

**Effekt verschiedener Insektizid-Wirkstoffe auf das larvale
mRNA-Transkriptom und auf die Proteinbiosynthese
von *Apis mellifera* (LINNAEUS, 1758)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Arne Kablau

Dezember 2020

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom Mai 2018 bis Juni 2020 unter der Leitung von Professor Dr. Dr. Einspanier am Institut für Veterinärbiochemie der Freien Universität Berlin.

1. Gutachter: Professor Dr. Dr. Ralf Einspanier

2. Gutachter: Professor Dr. Dino McMahon

Disputation am 09.03.2021

Der Bienenstaat gleicht einem Zauberbrunnen,
je mehr man daraus schöpft, desto reicher fließt er.

Karl von Frisch (1886 bis 1982)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Westliche Honigbiene.....	1
1.2 Bedeutung der Honigbiene.....	3
1.3 Bienensterben (Colony Collapse Disorder, CCD).....	3
1.4 Pflanzenschutzmittel.....	4
1.5 Insektizide.....	5
1.5.1 Modulation des cholinergen Nervensystems.....	6
1.5.2 Juvenilhormon-Analoga.....	8
1.5.3 Modulation von Calciumkanälen.....	9
1.6 Physiologische Signalwege.....	10
1.6.1 Toll-Signalweg.....	10
1.6.2 Ecdyson-induzierte Kaskade.....	11
1.6.3 Autophagie-Signalweg.....	12
1.7 Problemstellung.....	14
1.8 Genexpression und Proteinbiosynthese.....	16
1.8.1 Transkriptom.....	16
1.8.2 RT-qPCR.....	16
1.8.3 Proteom.....	17
1.8.4 2D-Gelelektrophorese.....	17
1.9 Untersuchungen zur vergleichenden Genexpression und Proteinbiosynthese bei Larven der Honigbiene.....	18
1.10 Zielsetzung.....	19

Inhaltsverzeichnis

2. Material und Methoden	20
2.1 Das Versuchstier <i>A. mellifera</i>	20
2.2 Larvaler Fütterungsversuch.....	20
2.3 Transkriptomanalyse	24
2.3.1 RNA-Extraktion	24
2.3.2 Quantitative und qualitative RNA-Analyse	24
2.3.3 Primerdesign.....	25
2.3.3.1 Ermittlung der Primer-Qualität	26
2.3.3.2 Ermittlung der Amplicon-Qualität	26
2.3.4 cDNA-Synthese und RT-qPCR.....	27
2.3.4.1 DNase-Verdau	27
2.3.4.2 Reverse Transkription	28
2.3.4.3 RT-qPCR.....	28
2.3.4.4 Auswertung der RT-qPCR	29
2.4 Proteinanalyse	30
2.4.1 Protein-Isolierung und Aufreinigung	30
2.4.2 Quantifizierung der Proteinproben.....	31
2.4.3 CyDye-Markierung der Proteinoberfläche.....	31
2.4.4 2D-Gelelektrophorese	32
2.4.4.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF, 1. Dimension).....	32
2.4.4.2 Massenspezifische Auftrennung (2. Dimension)	32
2.4.4.2.1 Gelanfertigung.....	32
2.4.4.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.4.4.3 Auswertung der 2D-Gelelektrophorese.....	33
2.4.5 Protein-Charakterisierung mittels Massenspektrometrie (MS).....	34

Inhaltsverzeichnis

3. Ergebnisse.....	36
2018.....	36
3.1 Transkriptomanalyse	36
3.1.1 Quantität und Qualität der RNA.....	36
3.1.2 Auswahl der Primer.....	37
3.1.3 RT-qPCR.....	37
3.1.3.1 Auswahl der Referenzgene.....	37
3.1.3.2 Vergleichende Expressionsdaten.....	37
3.1.3.3 Clusteranalyse	40
3.2 Proteinanalyse	44
3.2.1 Quantität der isolierten Proteine.....	44
3.2.2 2D-Gelelektrophorese	44
2019.....	46
3.3 Transkriptomanalyse	46
3.3.1 Quantität und Qualität der RNA.....	46
3.3.2 RT-qPCR.....	47
3.1.2.1 Auswahl der Referenzgene.....	47
3.1.2.2 Vergleichende Expressionsdaten.....	47
3.4 Proteinanalyse	52
3.4.1 Quantität der isolierten Proteine.....	52
3.4.2 2D-Gelelektrophorese	52
3.4.3 Hierarchische Clusteranalyse der Proteindaten.....	57
3.5 Etablierung eines Genarrays zur Beurteilung einer Insektizidintoxikation	59
4. Diskussion	60
4.1 Transkriptomanalyse	60
4.1.1 Quantität und Qualität der RNA.....	60
4.1.2 Vergleichende Expressionsdaten.....	60

Inhaltsverzeichnis

4.1.3 Physiologische Signalwege	65
4.1.3.1 Toll-Signalweg	65
4.1.3.2 Ecdyson-induzierte Kaskade	68
4.1.3.3 Autophagie-Signalweg	70
4.2 Proteinanalyse	72
4.3 Etablierung eines Genarrays zur Beurteilung einer Insektizidintoxikation	76
4.4 Fazit	77
5. Zusammenfassung	81
6. Summary.....	83
7. Literaturverzeichnis	XII
Anhang	XXXVII
Danksagung	LXVII
Selbstständigkeitserklärung.....	LXVIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die motorische Endplatte	7
Abbildung 2: Hormonelle Kontrolle der Metamorphose	9
Abbildung 3: Steuerung des Muskelapparates	10
Abbildung 4: Darstellung des Toll-Signalweges	11
Abbildung 5: Ecdyson-induzierte Signalkaskade	11
Abbildung 6: Signalweg der Autophagie	13
Abbildung 7: Larvaler Fütterungsversuch.....	23
Abbildung 8: Elektrophorese-Daten ausgewählter Proben aus dem Jahr 2018	36
Abbildung 9: Vergleichende Genexpressionsdaten aus dem Jahr 2018.....	39
Abbildung 10: Clusteranalyse der Expressionsdaten von Larven an D8.....	43
Abbildung 11: 2D-Karten der Proteinproben aus 2018	45
Abbildung 12: Elektrophorese-Daten ausgewählter Proben aus dem Jahr 2019	46
Abbildung 13: Darstellung der Expressionsdaten 2019.....	50
Abbildung 14: Streudiagramme der $\Delta\Delta C_t$ -Werte ausgewählter Transkripte in Abhängigkeit vom Alter.....	51
Abbildung 15: Gegenüberstellung der 2D-Gelbilder aus 2018 und 2019.....	53
Abbildung 16: 2D-Karten des gemeinsamen Vergleichs im Jahr 2019	56
Abbildung 17: Hierarchische Clusteranalyse der Proteindaten.....	58
Abbildung 18: Streudiagramme der Transkriptanalyse 2019.....	LXII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Altersbedingte Aufgabenteilung bei Arbeiterinnen von <i>Apis mellifera</i>	3
Tabelle 2: Auflistung der Behandlungsgruppen und den entsprechenden Wirkstoffen.....	22
Tabelle 3: Gewählte Einstellungen für die Primer-Synthese	25
Tabelle 4: Protokoll des DNase-Verdau	27
Tabelle 5: Protokoll der reversen Transkription	28
Tabelle 6: Protokoll für die RT-qPCR	29
Tabelle 7: Referenzgen-Berechnung im Jahr 2018	37
Tabelle 8: Auflistung signifikant regulierter Transkripte im Jahr 2018.....	38
Tabelle 9: Ausgewählte Transkripte anhand der Ergebnisse aus 2018	41
Tabelle 10: Anzahl an induzierten und reprimierten Protein-Spots der 2D-Gelelektrophorese im Jahr 2018	44
Tabelle 11: Auflistung der identifizierten Proteine im Jahr 2018	46
Tabelle 12: Ergebnisse der Normalisierungs-Berechnung der Referenzgene durch geNorm und Normfinder	47
Tabelle 13: Anzahl an reprimierten und induzierten Kandidatenproteinen im Jahr 2019	52
Tabelle 14: Auflistung aller identifizierten Proteine in den Jahren 2018 und 2019	54
Tabelle 15: Auflistung der induzierten und reprimierten Proteine aus der gemeinsamen Auswertung der Jahre 2018 und 2019 (n=8).....	54
Tabelle 16: Spot-Nummern und assoziierte Proteine der 2D-Gelelektrophorese	57
Tabelle 17: Auflistung des etablierten Genarrays nach Insektizidapplikation.....	59
Tabelle 18: Auflistung der 102 verwendeten Primer für die RT-qPCR.....	XXXVII
Tabelle 19: Auflistung der Behandlungsgruppen und den dazugehörigen log ₂ <i>Fold changes</i> des eingesetzten Genarrays von D6 im Jahr 2018	LIII
Tabelle 20: Auflistung der Behandlungsgruppen und den dazugehörigen log ₂ <i>Fold changes</i> des eingesetzten Genarrays von D8 im Jahr 2018	LV
Tabelle 21: Detaillierte Auflistung der identifizierten Proteine im Jahr 2018.....	LVII
Tabelle 22: Differenziell exprimierte Transkripte der RT-qPCR im Jahr 2019.....	LVIII
Tabelle 23: Auflistung der identifizierten Proteine im Jahr 2019	LXV
Tabelle 24: Auflistung aller identifizierten Proteine samt <i>Fold changes</i> und Signifikanzniveaus der Behandlungsgruppen aus dem gemeinsamen Vergleich.....	LXVI

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
♀	Königin (Weisel)
18S	18S rRNA (Sedimentationskoeffizient)
28S	28S rRNA (Sedimentationskoeffizient)
2D	Zweidimensional
3-10 NL	3-10 nonlinear
3D	Dreidimensional
a.s.	Aktive Substanz ("active substance")
<i>ache1</i> /AChE1	Acetylcholinesterase1 (<i>Gen</i> /Protein)
AgNO ₃	Silbernitrat
AMPs	Antimikrobielle Peptide
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Protein-Kinase
ANOVA	Varianzanalyse ("analysis of variance")
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare ("base pairs")
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Kontrolle
CCD	Colony Collapse Disorder
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure ("complementary desoxyribonucleic acid")
CHAPS	3-([3-Cholamidopropyl]Dimethylammonio)-1-Propanesulfonat
Cl	Chlorantraniliprol
CS	Lösungsmittel-Kontrolle ("Control solvent")
C _t	Schwellenwert des exponentiellen Wachstums ("threshold cycle")
DDP1	Deafness dystonia peptide 1

Abkürzungsverzeichnis

DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser
DIGE-Puffer	Differenz-Gelelektrophorese ("difference gel electrophoresis")
Dl	Transkriptionsfaktor Dorsal
DM1	0,05µg Dimethoat
DM2	0,1µg Dimethoat
DM3	0,2µg Dimethoat
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("desoxyribonucleic acid")
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit ("European Food Safety Authority")
et al.	Und anderen (lateinisch: et alia)
etc.	Und so weiter (lateinisch: et cetera)
EU	Europäische Union
F	Flupyradifuron
Fe	Fenoxycarb
g	Gramm
GC	Guanin-Cytosin
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
Hox-Gene	Homöobox-Gene
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Imd	Immundefizienz
IPG	Immobilierter pH-Gradient ("immobilized pH gradient")
K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
K ₂ SO ₄	Kaliumsulfat
kDa	Kilo-Dalton
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
kg	Kilogramm
L	Lipidmolekül
L1	Tag 1-Larven

Abkürzungsverzeichnis

LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung ("Liquid chromatography–mass spectrometry")
LD ₅₀	Letale Dosis, bei der 50% der getesteten Individuen sterben
LE Agarose	Gering elektroosmotische Agarose ("low electroendosmosis")
log ₁₀	Logarithmus zur Basis 10
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
M	Molar
m/s	Meter/Sekunde
MAP	Mitose-aktivierendes Protein
Max	Maximal
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
M-MLV-RT	Moloney-Murines Leukämievirus-Reverse Transkriptase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ("messenger ribonucleic acid")
miRNA	MicroRNA
MS	Massenspektrometrie
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
nAChR	Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	Nukleärer Faktor-kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanomolar
Nrf2	Nuclear factor E2-related factor 2
OD	Optische Dichte
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung ("Organisation for Economic Co-operation and Development")
P	Phosphatrest

Abkürzungsverzeichnis

p	Signifikanzwert (lateinisch: probabilitas)
p53	Tumor-Protein 53
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ("phosphat buffered saline")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
pH	Wasserstoffionenexponenten
pI	Isoelektrischer Punkt
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pmol	Picomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ptth	Prothorakotropes Hormon
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RIN	RNA-Integritäts-Nummer
RNA	Ribonukleinsäure ("ribonucleic acid")
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure ("ribosomale ribonucleic acid")
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	Reverse-Transkriptase quantitative Echtzeit-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
sek	Sekunden
STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription 3
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
Tm	Schmelztemperatur ("melting temperature")
TOR	Target of Rapamycin
TRIS	Tris-aminomethan
u. a.	Unter anderem
U	Enzymeinheit ("enzyme unit")
ULK	Unc-51 Autophagie-aktivierende Kinase
US/U.S.A.	Vereinigte Staaten von Amerika ("United States of America")
V	Volt
VE-H ₂ O	Vollentsalztes Wasser
w/w	Gewichtsteile pro Gewichtsteil ("weight by weight")

Abkürzungsverzeichnis

z.B.	Zum Beispiel
ΔCt	Unterschied der exponentiellen Wachstumsphase ("delta threshold cycle")
$\Delta\Delta Ct$	Unterschied der exponentiellen Wachstumsphase zwischen Probengruppe und Kontrolle ("delta delta threshold cycle")

1. EINLEITUNG

1.1 Die Westliche Honigbiene

Als Versuchstier steht die Westliche Honigbiene im Fokus dieser Arbeit. Sie zählt zur Klasse der Insekten (*Insecta*), innerhalb derer sie zur Ordnung der Hautflügler (*Hymenoptera*) und zur Familie der Echten Bienen (*Apidae*) gehört. Neben der Westlichen Honigbiene gibt es je nach taxonomischer Einteilung noch bis zu elf weitere Honigbienenarten (Lo et al. 2010). Die verbreitetste Auffassung geht weltweit von neun Arten aus, von denen acht in Asien heimisch sind (Oldroyd und Wongsiri 2006): *Apis laboriosa*, *A. dorsata*, *A. mellifera*, *A. koschevnikovi*, *A. nigrocincta*, *A. nuluensis*, *A. cerana*, *A. florea* und *A. andreniformis*.

