambridge, London.*
- Shen, M., Yang, X., Cox-Foster, D., Cui, L. (2005a).** The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* **342**, 141-149.
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N., Cox-Foster, D. (2005b).** Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.* **86**, 2281-2289.
- Stanley, D.W., Miller, J.S. (2006).** Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomol. Exp. Appl.* **119**, 1-13.
- Steiner, H. (2004).** Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunol. Rev.* **198**, 83-96.
- Stokstad, E. (2007).** Puzzling decline of U.S. bees linked to virus from Australia. *Science* **317**, 1304-1305.
- Strand, M.R. (2008).** The insect cellular immune response. *Insect Science* **15**, 1-4.
- Sparks, W.O., Bartholomay, L.C., Bonning, B.C. (2008).** Insect immunity to viruses. In: Beckage N.E. (ed) *Insect Immunology, Academic Press*, pp. 209-242.
- Spivak, M., Reuter, G.S. (2001).** Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* **32**, 555-565.
- Tate, J., Liljas, L., Scotti, P., Christian, P., Lin, T., Johnson, J.E. (1999).** The crystal structure of cricket paralysis virus: the first view of a new virus family. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **6**, 765-774.
- Tautz, J. (2007).** Phänomen Honigbiene. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.*
- Trenczek, T. (1998).** Endogenous defense mechanisms of insects. *Zoology* **101**, 298-315.
- UNEP (2010).** United Nations Environment Programme-Environment for development. <http://www.unep.org/Themes/Biodiversity/About/index.asp> (20.09.2011).

- vanEngelsdorp, D., Meixner, M.D. (2010).** A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, S80-S95.
- van Munster, M., Dullemanns, A.M., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F.J.M., Clérivet, A., van der Wilk, F. (2002).** Sequence analysis and genomic organization of Aphid lethal paralysis virus: a new member of the family *Dicistroviridae*. *J. Gen. Virol.* **83**, 3131-3138.
- van Rij, R.P., Saleh, M.-C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., Andino, R. (2006).** The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Gene. Dev.* **20**, 2985-2995.
- Vilmos, P., Kurucz, É. (1998).** Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* **62**, 59-66.
- Wheeler, W. M. (1911).** The ant-colony as an organism. *J. Morphol.* **22**, 307-325.
- Wheeler, W. M. (1928).** The social insects, their origin and evolution. *Harcourt Brace, New York*.
- White, G.F. (1913).** Sacbrood, a disease of bees. *US Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Circular No. 169*.
- Wilson-Rich, N., Dres, S.T., Starks, P.T. (2008).** The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* **54**, 1392-1399.
- Winston, M. L. (1987).** The Biology of the Honey Bee. *Harvard University Press, Cambridge, London*.
- Yang, X., Cox-Foster, D.L. (2005).** Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 7470-7475.
- Zander, E. (1909).** Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Lpz. Bienenstg.* **24**, 147-150, 164-166.
- Zambon, R.A., Nandakumar, M.N., Vakharia, V.N., Wu, L.P. (2005).** The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 7257-7262.

<b>Tabelle S28.</b> Ergänzung zu Tabelle 28 „Proteine in der Hämolymphe erfahrener Pollensammlerinnen“*						
Nr.	Protein	Accession (NCBI)	Molekulare Masse (Da) <sup>a</sup>	SP <sup>b</sup>	Mowse Score	Sequenzübereinstimmung (%)
1	<b>Enolase Serine protease</b>	gi 110761968 gi 110758534	40.149 45.503	- 18	143 133	17 17
2	<b>Carboxylesterase1 Aminooxidase</b> (vollständiger Name: peroxisomal N(1)-acetyl spermine/spermidine oxidase-like isoform 1)	gi 66512983 gi 66525345	65.249 57.178	18 17	143 110	7 5
3	<b>Prophenoloxidase</b> (phenoloxidase subunit A3)	gi 58585196	80.094	-	1309	45
4	<b>Toll-like receptor 13-like</b>	gi 110755367	75.705	17	566	25
5	<b>Alpha-Glucosidase-II</b>	gi 94400901	66.568	24	491	22
<p>* angegeben ist die gi-Nummer vom Tag der Sequenzierung.  <sup>a</sup> die molekulare Masse wurde mithilfe des Programms ProtParam errechnet.  <sup>b</sup> das Vorhandensein eines Signalpeptides wurde mithilfe des Programms TargetP ermittelt, angegeben ist die Länge des Signalpeptides in Aminosäuren.</p>						