In der vorliegenden Abhandlung wurde ausschließlich mit der Westlichen Honigbiene (*Apis mellifera*) gearbeitet. Das natürliche Verbreitungsgebiet dieser Art erstreckt sich über Europa, den vorderen Orient und Teilen Afrikas, wobei durch unterschiedliche geographische Lebensräume eine Differenzierung in 26 Unterarten stattfand (Ruttner 2003, Kleinjans et al. 2012). Neben der Herausbildung von Unterarten durch natürliche Selektion begannen Bienenhalter ab dem 20. Jahrhundert mit der künstlichen Kreuzung von Bienenrassen. Die bekannteste Zuchtkreuzung ist die Buckfast-Biene von Bruder Adam, die 1916 im gleichnamigen englischen Kloster entstand (Adam und Lengvari 1950). Die in der vorliegenden Ausarbeitung beschriebenen Versuche beziehen sich auf diese Rasse.

Honigbienen sind eusoziale Insekten. Nach Michener (1969) wird Eusozialität folgendermaßen definiert: (1) Brutpflege erfolgt gemeinschaftlich durch mehrere Tiere, (2) kooperative Nahrungsbeschaffung und -verteilung, (3) die Individuen einer Gemeinschaft lassen sich aufgrund ihrer Morphologie oder Aufgabenverteilung in verschiedene Gruppen (Kasten) einteilen. Bei Honigbienen unterscheidet man die begattete Königin, sterile Arbeiterinnen und die männlichen Drohnen. Die Arbeiterinnen lassen sich weiterhin anhand ihres Alters unterteilen (altersbedingter Polyethismus). Erfüllt eine Gruppe von Tieren diese Voraussetzungen, spricht man von einem Staat oder einer Kolonie. Alle Individuen in einer solchen Kolonie sind miteinander verwandt.

Wenn nicht anders angegeben, stammen die Erläuterungen zur Entwicklung der verschiedenen Kasten von Jay (1963): Die Königin legt ein Ei in eine Zelle. Ist dieses befruchtet (diploid), entwickelt sich ein Weibchen, unbefruchtete Eier (haploid) werden zu Männchen (Drohnen). Nach drei Tagen schlüpft aus dem Ei eine Larve. In den ersten drei Tagen werden die Larven mit Gelée royale aus den Futtersaftdrüsen der Ammenbienen gefüttert (Snodgrass 1925). Erfolgt die Fütterung im Anschluss weiterhin nur mit Gelée royale, entwickelt sich eine Königin, Arbeiterinnen-Larven erhalten eine Mischung aus Gelée royale, Pollen und Honig,

Einleitung

Drohnen-Larven erhalten kein Gelée royale (Winston 1991). Das Larvenstadium dient vor allem der Nahrungsaufnahme. Die Larve nimmt innerhalb kürzester Zeit große Mengen Futter auf, wächst sehr schnell und durchläuft mehrere Häutungen. Nach der letzten Häutung erfolgt die Verpuppung. Im Puppenstadium bilden sich die inneren und äußeren Merkmale (Augen, Segmente, Organe etc.) zu ihrer Adultform aus. Die Entwicklungszeiten vom Ei bis zum Imago variieren und sind von der Bienenrasse und den Umweltbedingungen abhängig. Bei *Apis mellifera* betragen diese für Königinnen 16 Tage, Arbeiterinnen 21 Tage und Drohnen 24 Tage. Die folgenden Angaben zum Lebenszyklus der einzelnen Honigbienen-Kasten stammen von Seeley (2014): Wenige Tage nach ihrem Schlupf unternimmt die jungfräuliche Königin bei guter Witterung ihren Hochzeitsflug. Junge Königinnen und Drohnen verschiedener Kolonien treffen sich auf einem sogenannten Drohnensammelplatz (Kongregation). Die Anzahl an Drohnen kann bis zu 20 000 betragen. Eine Königin paart sich in der Luft mit bis zu 20 Drohnen und speichert die Spermien in ihrer Samenblase (Vesicula seminalis). Die Drohnen sterben nach der Verpaarung. Eine Königin vollführt in ihrem Leben nur einen Hochzeitsflug. Sie kehrt im Anschluss zu ihrer Kolonie zurück und gründet durch Schwarmbildung einen neuen Bienenstaat oder ersetzt eine verstorbene Königin. Eine Königin kann bis zu 2 000 Eier am Tag legen, was mehr als ihrem eigenen Körpergewicht entspricht. Die Lebensspanne beträgt mehrere Jahre.

Arbeiterinnen bilden zahlenmäßig die größte Gruppe innerhalb eines Staates; im Sommer ungefähr 50 000, im Winter etwa 10 000 Tiere. Alle Arbeiten, die in der Kolonie anfallen, führt diese Kaste aus. Die Aufgabenteilung ist altersabhängig, allerdings auch plastisch, wenn die Notwendigkeit besteht (Tabelle 1). Sommerbienen leben mehrere Wochen, Winterbienen mehrere Monate.

Drohnen dienen einzig der Befruchtung von Jungköniginnen. Im Frühling und Sommer leben mehrere hundert Drohnen in der Kolonie und werden von den Arbeiterinnen gepflegt. In der Mittagszeit fliegen die Drohnen zu den Sammelplätzen aus, um eine Königin zu begatten. Bei erfolgreicher Paarung stirbt der Drohn, ansonsten kehrt er zu seinem Volk zurück und wiederholt die Ausflüge. Im Spätsommer beginnt die sogenannte Drohnenschlacht: Alle noch in der Kolonie befindlichen Drohnen werden entweder von den Arbeiterinnen getötet oder aus dem Volk vertrieben. Dies dient der Einsparung von Vorräten. Die Lebensspanne der Männchen beträgt daher maximal eine Saison.

Einleitung

Tabelle 1: Altersbedingte Aufgabenteilung bei Arbeiterinnen von *Apis mellifera*

Alter in Tagen	Aufgaben
1-2	Hygienearbeiten und Brut wärmen
3-5	Füttern der Altlarven
6-11	Füttern der Junglarven
12-17	Wachserzeugung, Wabenbau
18-21	Wächterbienen am Flugloch
Ab 21	Sammeln (Nektar, Wasser, Harze, Pollen)

1.2 Bedeutung der Honigbiene

Die Honigbiene ist ein bedeutender Ökosystem-Dienstleister. Eine besondere Stellung nimmt hierbei die Westliche Honigbiene *Apis mellifera* ein, da diese aufgrund ihrer imkerlichen Eigenschaften weltweit verbreitet ist (Requier et al. 2019). Insgesamt wird der weltweite wirtschaftliche Wert von bestäubenden Insekten auf 153 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt (Gallai et al. 2009). Der Nutzen liegt dabei vor allem in der Bestäuberleistung der 100 wichtigsten landwirtschaftlichen Nutzpflanzen. Über 75% der globalen Nutzpflanzen sind auf die Bestäubung angewiesen, wovon Bienen einen Anteil von etwa 70% durchführen (Machado 2004). Daher gilt die Honigbiene als eines der wichtigsten Nutztiere des Menschen (Klein et al. 2006, Hanley et al. 2015).

1.3 Bienensterben (Colony Collapse Disorder, CCD)

Mitte bis Ende der 2000er Jahre kam es in den Vereinigten Staaten zu erheblichen Völkerverlusten (VanEngelsdorp et al. 2007, VanEngelsdorp et al. 2008), die nach Cox-Foster et al. (2007) mehrere Gemeinsamkeiten aufwiesen: (1) Hoher Verlust an Arbeiterinnen bei Vorhandensein großer Brutareale, (2) das Fehlen toter Bienen im und um den betroffenen Bienenstock, (3) ein erst nachträglicher Befall mit Bienenschädlingen wie Wachsmotte oder Kleiner Beutenkäfer und Ausräubern durch benachbarte Bienenvölker. Diese Symptomatik wurde später unter dem Begriff Colony Collapse Disorder (CCD) zusammengefasst (Ellis et al. 2010). Völkerverluste mit diesen Charakteristika wurden bisher nur aus den Vereinigten Staaten berichtet (Williams et al. 2010). Mögliche Auslöser zu benennen erweist sich als schwierig und sind weiterhin Gegenstand der Forschung. Es ist evident, dass nicht nur eine Ursache für dieses Phänomen verantwortlich sein kann. Ellis et al. (2010) nennen mehrere Faktoren, deren Relevanz wissenschaftlich diskutiert werden: (1) Bienenpathogene (Nosema-Infektionen, Varroose, Viruserkrankungen), (2) die imkerliche Betriebsweise, (3) verarmte

genetische Diversität, (4) Einsatz von Chemikalien im Bienenvolk und (5) in der Umwelt, (6) eingeschränkte Futterressourcen und (7) synergistische Effekte zwischen zwei oder mehr der genannten Faktoren.

Insgesamt nahm in den letzten fünf Dekaden die Anzahl an Bienenvölkern weltweit um ca. 50% zu (Aizen und Harder 2009). Allerdings verzerrt diese Darstellung die Entwicklungen in einzelnen Staaten oder Erdteilen. Europa und die Vereinigten Staaten verzeichnen in diesem Zeitraum einen Rückgang an Bienenvölkern um 26% bzw. 50%. Die dennoch positive Tendenz basiert auf den Zuwächsen in Asien (426%) und Afrika (130%). Diese Diskrepanzen lassen sich nicht nur inter-, sondern auch intrakontinental beobachten (VanEngelsdorp und Meixner 2010). Zudem ist die Menge an Nutzpflanzen, die auf Bestäubung angewiesen sind, im gleichen Zeitraum um 300% gestiegen. Dies führt zu einer wachsenden Unsicherheit der zukünftigen Nahrungsmittelproduktion und dramatisiert den Rückgang an Bestäubern zusätzlich (Aizen und Harder 2009).

1.4 Pflanzenschutzmittel

Die Weltbevölkerung umfasst derzeit knapp acht Milliarden Menschen und soll bis zum Jahr 2050 auf knapp zehn Milliarden ansteigen (Gerland et al. 2014). Um diese zusätzlichen Menschen zu ernähren und anzukleiden, muss die Produktion an Nahrung und pflanzlichen Fasern erhöht werden; es wird vermutet, dass sich bis zum Jahr 2050 der Nahrungsmittelbedarf verdoppeln wird (Bodirsky et al. 2015). Aufgrund fehlender Landareale ist die Schaffung zusätzlicher Agrarflächen in einem Großteil der Welt nicht möglich. Es ist daher notwendig, den Ertrag pro Fläche zu steigern (Popp et al. 2013). In Europa ist die agrarwirtschaftliche Fläche bei einer gleichzeitigen Ertragssteigerung seit den 1960er Jahren sogar um 13% zurückgegangen (Rounsevell et al. 2003). Shiferaw et al. (2013) benennen zudem zukünftige Herausforderungen, der sich die Landwirtschaft stellen muss: (1) Häufigere Klimaextreme, (2) vermehrte Pestizidresistenzen, (3) reduzierter Verbrauch von Wasser und Dünger, (4) erhöhte Pflanzenintoleranz gegenüber Krankheiten und Pathogenen und (5) Reduzierung der Treibhausemission. Die Bewältigung dieser Probleme wird als nachhaltige Intensivierung bezeichnet (*sustainable intensification*). Verschiedene Modelle zur Bewältigung der Nahrungsmittelknappheit thematisieren die Verringerung von Ertragslücken (Mueller et al. 2012), den bewussteren Umgang mit Nahrungsmitteln (Kummu et al. 2012), veränderte Ernährungsweisen (Davis et al. 2014) oder den effizienteren Verbrauch von Dünger (Mueller et al. 2014).

Einleitung

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Ertragssteigerung ist der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln (Pestizide). Pflanzenschutzmittel dienen dazu, die Vermehrung von Schädlingen zu kontrollieren, die Pflanzen schädigen können. In den U.S.A. sind etwa 1 200 aktive Substanzen registriert, die in über 20 000 Produkten Anwendung finden (Simon 2014). Der National Research Council (2000) berichtet, dass ohne die Anwendung von Pestiziden die Ertragsrate in den U.S.A. je nach Pflanzenart auf die Hälfte sinken würde. Zudem würden sich die Exporte landwirtschaftlicher Erträge verringern und die Preise für entsprechende Produkte erhöhen. Ähnliche Annahmen wurden auch für Großbritannien getroffen (Richard 2010). Nach Whitacre und Ware (2004) beläuft sich der jährliche weltweite Ertragsverlust durch Schädlinge während des Wachstums, der Ernte und der Lagerung auf ein Drittel, in Entwicklungsländern sogar noch höher. Dies entspricht einem finanziellen Schaden von ungefähr zwei Billionen Dollar (Pimentel 2009). Der Einsatz von Pestiziden hat allerdings auch negative Auswirkungen. Zum einen gibt es sowohl direkte Nachteile für den Anwender bei (unsachgemäßer) Ausbringung der Chemikalien als auch die Resistenzbildung bei Schädlingen (Pimentel und Greiner 1997, Wilson und Tisdell 2001). So haben sich die Fraßschäden an Kulturpflanzen in den letzten 60 Jahren verdoppelt, obwohl sich die Menge an ausgebrachten Pestiziden mehr als verzehnfacht hat (Oerke 2006, Pimentel und Burgess 2014). Zum anderen entstehen weitere negative Aspekte, die vor allem bei falscher Anwendung auftreten. Dies betrifft die Kontamination von Ökosystemen und der Umwelt (Leach und Mumford 2008) sowie die Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit (Tegtmeier und Duffy 2004). Der Einsatz von Pestiziden hat demnach sowohl Nutzen als auch damit verbundene Kosten für Mensch, Tier und Umwelt. Um die Landwirtschaft in Zukunft ertragreicher und effizienter im Angesicht steigender Preise und Lebensstandards zu gestalten, ist eine Kombination aller zur Verfügung stehenden Technologien und Methoden notwendig. Eine Erhöhung der Erträge pro Fläche kann dadurch erreicht werden, dass die bisherigen Techniken zur Reduzierung von biotischem und abiotischem Stress effizienter genutzt werden. Dieses Ziel zu erreichen und den Druck durch Schädlinge, Pathogene und Unkräuter zu vermindern, ist eine der zukünftigen Herausforderungen der Landwirtschaft (Oerke und Dehne 2004). In diesem Zusammenhang spielen unter den Pestiziden vor allem die Insektizide eine wichtige Rolle.

1.5 Insektizide

Insektizide dienen der Kontrolle von Insekten, die Kulturpflanzen schädigen können. Bereits die Römer und Griechen haben Arsen, Schwefel oder Pflanzenbestandteile genutzt, um Schadinsekten zu bekämpfen (Kirsch-Volders 2012). Insektizide sind neben den Herbiziden die

am meisten verkauften Pflanzenschutzmittel (Grube et al. 2011). Das erste synthetische organische Insektizid wurde im Jahr 1892 entwickelt (Dittmeyer et al. 2004). Seit Ende der 1980er Jahre sind die Neonicotinoide auf dem Markt und zählen heute zu den meistverkauften Insektengiften (Goulson 2013).

Insektizide werden in zwei Gruppen eingeteilt: (1) Systemische Gifte, die meist als Beizung für das Saatgut verwendet werden. Dadurch verteilt sich die Substanz während des Wachstums in der gesamten Pflanze. Fraß- oder saugende Insekten nehmen das Gift schließlich über die Nahrung auf. (2) Kontaktgifte werden gezielt vom Anwender ausgebracht und von Insekten über die Cuticula aufgenommen, um im Organismus zu wirken (Sánchez-Bayo et al. 2013). Die modernen Insektizide wirken systemisch, da bei Kontaktgiften die Ausbringung exakt abgestimmt sein muss und der Erfolg stark witterungsabhängig ist (Hedlin 1966). Weiterhin existieren verschiedene Wirkmechanismen, durch die das Insekt abgetötet werden soll. Im Folgenden werden verschiedene Modi vorgestellt, die die Wirkungsweisen der Substanzen in dieser Arbeit darstellen.

1.5.1 Modulation des cholinergen Nervensystems

Der verbreitetste Wirkmechanismus basiert auf der Interaktion mit der cholinergen Signalübertragung (Abbildung 1). Wenn nicht anderweitig kenntlich gemacht, stammen die folgenden Erläuterungen von Sadava et al. (2019a): Die Reizweiterleitung in Form eines Aktionspotenzials von einer Nervenzelle (Präsynapse) auf eine andere Zelle (Postsynapse) erfolgt an den Synapsen. Da die meisten Zellen nicht direkt miteinander verbunden sind, muss ein synaptischer Spalt überwunden werden. Das elektrische Signal der Nervenzelle wird hierfür in ein chemisches Signal umgewandelt. Die entsprechenden Botenstoffe heißen Neurotransmitter; einer der wichtigsten ist das Acetylcholin. Acetylcholin ist ein evolutionär hoch konserviertes Signalmolekül. Es ist vor allem Bestandteil des Nervensystems bei Tieren, obgleich dieses nicht obligat ist, da es ebenfalls in Bakterien, Archaeen, Pilzen und Pflanzen exprimiert wird (Sastry und Sadavongvivad 1978). In der Präsynapse wird das Acetylcholin aus Acetyl-Coenzym A und Cholin synthetisiert. Anschließend findet die Speicherung in Vesikeln statt (1). Trifft nun ein Aktionspotenzial an der Präsynapse ein, werden membrangebundene Natriumkanäle geöffnet, wodurch Natriumionen in die Präsynapse einströmen und zur Depolarisation führen. Dadurch werden Calciumkanäle aktiviert und es folgt ein Influx von Calciumionen. Dies löst die Fusion der Zellmembran mit den Vesikeln aus (2). Die Vesikel entlassen das Acetylcholin in den synaptischen Spalt (Exocytose), das an der Postsynapse an nikotinische Acetylcholinrezeptoren bindet (3). Dies führt wiederum zu einem Einstrom von

Einleitung

Natriumionen durch entsprechende Kanäle an der Postsynapse. Überschreitet die aufgenommene Ladung einen Schwellenwert, wird ein Signal übertragen und das Aktionspotenzial ausgelöst. Das Enzym Acetylcholinesterase spaltet und inaktiviert im synaptischen Spalt das Acetylcholin, wodurch sich die Kationenkanäle wieder schließen (4). Das dabei entstandene Acetat wird in den Stoffwechsel integriert, Cholin gelangt zurück in die Präsynapse (5).

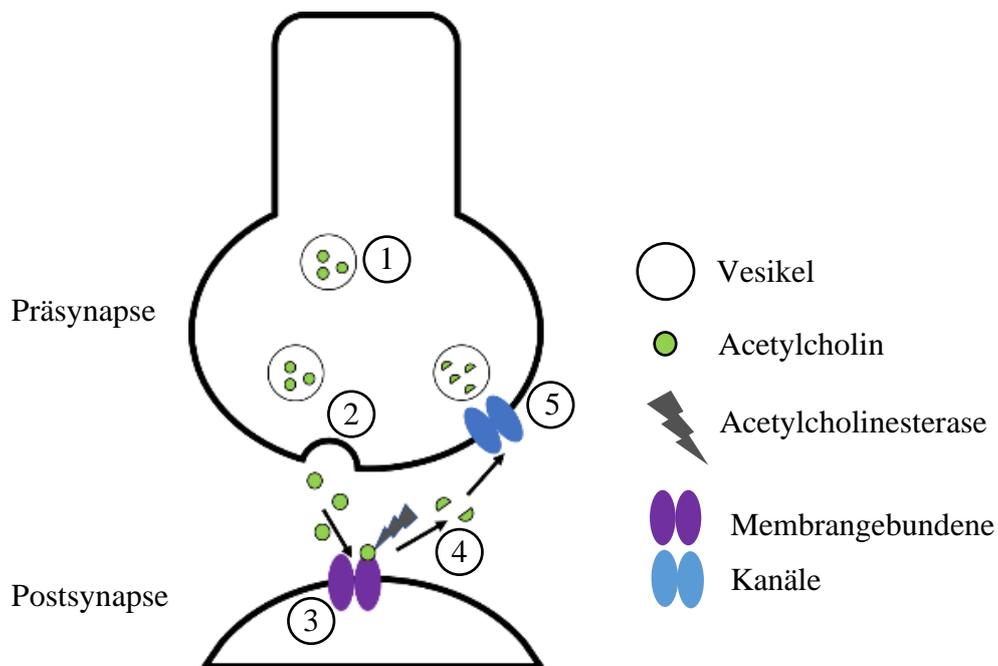


Abbildung 1: Die motorische Endplatte. Die synaptische Übertragung an der motorischen Endplatte mittels des Neurotransmitters Acetylcholin. Nummerierte Erläuterungen im Text (geändert nach Sadava et al. 2019a).

Da dieser Prozess vor allem bei der Signalweiterleitung auf Muskelzellen relevant ist, kann eine gezielte Manipulation zur Paralyse oder zum Tod führen. So binden unterschiedliche Gifte aus der Natur an die Acetylcholinrezeptoren, wodurch es zu einer andauernden Erregung der Muskelzellen kommt (cholinerge Krise). Beispiele hierfür sind Nikotin im Tabak, Epibatidin in Pfeilgiftfröschen, Curare aus Brechnuss-Arten oder die Conotoxine der Kegelschnecken. Ein weiterer Mechanismus beruht auf der Hemmung des Enzyms Acetylcholinesterase, was zur gleichen Symptomatik beiträgt. In der Natur findet man Gifte mit dieser Wirkung in Meeresschnecken (*Onchidella* spp.) oder Schneeglöckchen (*Galanthus* spp.). Die Gifte dienen dazu, Fressfeinde abzuschrecken (Abramson et al. 1989).

Die Interaktion mit dem cholinergen System umfasst das breiteste Spektrum an Insektizidklassen, wie zum Beispiel Carbamate, Organophosphate (Dimethoat), Butenolide (Flupyradifuron) oder Neonicotinoide.

1.5.2 Juvenilhormon-Analoga

Insektizide, die die Wirkung bestimmter Hormone im Larvalstadium nachahmen, nennt man Entwicklungs- oder Wachstumshemmer, hierzu gehören auch Juvenilhormon-Analoga. In Tannen (*Abies* spp.) oder Akazien (Acacieae) findet man pflanzliche Abwehrstoffe, die das Juvenilhormon imitieren (Juvenilhormon-Analoga) und damit die Entstehung der Adultform verhindern (Bohlmann et al. 1998).

Die Entwicklung bei Insekten wird in ametabol, hemimetabol und holometabol unterschieden. Die Unterschiede beziehen sich dabei auf die Metamorphose, die Umwandlung der Larvenform zum Adultstadium (Imago). Heming (2018) nennt folgende Charakteristika: Ametabole Insekten zeichnen sich durch das Fehlen einer Metamorphose aus. Zudem besitzen sie keine Flügel. Jungtiere unterscheiden sich nur in der Körpergröße und Geschlechtsreife von Adulttieren. Zu dieser Gruppe zählen Fischchen (*Zygentoma*) und Felsenspringer (*Archaeognatha*). Bei einer hemimetabolen Entwicklung ähneln die Jungtiere ebenfalls den Imagines, deren Entwicklung über mehrere Häutungen abläuft. Im Unterschied zu den Ametabola bilden sich während der Entwicklung bereits Flügelanlagen. Typische Vertreter sind die Eintagsfliegen (Ephemeroptera), Schaben (Blattodea) und Heuschrecken (Orthoptera). Die Gruppe der Holometabola zeichnet sich außerdem durch das Vorhandensein eines Puppenstadiums aus. Die drei Stadien Larve, Puppe und Imago weisen keine Ähnlichkeiten auf und besitzen häufig verschiedene Lebensweisen. Während des meist immobilen Puppenstadiums erfolgt keine Nahrungsaufnahme. Etwa drei Viertel aller bekannten Insekten zeigen diese vollständige Entwicklung, hierzu gehören unter anderem Hautflügler (Hymenoptera), Käfer (Coleoptera) oder Schmetterlinge (Lepidoptera).