**Tabelle S29.** Ergänzung zu Tabelle 29 „Proteine in Kopfextrakten von Arbeiterinnen“\*

Nr.	Protein	Accession (NCBI)	Molekulare Masse (Da) <sup>a</sup>	SP <sup>b</sup>	Mowse Score	Sequenzübereinstimmung (%)
1	<b>Arginine kinase lethal 1 G0156</b>	gi 58585146	40.008	-	664	43
		gi 48102814	39.135	-	524	27
2	<b>Actin-5</b>	gi 1168325	41.771	-	886	49
3	<b>Phosphoglycerate kinase Probable citrate synthase 1, mitochondrial-like Peptidase M16</b> (voller Name: mitochondrial-processing peptidase subunit beta-like) <b>Isocitrate dehydrogenase</b> (voller Name: similar to Isocitrate dehydrogenase) <b>60S ribosomal protein L4</b>	gi 110763826	44.992	-	667	41
		gi 66521738	51.930	-	651	36
		gi 66500205	53.349	M15	170	12
		gi 110764717	46.646	-	164	18
4	<b>MRJP2 precursor Elongation factor 1-alpha Troponin T isoform 2 ATP-Synthase</b> (voller Name: similar to ATP synthase-CG11154-PA, isoform A) <b>6-phosphogluconate dehydrogenase</b> (voller Name: similar to 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, partial)	gi 58585108	51.074	-	637	38
		gi 62526112	50.310	-	373	24
		gi 78101798	48.206	-	312	19
		gi 110762902	55.130	M39	271	-
		gi 66547531	52.453	-	125	8
5	<b>MRJP1 Bellwether</b> (neuer Name: ATP synthase subunit alpha, mitochondrial isoform 1) <b>Aldehyde dehydrogenase</b> (voller Name: Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial isoform 1) <b>Cytosolic non-specific dipeptidase-like Troponin T isoform 2 Calreticulin isoform 1 MRJP7</b>	gi 58585098	48.886	S19	731	43
		gi 48100966	59.512	M8	636	28
		gi 66530423	55.686	M14	599	31
		gi 66535742	54.252	-	556	33
		gi 78101798	48.206	-	455	24
		gi 66545506	47.174	S18	325	20
gi 62198227	50.541	S17	196	13		

6	<b>MRJP3</b> <b>Malic enzyme</b> (voller Name: similar to Malic enzyme CG10120-PB, isoform B)	gi 56422035 gi 110761561	65.696 59.756	S21 M15	1008 119	41 -
7	<b>MRJP3</b> <b>Similar to CG8036-PB</b> (synthetic construct, transketolase)	gi 56422035 gi 110751363	65.696 67.411	S21 -	926 592	35 28
8	<b>MRJP3</b>	gi 56422035	65.696	S21	953	26
9	<b>Phenoloxidase (52-693)</b> <b>Succinate dehydrogenase complex</b> (voller Name: succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial isoform 1) <b>Protein ROP</b> (voller Name: Similar to Protein ROP isoform 1)	gi 58585196 gi 66505480  gi 66505531	74.262 72.462  66.592	- M22  -	244 178  142	13 8  11

\* angegeben ist die gi-Nummer vom Tag der Sequenzierung.

<sup>a</sup> die molekulare Masse wurde mithilfe des Programms ProtParam errechnet.

<sup>b</sup> das Vorhandensein eines Signalpeptides wurde mithilfe des Programms TargetP ermittelt, angegeben ist die Länge des Signalpeptides in Aminosäuren. Ein M zeigt an, dass das Protein für die Mitochondrien bestimmt ist, ein S zeigt an, dass es sekretiert wird.