Die Entwicklung wird dabei über verschiedene Hormone kontrolliert (Abbildung 2). Das Häutungshormon Ecdyson wird in der Prothoraxdrüse freigesetzt. Die Ecdyson-Produktion erfolgt zyklisch in gleichbleibender Konzentration. Wenn eine maximale Konzentration erreicht ist, setzt die Häutung ein (Ou et al. 2016). Gleichzeitig sezernieren die Corpora allata Juvenilhormon. Die Menge an Hormon nimmt mit zunehmendem Alter der Larve ab. Sinkt die Konzentration an Juvenilhormon unter einen bestimmten Schwellenwert, erfolgt die Verpuppung und letztendlich die Ausbildung zum Imago (Riddiford 1994).

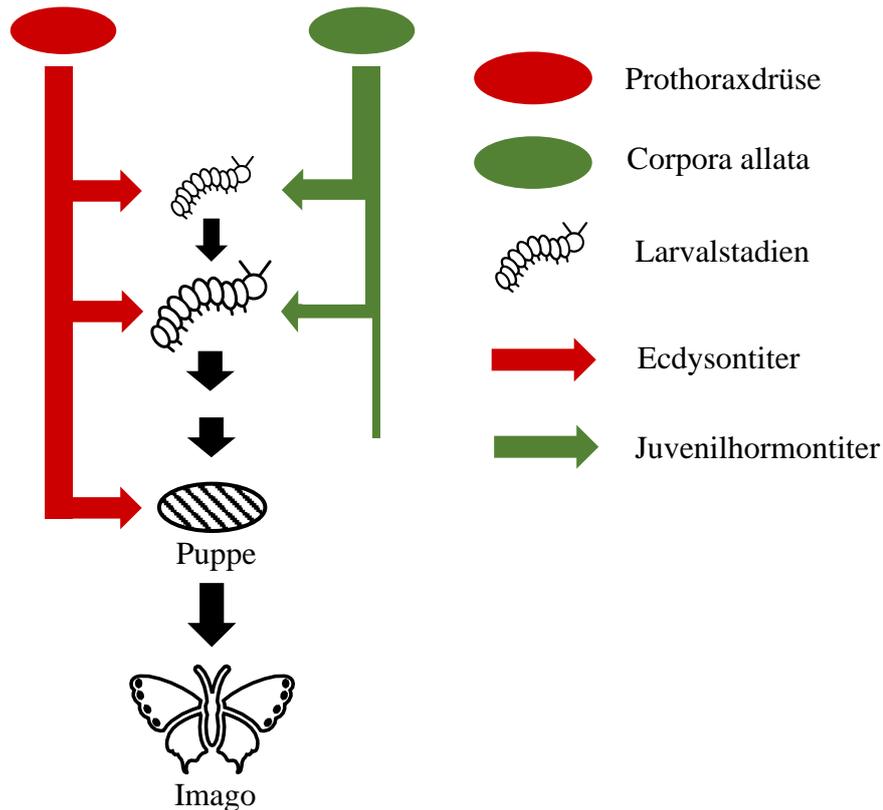


Abbildung 2: Hormonelle Kontrolle der Metamorphose. Die Entwicklung wird vor allem durch die Titer an Ecdyson und Juvenilhormon reguliert (geändert nach Sadava et al. 2019b).

1.5.3 Modulation von Calciumkanälen

Ein weiterer Angriffspunkt für Insektizide sind spezifische Calcium-Kanäle in der Muskulatur, die Ryanodin-Rezeptoren. Die Muskelkontraktion wird mit Hilfe der Querbrückentheorie beschrieben (Squire 2016): Jeder Muskel besteht aus Muskelfasern, die wiederum zahlreiche Myofibrillen enthalten. Jede Myofibrille setzt sich aus wiederholenden kontraktilen Elementen zusammen, den Sarkomeren. In diesen Elementen gleiten Myosin- und Aktinfilamente mittels eines molekularen Kraftschlages aneinander vorbei, wodurch die Kontraktion ausgelöst wird. Für diese Bewegung ist unter anderem Calcium notwendig, das im sarkoplasmatischen Retikulum der Muskelfasern gespeichert wird. Trifft nun ein Aktionspotential auf die Muskelzelle, führt die ausgelöste Depolarisation zur Öffnung der Ryanodin-Rezeptoren im sarkoplasmatischen Retikulum, Calciumionen strömen aus und gelangen zu den Sarkomeren (Abbildung 3). Nach Beendigung des Aktionspotentials schließt sich der Ryanodin-Rezeptor. Gleichzeitig gelangen Calciumionen durch Calciumpumpen aus dem Cytoplasma zurück ins sarkoplasmatische Retikulum. Sinkt die Calcium-Konzentration

unter einen Schwellenwert, gelangt das Sarkomer in seinen Ursprungszustand zurück und der Muskel entspannt sich.

Das Alkaloid Ryanodin, das aus der Pflanze *Ryania speciosa* isoliert wurde, bindet spezifisch an diese Rezeptoren und führt zu einem andauernden Ausstrom von Calciumionen, anhaltender Muskelkontraktion, Paralyse und schließlich zum Tod (Zucchi und Ronca-Testoni 1997).

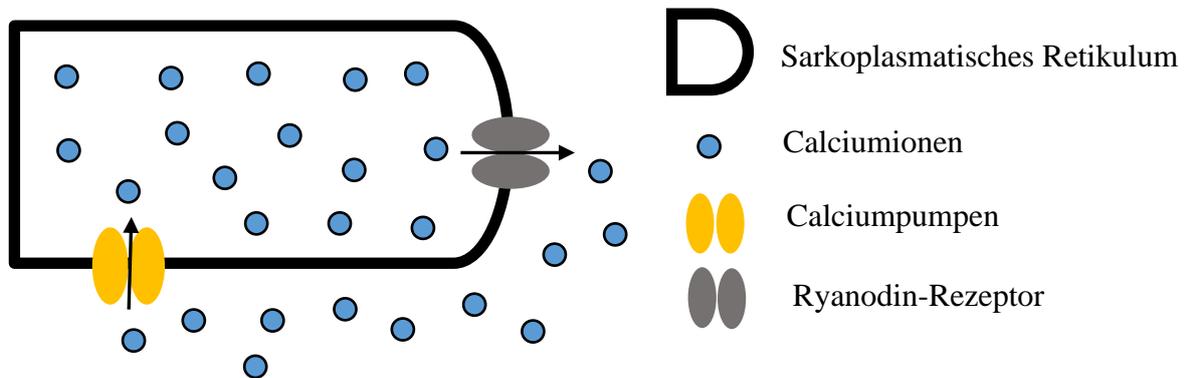


Abbildung 3: Steuerung des Muskelapparates. Regulierung des Calciumausstroms aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den Ryanodin-Rezeptor (geändert nach Sadava et al. 2019c).

1.6 Physiologische Signalwege

Mehrere in dieser Arbeit vorgestellte Gene sind Bestandteil physiologischer Signalwege. Im Folgenden werden jene Signalkaskaden vorgestellt, die für die Analyse der Daten am wichtigsten sind.

1.6.1 Toll-Signalweg

Die Gene *apisimin*, *defensin1* und *toll* sind Teil des Toll-Signalweges (Abbildung 4), der als eine der Hauptkomponenten der Immunantwort bei Insekten gilt (De Gregorio et al. 2002). Phagozyten besitzen Toll-ähnliche-Rezeptoren, die die Oberfläche verschiedener Pathogene identifizieren können. Nach Erkennen der Oberflächenstruktur wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst: Durch die Anlagerung von verschiedenen Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des membrangebundenen Toll-Rezeptors, wodurch dieser aktiviert wird. Dies führt im weiteren Verlauf zur Phosphorylierung des Inhibitors Cactus und zu dessen Degradation. Dadurch kann der Transkriptionsfaktor Dorsal in den Zellkern wandern, sich an die DNA anlagern und die Synthese von antimikrobiellen Peptiden, z. B. Apisimin und Defensin1, initiieren. Diese werden an die Hämolymphe abgegeben und bekämpfen Pathogene (Evans et al. 2006a).

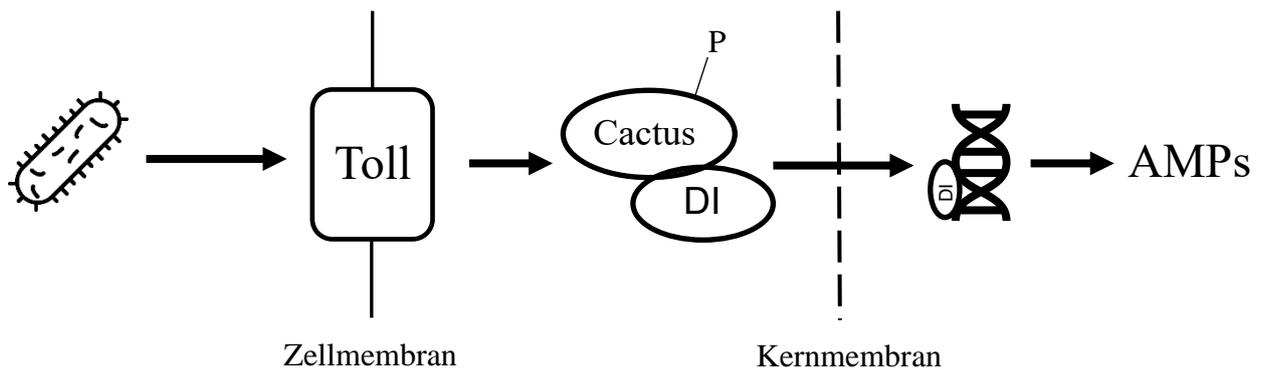


Abbildung 4: Darstellung des Toll-Signalweges. Erläuterungen im Text. Abkürzungen: DI = Dorsal, AMPs = antimikrobielle Peptide, P = Phosphatrest (geändert nach Evans et al. 2006a).

1.6.2 Ecdyson-induzierte Kaskade

Die Gene *hr38*, *hr4* und *e75* gehören zu den sogenannten ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren, die durch die Freisetzung von Ecdyson aktiviert werden (Thummel 2002). Die in der Prothoraxdrüse gebildeten Ecdysteroide binden an einen Heterodimer aus USP und HR38. Dieser Hormon-Rezeptor-Komplex führt zur erhöhten Produktion weiterer Faktoren, u.a. E75 und HR4, die essenzielle Funktionen in der Oogenese, Embryogenese oder Metamorphose einnehmen (King-Jones und Thummel 2005). Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass das Juvenilhormon über einen weiteren Komplex die durch Ecdyson induzierte Expression dieser Faktoren reprimiert (Bonneton und Laudet 2012, Abbildung 5).

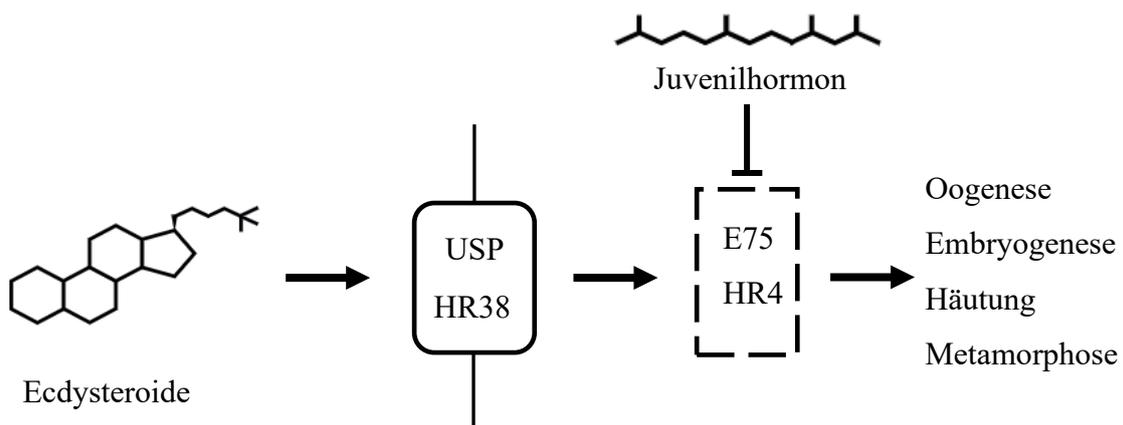


Abbildung 5: Ecdyson-induzierte Signalkaskade. Erläuterungen im Text (geändert nach Bonneton und Laudet 2012).