**Tabelle S31.** Ergänzung zu Tabelle 31 „Hochregulierte Proteine in der Hämolymphe von Larven nach ABPV-Infektion“

Nr.	Protein	Accession (NCBI)	Molekulare Masse (Da) <sup>a</sup>	SP <sup>b</sup>	Mowse Score	Sequenzübereinstimmung (%)
1	<b>Glycogen phosphorylase Elongation factor-2 like TER 94</b>	gi 66557932	97.329	-	490	14
		gi 66508439	94.582	-	510	15
		gi 66534286	88.895	-	190	13
2	<b>Heat shock protein 90 Heat shock protein 1<math>\alpha</math></b>	gi 229892248	83.383	-	415	31
		gi 110749824	82.753	-	375	22
3	<b>Heat shock protein cognate 5</b>	gi 229892203	75.403	-	509	18
4	<b>Protein disulfide-isomerase A3 (ERp60) Hexamerin 70a (238-684)<sup>c</sup> Hexamerin 70b (255-683)<sup>c</sup></b>	gi 66546657	55.856	18	406	19
		gi 148357839	53.497	21	593	41
		gi 58585148	49.359	21	805	46
5	<b>Major Royal Jelly Protein 1</b>	gi 58585098	48.886	19	810	45
6	<b>3-Ketoacyl-CoA thiolase (=Yippeee interacting protein 2)</b>	gi 48097100	42.503	-	1258	68
7	<b>Aldose reductase like Lambda crystallin-like protein Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2</b>	gi 66525576	36.082	-	360	33
		gi 209180477	35.860	-	392	29
		gi 48142692	35.883	-	333	30
8	<b>N-acetylneuraminat pyruvate lyase</b>	gi 110755974	34.019	-	243	24
9	<b>Trypsin-like serine protease 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) Proteasome subunit alpha</b>	gi 110762229	28.596	18	340	25
		gi 66518230	28.776	-	310	23
		gi 110760701	27.099	-	189	18
		gi 58585184	27.191	-	175	27
		gi 66541426	26.718	-	144	19
10	<b>Heat shock protein beta-1-like Peroxioredoxin-like protein Glutathione S-transferase S1</b>	gi 110757651	25.565	-	160	14
		gi 283436152	25.133	-	143	13
		gi 237681308	23.761	-	173	27

<sup>a</sup> die molekulare Masse wurde mithilfe des Programms ProtParam errechnet.

<sup>b</sup> das Vorhandensein eines Signalpeptides wurde mithilfe des Programms TargetP ermittelt, die Zahl zeigt die Länge des Signalpeptides in Aminosäuren.

<sup>c</sup> vermutliche Länge des Degradationsprodukts

## 10. Publikationen

### Begutachtete Publikationen („peer reviewed articles“)

**Randolt, K.**, Gimple, O., Geissendörfer, J., Reinders, J., Prusko, C., Mueller, M.J., Albert, S., Tautz, J., Beier, H. (2008). Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 69, 155–167.

Fedorova, A.A.\*, **Azzami, K.\***, Ryabchikova, E.I., Spitsyna, Y.E., Silnikov, V.N., Ritter, W., Gross, H.J., Tautz, J., Vlassov, V.V., Beier, H., Zenkova, M.A. (2011). Inactivation of a non-enveloped RNA virus by artificial ribonucleases: honey bees and Acute bee paralysis virus as a new experimental model for in vivo antiviral activity assessment. *Antiviral Res.* 91, 267-277.

(\* beide Autoren trugen in gleichem Maße zur Publikation bei)

Albert, Š., Gätschenberger, H., **Azzami, K.**, Gimple, O., Grimmer, G., Fujiyuki, T., Sumner, S., Tautz, J., Mueller, M.J. (2011). Evidence of a novel immune responsive protein in the Hymenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.ibmb.2011.09.006

**Azzami, K.**, Ritter, W., Tautz, J., Beier, H. (2011). Infection of honey bees with Acute bee paralysis virus does not trigger humoral or cellular immune responses. (eingereicht zur Publikation)

### Nicht-begutachtete Publikationen („upon invitation“)

Tautz, J., Beier, H., Gimple, O., **Randolt, K.** (2007). Fitte Bienenvölker: Die vielfältigen Gesundheitsstrategien des Superorganismus „Honigbienenstaat“. *Labor&more* 04/07, 32-33.

### Vorträge und Posterbeiträge auf Kongressen und Tagungen

#### **Vortrag:**

**Randolt, K.**, Gimple, O., Gätschenberger, H., Beier, H., Tautz, J. (2008). Entwicklungsspezifische Expression von antimikrobiellen Proteinen in der Haemolymphe der Honigbiene nach artifizierter Infektion. *55. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V.* in Liebenwalde (Hohen Neuendorf) vom 11.-13. März 2008.

(ausgezeichnet mit dem Joachim-Evenius-Preis der „Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V.“ für den besten studentischen Vortrag)

**Poster:**

**Azzami, K.**, Gätschenberger, H., Gimple, O., Beier, H. (2009). Do winter bees have a weaker immune system compared to summer bees? 56. *Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V.*, 24.-26.03.2009, Schwerin (Deutschland).

Albert, S., **Azzami, K.**, Gätschenberger, H., Grimmer, G., Gimple, O., Mueller, M.J., Tautz, J. (2009). Hypothetical protein of 30 kDa (HP30), a bee-specific immune factor. 56. *Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V.*, 24.-26.03.2009, Schwerin (Deutschland).

Steigerwald, S., Illies, I., **Azzami, K.**, Gätschenberger, H., Tautz, J. (2009). The influence of different pollen diets on the life span and the immune system of the honey bee. 56. *Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V.*, 24.-26.03.2009, Schwerin (Deutschland).

Fujiyuki, T., Beier, H., **Azzami, K.**, Tautz, J., Kubo, T. (2011). Discriminative survey of Kakugo virus and deformed wing virus in honeybee (*Apis mellifera carnica*) colonies in Germany. *International Congress of Virology*, 11.-16.09.2011, Sapporo (Japan).

Fedorova, A.A., Goncharova, E.P., **Azzami, K.**, Beier, H., Zenkova, M.A. (2011). Inactivation of non-enveloped RNA-viruses by artificial ribonucleases – a new class of antiviral compounds. *Antivirals Congress*, 7.-9.11.2011, Amsterdam (The Netherlands).

## 11. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Vornamen	Klara Sonja Laura
Nachname	Azzami, geborene Randolt
Geburtstag	22.03.1981
Geburtsort	Bad Mergentheim
Familienstand	Verheiratet

### Schulbildung

1987-1991	Grundschule Markelsheim
1991-2000	Gymnasium Weikersheim

### Hochschulausbildung

2000-2006	Studium der Biologie an der Universität Würzburg Titel der Diplomarbeit: „Analyse von Virusinfektionen und antiviralen Abwehrsystemen der Honigbiene ( <i>Apis mellifera</i> )“ Betreuerin: Prof. Dr. Hildburg Beier (Lehrstuhl für Biochemie)
Seit Februar 2007	Promotion an der Universität Würzburg Titel der Doktorarbeit: „Antibakterielle und antivirale Abwehrreaktionen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Honigbiene ( <i>Apis mellifera</i> )“ Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Tautz (Lehrstuhl für Verhaltensphysiologie und Soziobiologie, BEEgroup)

### Stipendien

März 2007-Februar 2008	Promotions-Stipendium der Universität Würzburg
------------------------	--

### Anstellung

Seit März 2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im SFB 567, Teilprojekt A9, der Deutschen Forschungsgemeinschaft
----------------	--

### Auszeichnungen

13. März 2008	Joachim-Evenius-Preis der „Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V.“ für den besten studentischen Vortrag
---------------	---