1.6.3 Autophagie-Signalweg

Die Gene *atg6* und *gabarp* sind Bestandteil der Autophagie-vermittelnden Signaltransduktion in der Zelle. Man unterscheidet drei Typen von Autophagie: Makro-, Mikro und Chaperon-vermittelte-Autophagie (Klionsky 2005, Cuervo 2008). In diesem Kontext wird der Signalweg der Makroautophagie beschrieben (Abbildung 6). Unter normalen Bedingungen phosphoryliert mTOR den ULK-Komplex und inhibiert auf diesem Weg die Aktivierung von Autophagie. Durch ein Initiator-Signal, wie z.B. Nährstoffmangel, wird mTOR durch AMPK inaktiviert, wodurch ULK die Bildung der Autophagosom-Membran einleitet (1). Der PI3K-Komplex, der u.a. das Protein ATG6 enthält, kontrolliert diesen Membranbildungs-Prozess und schafft die Voraussetzungen für die Membran-Elongation (2). In einem weiteren Schritt werden Lipide (L) an Proteine wie GABARAP konjugiert, um die Membran zu erweitern und die Ausbildung des Autophagosoms abzuschließen (3). Abschließend fusioniert das Autophagosom mit einem Lysosom (4) und die Bestandteile im Innern werden unter Freisetzung der Nährstoffe hydrolytisch gespalten (Abbildung 6, Kocaturk und Gozuacik 2018).

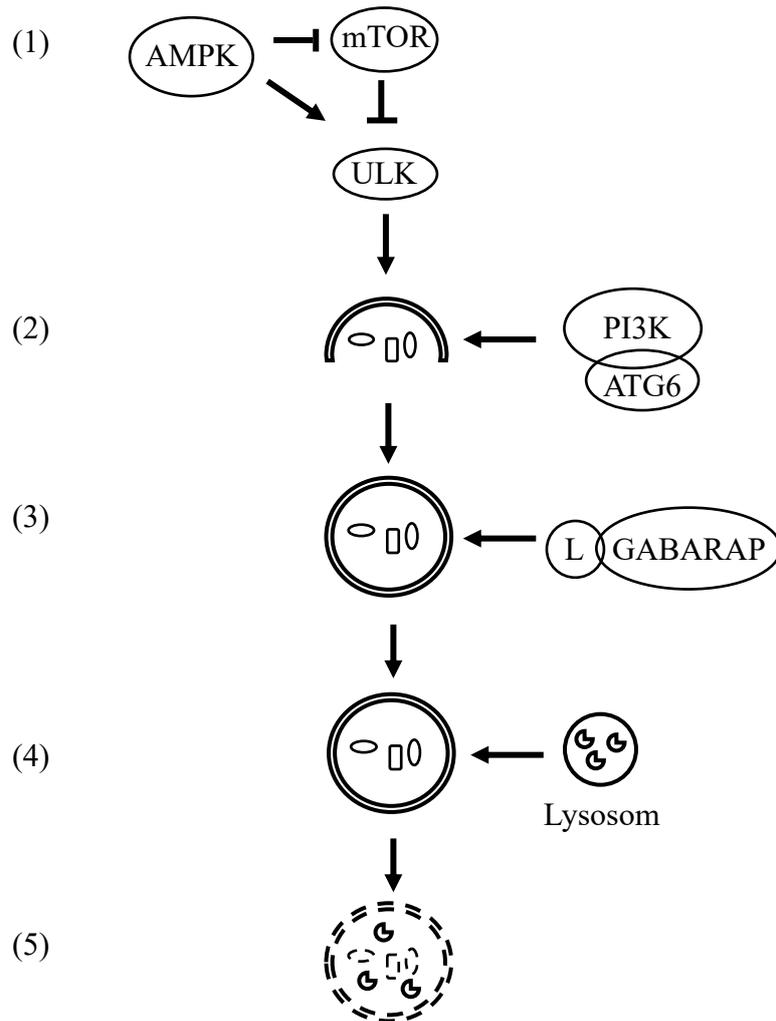


Abbildung 6: Signalweg der Autophagie. Erläuterungen siehe Text. (1) Initiator-Signal, (2) Membranbildung, (3) Autophagosom-Reifung, (4) Autophagosom-Lysosom-Komplex, (5) hydrolytische Spaltung (geändert nach Kocaturk und Gozuacik 2018).

1.7 Problemstellung

Die Verringerung der Anzahl an gehaltenen Bienenvölkern, Honigbienen und Nutzinsekten in Europa und den Vereinigten Staaten wird seit 2006 vermehrt auf den Einsatz von Insektiziden zurückgeführt (Johnson et al. 2010, Calatayud-Vernich et al. 2019). Die bekanntesten Vertreter und größte wirtschaftliche Bedeutung als Beizmittel haben die Neonicotinoide (Sur und Stork 2003). Neonicotinoide sind synthetische Derivate des Nikotins, deren Wirkung auf der Interaktion mit den Acetylcholinrezeptoren beruht (Jeschke und Nauen 2008). Im Jahr 2008 wurde die Ausbringung verschiedener Neonicotinoide in Deutschland untersagt, nachdem bei einer ungewollten Freisetzung von Clothianidin-Staub im Süden Baden-Württembergs mehr als 10 000 Kolonien gestorben sind (Pistorius et al. 2008). Im Zuge einer Evaluation der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) kam es zu einem Verbot von Neonicotinoiden in der EU (EFSA 2013). Diese Entscheidung wurde in nachfolgenden Beurteilungen bestätigt (EFSA 2018). Aufgrund vermehrter Berichte über entstandene Neonicotinoid-Resistenzen (Bass et al. 2015, Huseth et al. 2018) und schädigende Auswirkungen auf Nichtzielorganismen (Raby et al. 2018, Carnesecchi et al. 2019) wurden alternative Insektizide gesucht. Eine dieser Alternativen ist Flupyradifuron, das ähnlich wirkt wie die Neonicotinoide, allerdings als weniger toxisch für Bienen gilt (Nauen et al. 2015). Eine weitere neuere Gruppe von Insektiziden bilden die Ryanodine. Chlorantraniliprol gehört in diese Gruppe. Insektizide dieser Wirkstoffklasse binden an die Ryanodin-Rezeptoren, führen zu einem unkontrollierten Calcium-Ausstrom und beeinträchtigen die Muskelkoordination (Qi und Casida 2013). Weitere Insektizidklassen bilden die Juvenilhormon-Analoga und Organophosphate. Fenoxycarb gehört zu den Entwicklungshemmern und stört das endokrine System der larvalen Entwicklung (Simon 2014). Dimethoat ist ein Vertreter der Organophosphate und inhibiert die Acetylcholinesterase des Zielorganismus (Larc 1983). Aufgrund ihrer Schadwirkung auf Insekten ist die Anwendung von Insektiziden ein zweischneidiges Schwert: Das Primärziel ist die Kontrolle von Schädlingen, um die Ackerkulturen zu schützen. Allerdings muss auch garantiert werden, dass keine Nutzinsekten oder Nichtzielorganismen geschädigt werden. Insbesondere die Auswirkungen auf Honigbienen werden intensiv untersucht, da diese ökonomisch und ökologisch wichtig sind (Klein et al. 2006, Ollerton et al. 2011). Der Fokus liegt dabei häufig auf Auswirkungen auf das optische, olfaktorische oder gustatorische System von Arbeiterinnen. Zudem werden das Lernverhalten, Erinnerungsvermögen und die Mortalität untersucht (Hopwood et al. 2016, Cloyd 2019). Allerdings hängt die Gesundheit eines Bienenvolkes nicht nur von den Arbeiterinnen ab, die direkt mit Umweltgiften in Kontakt kommen können, sondern auch von

Einleitung

der Bienenbrut. Während der Larvalphase haben verschiedene Stockparameter Einfluss auf die Entwicklung, das Verhalten und Überleben der schlüpfenden Adulttiere (Brodsgaard et al. 2003, Tautz et al. 2003, Medrzycki et al. 2010). Zusätzlich besteht die Nahrung der Larven aus Pollen und Nektar und exponiert auf diese Weise die Brut mit Fremdstoffen (Haydak 1970, Huang 2010). Mit Pestiziden kontaminierter Pollen und Nektar kann die Brut und letztlich auch das gesamte Volk schädigen (Yang et al. 2012, Wu-Smart und Spivak 2016). In früheren Studien zum Einfluss von Pestizidkontaminationen auf Larven folgte man den Protokollen von Oomen et al. (1992) und Schur et al. (2003). In beiden Methoden werden die untersuchten Pestizide bei frei fliegenden Bienenvölkern verwendet. Aufgrund dieser Freiland-Applikation ist die Reproduzierbarkeit nur bedingt möglich, da äußere Umwelteinflüsse und die Bienenvölker an sich keinen Standardbedingungen unterliegen (Aupinel et al. 2005). Wegen dieser Einschränkungen bedarf es laut den Richtlinien der Europäischen Union einer standardisierten Methode für die adäquate Risikobewertung von Pestiziden (European Commission 1996).

Aupinel et al. (2005) entwickelten einen *in vitro*-Fütterungstest für Larven, der von der OECD seit 2016 für die Evaluierung von Toxizitäts-Untersuchungen vorgeschrieben ist. Dieses Protokoll untersucht die Mortalität, Futteraufnahme und phänotypische Auffälligkeiten während der Entwicklung. Gleichwohl sind die Auswirkungen von subletalen Konzentrationen bei reiner Betrachtung der Mortalität oder Morphologie nicht offensichtlich. Unter subletal versteht man indirekte Effekte, die nicht den sofortigen Tod eines Individuums herbeiführen. Dennoch sollten diese Auswirkungen nicht vernachlässigt und als weitere Bewertungsebene in Betracht gezogen werden (Thompson und Maus 2007). Unter natürlichen Bedingungen sind Honigbienen sogar eher subletalen Konzentrationen ausgesetzt, da die Wirkstoffe in der Regel im pflanzlichen Gewebe verdünnt oder in Bienenprodukten enthalten sind (Rortais et al. 2005, Krupke et al. 2012). Insbesondere seit dem Auftreten des Colony Collapse Disorder führen Forscher vermehrt Untersuchungen mit Konzentrationen durch, die deutlich unter dem offiziellen Schadniveau liegen (Doublet et al. 2015, Tosi und Nieh 2019). Da subletale Effekte in der Regel nicht sichtbar sind, sind zusätzliche mikrobiologische und biochemische Methoden notwendig, um deren Wirkung aufzuzeigen. In diesem Kontext haben sich sowohl Untersuchungen der Genexpression und Proteinproduktion als auch von histologischen Proben etabliert (Trapp et al. 2017, Hesselbach et al. 2019b, Chen et al. 2020, Zaluski et al. 2020). Durch die Entschlüsselung des Genoms von *Apis mellifera* (Consortium 2006) konnte man Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu bereits sequenzierten Genomen von anderen Insekten aufzeigen, die auf der Ökologie und den sozialen Strukturen der Honigbiene gründen. Das

genaue Wissen über die genetische Grundlage eines Organismus ist essenziell für das Verständnis der Biologie. Allerdings kann dieser Kenntnisstand nicht die gesamte Komplexität eines Lebewesens widerspiegeln. Es ist ebenfalls notwendig, die Dynamik in der Genexpression über vergleichende Studien des Transkriptoms, Proteoms und des daraus resultierenden Verhaltens darzustellen (Zayed und Robinson 2012, Trapp et al. 2017).

1.8 Genexpression und Proteinbiosynthese

1.8.1 Transkriptom

Das gesamte genetische Material eines Organismus befindet sich in der DNA (Desoxyribonukleinsäure). Die Information in der DNA ist in Form von Genen gespeichert. Die Gesamtheit an Genen bezeichnet man als Genom (Erbgut). Jede Zelle in einem Organismus exprimiert allerdings nicht alle Gene der DNA, sondern nur jene, die zur Erfüllung der spezifischen Aufgaben notwendig sind. Einflussgrößen für die spezifische Expression einzelner Gene sind zum einen die verschiedenen Gewebearten in einem Lebewesen und zum anderen interne sowie externe Stressfaktoren, wie z.B. Pathogene oder Chemikalien (Velculescu et al. 1997). Daraus ergibt sich die Folgerung, dass mit Ausnahme der Geschlechtszellen alle Körperzellen die gleiche DNA beinhalten, die sich allerdings in der Expressierung der Gene unterscheiden. Damit ein Gen exprimiert werden kann, wird die Information zunächst in RNA (Ribonukleinsäure) umgeschrieben (Transkription), die zur Synthese von Proteinen notwendig ist (Translation). Die Gesamtheit an RNA wird als Transkriptom bezeichnet. Durch die Isolierung der RNA aus einer Zelle oder eines Individuums ist es demnach möglich, einen Eindruck zu erhalten, welche Gene aktiviert oder deaktiviert sind. Durch den Vergleich mit anderen Expressionsdaten lassen sich ebenfalls Aussagen über Expressionsunterschiede treffen (Gibson und Muse 2002).

1.8.2 RT-qPCR

Es gibt verschiedene Verfahren, um das Transkriptom bzw. die Genexpression zu untersuchen. Eine Methode stellt die RT-qPCR dar. Diese Methode kombiniert die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR). In einem ersten Schritt wird RNA aus dem Probenmaterial isoliert, aufgereinigt und schließlich mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben (Bustin 2000). In einem weiteren Schritt vervielfältigt man schließlich die DNA mittels einer PCR und misst die Menge an synthetisierter DNA fluorimetrisch in Echtzeit (Gibson et al. 1996). Die Stärke der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge an

DNA. Um Hintergrund-Signale herauszufiltern, wird ein Schwellenwert definiert, ab dem die Menge an synthetisierter DNA exponentiell steigt (C_t -Wert = threshold cycle). Je mehr Ausgangsmaterial in einer Probe vorhanden ist, desto schneller wird dieser Schwellenwert überschritten und desto kleiner ist der entsprechende C_t -Wert (Nolan et al. 2006).

1.8.3 Proteom

So wie das Transkriptom die Gesamtheit an RNA darstellt, so spiegelt das Proteom die Gesamtheit an Proteinen zu einem bestimmten Zeitpunkt wider. Der Terminus Proteom bezog sich anfänglich nur auf jene Proteine, die im Genom codiert sind (Wilkins et al. 1996). Das Lehrbuch-Mantra "Ein Gen ein Polypeptid [Protein]" basiert auf dieser Annahme. Allerdings codieren viele Gene mehr als ein Protein. Nach der Transkription kann die gebildete RNA zusätzlich modifiziert werden, um schließlich in ein anderes Protein translatiert zu werden. Zudem werden Proteine nach der Synthese ins Endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie durch chemische Modifikationen ihre finale Struktur und damit verbundene Funktion erhalten. Das Proteom ist damit viel komplexer als der proteinogene Teil des Genoms (Sadava et al. 2019d). In den letzten Jahrzehnten hat die Untersuchung des Proteoms (Proteomik) durch sensiblere Mess- und Analyseverfahren an Bedeutung gewonnen (Tyers und Mann 2003). Aufgrund der genannten Modifikationen und Dynamik des Proteoms bis zum funktionsfähigen Protein, sind Transkriptom und Proteom nicht zwingend kohärent. Daher sollten Transkriptom- und Proteomanalysen als ein Kontinuum aufgefasst werden, um eine möglichst holistische Bewertung vorzunehmen (Vogel und Marcotte 2012).

1.8.4 2D-Gelelektrophorese

So wie es bei der Transkriptomanalyse verschiedene Untersuchungsmethoden gibt, so haben sich auch verschiedene Techniken bei der Analyse der Proteine entwickelt (Dunn 1996, Patton 2002). Eine Methode stellt dabei die 2D-Gelelektrophorese dar: Nach erfolgter Proteinisolierung und Aufreinigung werden die Proteine zunächst mittels eines Gelstreifens und einer angelegten Spannung entlang eines pH-Gradienten aufgetrennt (1. Dimension). Die sauren und basischen Aminosäuren im Protein durchlaufen während dieser Auftrennung verschiedene Phasen der Protonierung und Deprotonierung. Am sogenannten isoelektrischen Punkt (pI) heben sich positive und negative Ladungen im Protein auf, die Nettoladung beträgt null. Da das elektrische Feld nun nicht mehr auf das Protein einwirkt, akkumuliert es an dieser Stelle. Anschließend werden die Gelstreifen unter anderem mit SDS (Natriumdodecylsulfat) behandelt. Die SDS-Moleküle binden an die Proteine und überdecken mit ihrer negativen

Ladung die Eigenladung der Proteine. Im Anschluss werden die Streifen auf die Kante eines Polyacrylamidgels gelegt. Es erfolgt eine zweite Elektrophorese, bei der nun senkrecht zur ersten Dimension die Proteine nach ihrer Größe getrennt werden (2. Dimension). Große Moleküle erfahren durch das Gel einen großen Widerstand, kleine Moleküle können relativ ungehindert hindurchwandern. Durch einen mitlaufenden Farbstoff kann man ablesen, wie weit die kleinen Moleküle bereits gewandert sind und stoppt die Elektrophorese beim Erreichen des unteren Randes (Görg et al. 2000). Als Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung erhält man demnach das Gewicht und den isoelektrischen Punkt der aufgereinigten Proteine. Die nachfolgende Identifizierung erfolgt über Massenspektrometrie.

1.9 Untersuchungen zur vergleichenden Genexpression und Proteinbiosynthese bei Larven der Honigbiene

Da sich die vorliegende Arbeit mit der Genexpression und Proteinbiosynthese von Honigbienen-Larven beschäftigt, soll an dieser Stelle ein Überblick bisheriger Studien zu dieser Thematik gegeben werden. Der Fokus liegt dabei auf Untersuchungen, die sich mit den Auswirkungen von Pathogenen oder Pestiziden beschäftigen.

Derecka et al. (2013) konnten nach Exposition mit dem Neonicotinoid Imidacloprid Änderungen im Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus feststellen. Zusätzlich war die Expression mehrerer Mitglieder der Cytochrom P450-Monooxygenasen hochreguliert. Ähnliche Beobachtungen konnten Wu et al. (2017) bei Arbeiterinnen machen, die in der Larvalphase Imidacloprid ausgesetzt waren. Bei diesen zeigte sich zudem eine Reprimierung von antimikrobiellen Peptiden sowie vielen Vertretern der *major royal jelly proteins*. Ebenfalls nach Exposition eines Fungizids in der Larvalphase fanden Wang et al. (2018) bei Arbeiterinnen differenziell exprimierte Gene, die u.a. in der Detoxifikation, neuronalen Entwicklung oder dem Fettsäuremetabolismus involviert sind. Nach Infektion mit dem Kalkbruterreger *Ascospaera apis* waren Komponenten der zellulären und humoralen Immunantwort hochreguliert, z.B. Lysosomen oder Toll- und MAPK-Signalweg. Zudem waren Transkripte im hormonellen Biosyntheseweg induziert (Chen et al. 2017).

In Bezug auf Proteom-Studien haben Esther et al. (2017) gezeigt, dass diätetisches Nikotin zur Hochregulierung von Proteinen führte, die mit dem Energiemetabolismus oder der Detoxifikation assoziiert werden. Zudem waren Proteine induziert, die als Anzeiger einer erhöhten Nährstoffeinlagerung gelten. Die Autoren vermuteten daher einen positiven Einfluss auf das Larvenwachstum. Anpassungen an die Infektion mit der Milbe *Varroa destructor* sehen Parker et al. (2012) in der Hochregulierung von larvalen Proteinen, die mit der Immunantwort

und der Chitin-Biosynthese in Verbindung stehen. Die Infektion mit dem Sackbrut-Virus führte zur Reprimierung von Proteinen, die im Kohlenhydrat- und Energiemetabolismus sowie der larvalen Entwicklung entscheidend sind. Dadurch könnte es zur Beeinträchtigung der Organogenese oder Geweberegenerierung kommen (Han et al. 2013). Ebenfalls nach Infektion mit diesem Virus fanden Zhang et al. (2014) hochregulierte Proteine der Immunantwort, z.B. dem RNA-Interferenz-Signalweg. Eine Herunterregulierung war in Bezug auf den Energiehaushalt und die Ontogenese zu beobachten.

1.10 Zielsetzung

In der vorliegenden Dissertation wurden die subletalen Effekte von Dimethoat, Fenoxycarb, Chlorantraniliprol und Flupyradifuron auf das larvale Transkriptom und die Proteinbiosynthese der Honigbiene analysiert. Dazu wurden alle Versuche gemäß den Anweisungen der Richtlinie 239 von der OECD (2016) durchgeführt. Dieses Protokoll erfasst die Larvenmortalität, Futteraufnahme und phänotypische Auffälligkeiten. Neben diesen makroskopischen Beobachtungen werden allerdings keine Daten zu molekularen Änderungen untersucht. Diese sind allerdings aufgrund der Verwendung von subletalen Insektizidkonzentrationen relevant für die Risikoabschätzung. Ziel der Arbeit war es daher, einen spezifischen Gen-Array zur Beurteilung einer Testsubstanz im frühen Entwicklungsstadium zu etablieren. Ein Fokus liegt dabei auf Genen, die mit spezifischen Signalwegen der Immunantwort, larvalen Entwicklung und dem zellulären Metabolismus assoziiert sind.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Das Versuchstier *A. mellifera*

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit Larven der Westlichen Honigbiene *Apis mellifera* der Rasse buckfast durchgeführt. Alle Kolonien wurden auf dem Gelände des Instituts für Bienenschutz am Julius Kühn-Institut Braunschweig gehalten. Die Völker waren ausreichend mit Futter versorgt, zeigten keine Krankheitssymptome oder erhöhten Parasitenbefall und besaßen eine Königin (weiselrichtig). Die Königinnen der verwendeten Völker waren Geschwister. In den Kolonien wurden keine chemischen Produkte (Antibiotika, Varroazide, Agrochemikalien etc.) innerhalb der vier Monate vor Beginn der Experimente eingesetzt.

2.2 Larvaler Fütterungsversuch

In den Jahren 2018 und 2019 wurde jeweils ein larvaler Fütterungsversuch gemäß der Richtlinie 239 durchgeführt (OECD 2016). Alle Larvenversuche fanden am Julius-Kühn-Institut Braunschweig statt und wurden von Herrn Jacob Eckert und Dr. Jens Pistorius betreut. Es wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Königin eines Volkes wurde für maximal 30 Stunden auf einer Wabe gekäfigt, um eine möglichst große Anzahl an gleichaltrigen Eiern zu erhalten. Nach drei Tagen schlüpfen die jungen Larven (L1). Der Transport der Waben ins Labor erfolgte mittels eines isolierten Behälters, damit die Temperatur nicht unter 20°C sank. Die Larven aus drei Völkern wurden zunächst in spezielle Polystyren-Zylinder überführt, die auf einer 48-Well-Kulturplatte positioniert wurden. Um eine möglichst homogene Altersstruktur zu gewährleisten, waren nur Larven in der Experimentauswahl, die noch nicht "C"-förmig ausgerichtet waren und noch keine Futtergabe von den Ammenbienen erhielten. Das Umlarven erfolgte mit Hilfe eines Umlarvlöffels. Die Zylinder hatten einen Durchmesser von 9 mm und eine Tiefe von 8 mm. Die Sterilisation wurde mit Ethanol (70%) durchgeführt. Für jede Versuchsgruppe wurden 48 Larven von drei verschiedenen Völkern beprobt, was 16 Larven pro Replikat entspricht. Die Kulturplatten befanden sich während des Versuchszeitraums in einem Exsikkator (SICCO Star-Exsikkator). Um die Luftfeuchtigkeit bei 95% ± 5% zu halten, wurde eine Schale mit gesättigter Kaliumsulfat-Lösung verwendet. Für eine gleichmäßige Temperaturverteilung wurde dieser Versuchsaufbau in einem Inkubator (Memmert BE 600) bei 34-35°C und konstanter Zirkulation aufbewahrt. Die Larven wurden in Abhängigkeit von ihrem Alter mit unterschiedlichem Futter versorgt, das die aktiven Substanzen (a.s.) in subletalen Konzentrationen enthielt.

Material und Methoden

Der Futtersaft wurde gemäß den Richtlinien angefertigt (OECD 2016):

A (D1): 50% w/w Gelée royale, 50% w/w einer wässrigen Lösung mit 2% w/w Hefeextrakt, 12% w/w Glucose und 12% w/w Fructose.

B (D3): 50% w/w Gelée royale, 50% w/w einer wässrigen Lösung mit 3% w/w Hefeextrakt, 15% w/w Glucose und 15% w/w Fructose.

C (D4 bis D6): 50% w/w Gelée royale, 50% w/w einer wässrigen Lösung mit 4% w/w Hefeextrakt, 18% w/w Glucose und 18% w/w Fructose.

Dimethoat (BASF, Reinheit 99,9%) und Fenoxycarb (HPC Standards, Reinheit 98,3%) wurden 2018 als Testsubstanzen verwendet, 2019 wurde das Protokoll um Chlorantraniliprol (HPC Standards, Reinheit 98,1%) und Flupyradifuron (HPC Standards, Reinheit 99,9%) erweitert. Das Testen der Wirkstoffe erfolgte einzeln und nicht in Kombination. Verunreinigungen der Wirkstoffe wurden bei der Berechnung der Testkonzentrationen miteinbezogen. Es wurde Gelée royale aus biologischer Produktion (Cum Natura) genutzt. Rückstandsanalysen ergaben keine Verunreinigungen. Die Lagerung erfolgte bei $\leq -10^{\circ}\text{C}$. Von Tag 3 (D3) bis Tag 6 (D6) nach dem Umlarven wurden die Testsubstanzen in gleichbleibender Konzentration an die Larven verfüttert. An Tag 6 (D6) resultierte daraus eine kumulative Dosis an aufgenommenem Wirkstoff (Tabelle 2).

Material und Methoden

Tabelle 2: Auflistung der Behandlungsgruppen und den entsprechenden Wirkstoffen (a.s. = aktive Substanz). Wirkungsweise und Stoffgruppe stammen aus Fishel (2018). Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben zur LD₅₀ auf Larven

Gruppe	Behandlung	Konzentration (mg a.s./kg Futter)	Kumulative Dosis (µg a.s./larva)	Wirkstoff	Wirkungsweise	Stoffgruppe	LD ₅₀ (akut orale Dosis in µg)
C	Kontrolle	-	-	Wasser			-
CS	Lösungsmittel- Kontrolle	-	-	Wasser + Aceton			-
DM1	Behandlung 1	0,33	0,05	Dimethoat	AChE-Hemmer	Organophosphat	1,9 (Aupinel et al. 2007)
DM2	Behandlung 2	0,65	0,1	Dimethoat	s. DM1	s. DM1	s. DM1
DM3	Behandlung 3	1,29	0,2	Dimethoat	s. DM1	s. DM1	s. DM1
Cl	Behandlung 4	0,72	0,11	Chlorantraniliprol	Ryanodin-Rezeptor- Modulator	Diamid	> 104 (Arbeiterin, Dinter et al. 2009)
F	Behandlung 5	10	1,54	Flupyradifuron	nAChR-Agonist	Butenolid	1,2 (Arbeiterin, EFSA 2015)
Fe	Behandlung 6	0,32	0,05	Fenoxycarb	Juvenilhormon- Analogon	Carbamat	Kein Effekt (Aupinel et al. 2007)

Material und Methoden

Für die Stammlösung von Dimethoat wurde der Wirkstoff in destilliertem Wasser gelöst, Fenoxycarb, Flupyradifuron und Chlorantraniliprol in Aceton. Daran schloss sich die Herstellung von Verdünnungsreihen an, um die Zielverdünnung zu erreichen. Der Anteil an verdünnter Stammlösung im Futter betrug bei Dimethoat 10%, bei Fenoxycarb, Flupyradifuron und Chlorantraniliprol 0,5%. Aufgrund der Aceton-Verdünnung wurde eine zusätzliche Aceton-Kontrolle in die Versuche integriert, die ebenfalls 0,5% des Lösungsmittels enthielt. Das Vermischen der Wirkstoff-Lösung mit dem Futter geschah erst kurz vor der Applikation. Alle Larven wurden mit Ausnahme von Tag 2 einmal am Tag mit einer Multistepper-Pipette (Eppendorf Multipipette M4) gefüttert. Das Futter wurde vor der Anwendung im Inkubator erwärmt. Die Larven wurden weder berührt noch mit Futtersaft überdeckt. Bei Bedarf wurde das Futter während des Tests bei +1°C - +5°C gelagert. An den Tagen 4 (D4), 6 (D6) und 8 (D8) nach dem Umlarven wurden lebende Larven mit phosphatgepufferter Saline (PBS) abgespült und bei -80°C eingelagert (Abbildung 7). Für die anschließende molekulare Untersuchung erfolgte der Transport von 10 Larven je Behandlungsgruppe und Tag von Braunschweig nach Berlin in Kryoröhrchen auf Trockeneis.

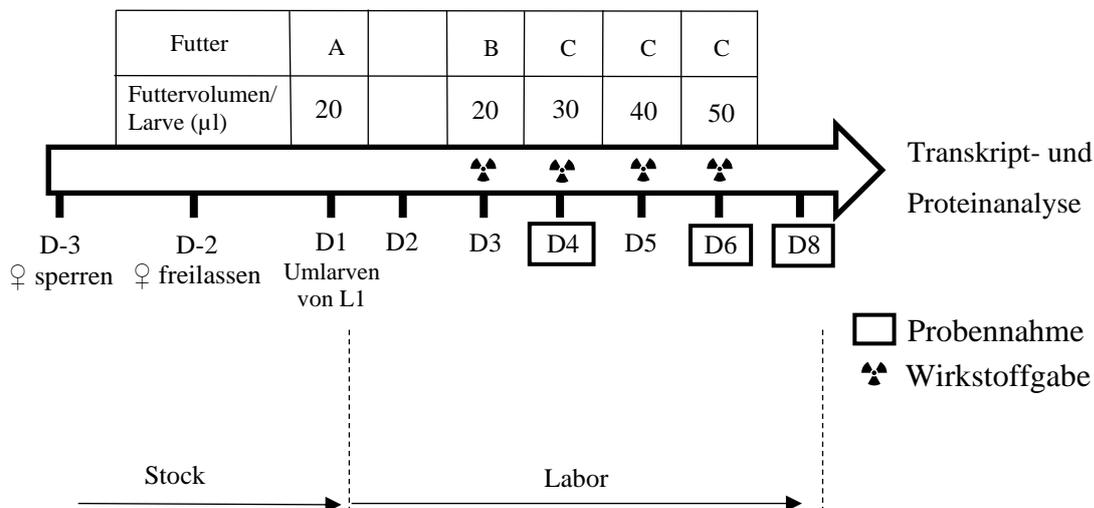


Abbildung 7: Larvaler Fütterungsversuch. Grafische Darstellung des larvalen Fütterungsversuches von Aupindel et al. (2005, geändert nach OECD 2016). D repräsentiert die Tage in Bezug zum Umlarven von L1 und A, B und C stellen die verschiedenen Futtereinheiten dar. An D3 – D6 erfolgte die Wirkstoffgabe. ♀ symbolisiert die Königin. An den Tagen D4, D6 und D8 fand die Probennahme statt.

2.3 Transkriptomanalyse

2.3.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde gemäß den Vorgaben des Zymo Research Quick RNA™ Microprep Kits (Thermo Scientific, Freiburg) vorgenommen: Zunächst wurde eine Larve in ein Homogenisierungs-Röhrchen (MP Biomedicals, Heidelberg) mit 1,4 mm Keramik-Kugeln gegeben und mit 600 µl Lyse-Puffer bedeckt. Die Homogenisierung erfolgte in einem BeadBlaster 24 (Benchmark Scientific, Edison, U.S.A.). Es wurden vier Homogenisierungs-Zyklen zu je 15 s bei einer Geschwindigkeit von 6 m/s durchgeführt. Zwischen jedem Zyklus wurde die Probe für 1 min auf Eis gestellt, um Schäden durch auftretende Reibungswärme zu verhindern. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Für die Analyse wurde die Probe in einer Zentrifuge (Thermo Scientific, Karlsruhe) bei 16 000 x g für 30 s zentrifugiert und vom Überstand 300 µl in ein 1,5 ml RNase-freies Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Es wurde darauf geachtet, kein Fett aus der aufliegenden Lipidschicht aufzunehmen. Im Anschluss wurde das gleiche Volumen an Ethanol (100%, Carl Roth, Karlsruhe) hinzugefügt und durch Invertieren gemischt. Die Mischung wurde auf eine Zymo-Spin™ IC-Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen gegeben und bei 16 000 x g 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 400 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben. Nach der Zentrifugation wurde abermals der Durchfluss verworfen und die Säule im Anschluss für 15 min bei Raumtemperatur mit 40 µl DNase I-Mix (5 µl DNase I + 35 µl Verdau-Puffer) inkubiert. Es wurden anschließend nacheinander 400 µl Prep-Puffer, 700 µl Wasch-Puffer und 400 µl Wasch-Puffer auf die Säule gegeben. Nach jeder Puffergabe wurde zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Trocknen der Säule wurde diese noch einmal für 2 min zentrifugiert. Für den Elutions-Schritt wurde die Säule in ein 1,5 ml RNase-freies Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 15 µl DNase/RNase-freiem Wasser überschichtet. Nach letztmaliger Zentrifugation erfolgte die Lagerung bei -20°C.

2.3.2 Quantitative und qualitative RNA-Analyse

Die Konzentration und Qualität der RNA wurde mit einem Spektrophotometer (DeNovix, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) durch Absorption bei 260 nm bestimmt. Der Elutions-Puffer diente als Nullwert. Neben der RNA-Konzentration wurde die Qualität durch die Messung des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 230 nm (260/230) sowie 260 nm und 280 nm (260/280) ausgedrückt. Reine RNA besitzt eine OD (260/230) zwischen 2,0 und 2,2 und eine OD (260/280) um 2 (Barbas et al. 2007, Krebs et al. 2009).

Die RNA-Integrität fand stichprobenartig mit dem Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer und RNA 6000 Nano Chip Kit (Agilent Technologies, Waldbronn) statt. Der Chip wurde dabei mit jeweils 1 µl einer RNA-Probe mit einer Konzentration von 600 ng beladen. Die RNA wurde anschließend kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und detektiert. Die resultierenden Elektropherogramme und die angegebene RNA-Integritäts-Nummer (RIN) dienen zur Beurteilung der RNA-Qualität. Bei dieser Methode wird die Integrität der ribosomalen RNAs 18S und 28S untersucht. Eine integre Probe ist dabei so definiert, dass man nach der elektrophoretischen Auftrennung zwei distinkte Banden der beiden beschriebenen rRNAs erkennt. Diese Aussage beruht auf der Annahme, dass die ribosomale RNA die Integrität aller isolierten RNAs widerspiegelt (Winnebeck et al. 2010). Die RIN umfasst einen Bereich von 1 bis 10, wobei ein Wert ab 7 als ausreichend angesehen wird (Cui et al. 2011).

2.3.3 Primerdesign

Für die Untersuchung spezifischer Honigbienen-Transkripte wurden Primer für 102 ausgewählte Gene definierter Kategorien mit dem NCBI Primer Design Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) exonübergreifend und targetspezifisch entwickelt. Die Auswahl der Primer nahm PD Dr. Soroush Sharbati vor. Die gewählten Kriterien befinden sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Gewählte Einstellungen für die Primer-Synthese

Kriterium	Einstellung
PCR Product Size	Minimum: 90, Maximum: 250
Primer Melting Temperature (°C)	Minimum: 58, Optimum: 60, Maximum: 62
Maximum Tm Difference (°C)	2
Exon Junction Span	Primer must span an exon-exon junction
Maximum Self complementarity	4
Maximum GC Difference (%)	5

Die Primer-Synthese wurde durch die Firma Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) durchgeführt und der Transport erfolgte in gefriergetrockneter Form. Jedes Zielgen setzt sich aus einem Paar, bestehend aus Forward- und Reverse-Primer, zusammen. Die Rekonstitution erfolgte mit TE-Puffer (1 ml 10 mM TRIS, 0,2 ml 1 mM EDTA pH 8, mit VE-H₂O auf 100 ml aufgefüllt), um eine finale Konzentration von 100 µM zu erhalten. Die Primer-Stammlösungen wurden mit RNase-freiem Wasser auf 10 µM verdünnt (Arbeitslösung).

Im Anschluss wurden je 20 µl Forward- und Reverse-Primer mit 10 µl RNase freiem Wasser gemischt, um eine Endkonzentration von 4 µM je Primer zu erhalten (Tabelle 18, Anhang).

Die Transkriptomdaten aus dem Jahr 2018 wurden mittels einer hierarchischen Clusteranalyse ausgewertet (Babicki et al. 2016). Dabei wurden folgende Einstellungen gewählt:

Clustering complete linkage

Distance Pearson

Clustering of rows

Bei dieser Art der Auswertung werden Gruppen (Cluster) dargestellt, in denen ähnliche Gene (Reihen) so organisiert sind, dass sie dicht beieinander liegen. Anhand der Ergebnisse wurde schließlich eine Auswahl an Genen getroffen, die für die Transkriptanalyse im Jahr 2019 weiterverwendet wurden.

2.3.3.1 Ermittlung der Primer-Qualität

Jedes Primer-Paar dient der Vervielfältigung (Amplifikation) eines bestimmten Transkripts. Das Produkt einer Vervielfältigung nennt man Amplicon. Vor der Nutzung der Primer muss getestet werden, ob die Synthese der Amplicons effizient abläuft. Dazu wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe über sechs Zehnerpotenzen erstellt und die entsprechenden C_T -Werte mittels RT-qPCR ermittelt. Die Messwerte wurden für die Erstellung einer grafischen Darstellung als Kurve genutzt. Über die Geradengleichung konnte die Steigung m ermittelt werden, die Aufschluss über die Effizienz gab. Eine Steigung $m = 3,32$ bedeutet eine Effizienz von 1 (100%), was eine Verdoppelung des Ausgangsmaterials nach jedem Zyklus bedeutet. Die Effizienz sollte in einem Bereich zwischen 90 – 110% liegen (Bustin 2004).

2.3.3.2 Ermittlung der Amplicon-Qualität

Vor der Anwendung in der RT-qPCR wurde die Größe der Amplicons gelelektrophoretisch ermittelt. Für die Auswertung wurden Gele mit 1,5% Agarose (LE Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf) und TAE-Puffer (242 g 1 mM Tris in 500 ml VE-H₂O, 100 ml 0,5 M Na₂EDTA pH 8, 57,1 ml Essigsäure, mit VE-H₂O auf 1 l aufgefüllt) hergestellt (0,9 g Agarose + 60 ml TAE + 3 µl Ethidiumbromid). Die Geltaschen wurden mit je 12 µl Reaktionsgemisch (10 µl PCR-Reaktionsprodukt + 2 µl Stopp-Puffer) beladen und mit TAE-Puffer überschichtet. Zur Ermittlung der Amplicon-Größe wurde ein geeigneter Marker verwendet (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific). Die Auftrennung des PCR-Produkts erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (Carl Roth, Karlsruhe) bei 80 V für eine Stunde. Zur Visualisierung der DNA wurde ein Transilluminator (TXF-20.MC, Vilber

Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell) verwendet. Die entsprechenden Gelbanden wurden ausgeschnitten und die DNA nach Vorgaben des NucleoSpin Gel & PCR CleanUp Kits (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (OD 260) bestimmt.

Die Firma Eurofins GATC (Köln) führte die Sequenzierung der PCR-Produkte mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977) durch. Zur Analyse wurden 7,5 µl PCR-Produkt und 2,5 µl des Forward-Primers (10 µM) eingesendet und mit NCBI Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Altschul et al. 1990) ausgewertet. Eine Auflistung aller analysierten Gene mit den dazugehörigen spezifischen Primern befindet sich im Anhang (Tabelle 18).

2.3.4 cDNA-Synthese und RT-qPCR

2.3.4.1 DNase-Verdau

Um zu gewährleisten, dass in der isolierten RNA keine DNA-Kontaminationen enthalten sind, wurde ein DNase-Verdau vorgenommen. Hierzu wurde 1 µg RNA in einem 96-Well-Thermocycler (Veriti, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt) mit einer DNase I Endonuklease (1 U/µl, Thermo Scientific) inkubiert. Die Vorgehensweise ist dem Protokoll in Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Protokoll des DNase-Verdau. Das Volumen X ist reaktionsspezifisch

	Volumen (µl)/Reaktion
RNA (1 µg)	X
10x Puffer + MgCl ₂	1
DNase	1
DEPC-H ₂ O	X
Gesamt	10
Mischen, zentrifugieren und im Thermocycler inkubieren bei	
37°C	30 min
Hinzufügen von 1 µl EDTA (50 µM), mischen, zentrifugieren, inkubieren bei	
65°C	10 min

2.3.4.2 Reverse Transkription

Die DNase-behandelte RNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase (M-MLV-RT, 200 U/ μ l, Thermo Scientific, Karlsruhe) in einem 96-Well-Thermocycler (Veriti, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt) in den komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben. Die Durchführung geschah nach dem Protokoll in Tabelle 5.

Tabelle 5: Protokoll der reversen Transkription

	Volumen (μ l)/Reaktion
DNase behandelte RNA	11
Random Primer Mix (60 μ M)	1
Mischen, zentrifugieren und im Thermocycler inkubieren bei	
70°C	5 min
5x RT-Puffer	4
dNTP Mix (10 mM)	2
DEPC-H ₂ O	1
MMLV-RT	1
Gesamt	20
Mischen, zentrifugieren und im Thermocycler inkubieren bei	
25°C	10 min
42°C	60 min
70°C	5 min
cDNA im Verhältnis 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnen	

2.3.4.3 RT-qPCR

Zur Quantifizierung der cDNA-Produkte wurde ein 96-Well-Platten PikoReal Real-Time PCR-System (Thermo Scientific) verwendet. Für einen Reaktionsansatz (Tabelle 6) wurde der verdünnten cDNA ein Blue S Green qPCR Mix (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) und das spezifische Primer-Paar aus Forward- und Reverse-Primer hinzugefügt (Tabelle 18, Anhang). Zur Vorbereitung wurde zunächst 1 ml Blue S Green qPCR Mix mit 35 μ l ROX vermischt. Es wurden 9 μ l Mix (1 μ l cDNA + 5 μ l Blue S Green qPCR Mix + 3 μ l DEPC-H₂O) vorgelegt und dann 1 μ l spezifisches Primer-Paar hinzugegeben. Die Reaktionen fanden in 96-Well PCR-Platten (Thermo Scientific) statt, die mit Abdicht-Streifen (Thermo Scientific) versiegelt wurden.

Material und Methoden

Im ersten Amplifikations-Schritt wurde die cDNA bei 95°C denaturiert, um die Ansatzstellen für die Primer freizulegen. Dem folgte ein 40-stufiges Zwei-Phasen-Protokoll, in dem die Primer an die DNA banden, die Amplifikation mittels einer DNA-Polymerase erfolgte und es zur erneuten Denaturierung der Amplicons kam. Diesem Schritt folgte eine Analyse der Schmelzkurven bei 60°C, um die Qualität der RT-qPCR zu überprüfen.

Tabelle 6: Protokoll für die RT-qPCR

	Volumen (µl)/Reaktion
cDNA (1:5 Verdünnung)	1
Blue S Green qPCR Mix	5
Primer-Paar	1
DEPC-H ₂ O	3
Gesamt	10
Mischen, zentrifugieren und im Thermocycler inkubieren bei	
95°C	2 min
95°C	5 s
60°C	20 s } 40x
60°C	30 s
20°C	10 s

2.3.4.4 Auswertung der RT-qPCR

Zur Normalisierung der Expressionsdaten 2018 dienten bei Dimethoat und Fenoxycarb die Referenzgene *enolase*, *gapdh* und *rps18*, im Jahr 2019 waren dies *enolase*, *gapdh* und *rpl13a*. Bei den Behandlungen mit Flupyradifuron und Chlorantraniliprol wurden *gapdh*, *cox6c* and *ATP synthase beta* ausgewählt. Die Qualität der Referenzgene wurde mit geNorm Version 3.5 (Vandesompele et al. 2002) und Normfinder Version 0.953 (Andersen et al. 2004) im Vorfeld verifiziert und als geeignet befunden.

Die relative Genexpression wurde mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (delta delta threshold cycle, Formel 1) ermittelt. Hierzu wurde zunächst das geometrische Mittel der C_t -Werte der Referenzgene gebildet und von den C_t -Werten jedes Zielgens subtrahiert. Dadurch erhielt man die korrigierten C_t -Werte für jedes Gen (ΔC_t Zielgen). Im Anschluss wurde für jedes Gen der Kontrollgruppe das arithmetische Mittel gebildet und von den individuellen ΔC_t -Werten der Behandlungsgruppe subtrahiert, um den $\Delta\Delta C_t$ -Wert zu erhalten. Zur besseren Darstellung wurden diese Werte in sogenannte *Fold changes* umgerechnet und anschließend der

Logarithmus zur Basis zwei gebildet (Bustin 2004). Dadurch ergibt sich bei einer *Fold change* von 2, also einer Verdoppelung der Transkripte, ein \log_2 -Wert von 1, einer Vervierfachung ein \log_2 -Wert von 2, einer Verachtfachung ein \log_2 -Wert von 3 usw.

$$C_{tZielgenP} - C_{tRefP} = \Delta C_{tP}$$

$$C_{tZielgenK} - C_{tRefK} = \Delta C_{tK}$$

$$\Delta C_{tP} - \Delta C_{tK} = \Delta \Delta C_t$$

$$Fold\ change = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

C_t = Threshold cycle

Zielgen = Untersuchtes Gen

Ref = Referenzgen

P = Behandelte Probengruppe

K = Kontrollgruppe

Formel 1: Mathematische Grundlage der $\Delta \Delta C_t$ -Methode.

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit SPSS Version 25 (IBM Corp., Armonk, NY, Vereinigte Staaten) vorgenommen. Der Test auf Normalverteilung der einzelnen Gene ergab sowohl parametrische als auch nicht-parametrische Verteilungen (Kolmogorov-Smirnov-Test). Die Daten wurden daher mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet, da diese auch bei Verletzungen der Normalverteilungs-Annahme sehr robust ist (Schmider et al. 2010, Mena et al. 2017). Der paarweise Vergleich erfolgte über Kontraste. Ein Niveau von $p \leq 0,05$ galt als signifikant. Im Jahr 2018 wurden drei, im Jahr 2019 sechs Replikate ausgewertet. Bei der Auswertung wurde darauf geachtet, dass jede Behandlungsgruppe nur mit der entsprechenden Kontrolle verglichen wurde. Die Zuordnung war wie folgt: Kontrolle (C) – 0,05 μg Dimethoat (DM1)/ 0,1 μg Dimethoat (DM2)/0,2 μg Dimethoat (DM3); Lösungsmittel-Kontrolle (CS) – Fenoxycarb (Fe)/ Flupyradifuron (F)/Chlorantraniliprol (Cl).

2.4 Proteinanalyse

2.4.1 Protein-Isolierung und Aufreinigung

Die Homogenisierung der Larven erfolgte in 300 μl Lysepuffer (9 M Harnstoff [GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg], 2% CHAPS [Carl Roth, Karlsruhe]: 1 ml Puffer wurde mit 10 mg Dithiothreitol [DTT, GE Healthcare Europe GmbH], 1 μl Proteaseinhibitorcocktail [Merck Biosciences GmbH, Darmstadt], 5 μl Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF; AppliChem

GmbH, Darmstadt] versetzt). Im Anschluss wurden die Proben für eine Stunde auf Eis gestellt und alle 20 min mit einem Vortexer (IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau) gemischt. Nachfolgend wurden die Proben bei 13 000 x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert (Biofuge fresco Heraeus, Thermo Scientific, Osterode). Vom Überstand wurden 2 x 100 µl in je ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt. Dadurch lag jede Probe als Duplikat vor. Die Aufreinigung der Proben erfolgte gemäß den Vorgaben des 2D Clean-Up Kits (GE Healthcare, Piscataway, Vereinigte Staaten). Die jeweilige Proteinprobe wurde in einem entsprechenden Volumen DIGE-Puffer (8 M Harnstoff, 4% CHAPS, 30 mM Tris, pH 8,5) gelöst. Nach der Aufreinigung wurden die Duplikate wieder vereint. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.2 Quantifizierung der Proteinproben

Die Quantifizierung erfolgte photometrisch gemäß dem Protokoll des Pierce™ 660 nm Protein Assays (Thermo Scientific, Karlsruhe). Das Prinzip basiert dabei auf der Bildung eines Farbstoff-Metall-Komplexes mit den Proteinen, wodurch es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums kommt, das bei 660 nm gemessen wird. Zunächst wurde mit dem produkteigenen Bovine Serum Albumin Standard (BSA) eine Standardreihe von 50 µg/ml bis 2 mg/ml erstellt. Als Nullwert diente der DIGE-Puffer. Die Proben wurden zuvor mit dem doppelten Volumen DIGE-Puffer verdünnt, um die maximal messbare Proteinkonzentration nicht zu überschreiten. Für die Messung wurden 5 µl Probe bzw. Standardlösung in einer 96-Well Mikrotiterplatte (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) vorgelegt und mit 75 µl Protein Assay Reagenz versetzt. Jede Messung erfolgte doppelt. Für eine ausreichende Vermischung wurde die Platte für 1 min bei einer mittleren Geschwindigkeit gerüttelt (MHL 23, HLC by DITABIS, Pforzheim) und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung wurde mit dem iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., Feldkirchen) und der entsprechenden Software (Microplate Manager®, BioRad, Version 6.3) vorgenommen.

2.4.3 CyDye-Markierung der Proteinoberfläche

Die Proteinauswertung erfolgte mit dem DIGE-Verfahren (**D**ifference **G**el **E**lectrophoresis). Diese Technik erlaubt es, bis zu drei verschiedene Proteinproben auf einem 2D-Gel zu vergleichen. Zunächst wurde ein interner Standard aus allen zu untersuchenden Proben erstellt, der insgesamt 50 µg Protein enthielt. Von jedem Proben-Lysat wurden ebenfalls Aliquots mit einem Gesamtproteingehalt von 50 µg erstellt. Die Farbstoff-Markierung der

Proteine wurde dem Hersteller-Protokoll entsprechend vorgenommen (NH Dye AGNOSTICS GmbH, Halle). Um den Verlust von Farbstoff und Probenmaterial zu minimieren, wurden stark hydrophobe Mikroreaktionsgefäße und Pipettenspitzen des Refraction-2D™ Spot Picking Kits (NH Dye AGNOSTICS GmbH, Halle) verwendet. Jede Proteinprobe wurde entweder mit 400 pmol Cy3 oder Cy5 (CyDyes, GE Healthcare) markiert, der Standard mit Cy2 eingefärbt. Anschließend wurden die drei Proben für ein Gel (Cy2 + Cy3 + Cy5) vereint und gegebenenfalls mit DIGE-Puffer auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht.

2.4.4 2D-Gelelektrophorese

2.4.4.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF, 1. Dimension)

Jede Gelprobe wurde schließlich mit DeStreak™ Rehydration Solution (1 ml DeStreak™-Lösung + 5 µl IPG-Puffer [immobilized pH gradient buffer 3–10 NL, GE Healthcare]) auf 300 µl aufgefüllt. Bis zu sechs Gelproben wurden in die IEF-Apparatur (Protean IEF Cell, BioRad) pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in einem pH-Bereich von 3–10 mit 17 cm langen IPG-Streifen (ReadyStrip, BioRad, U.S.A.), die mit 3 ml Mineralöl (USB-Corporation, Cleveland, Vereinigte Staaten) bedeckt wurden. Die Laufbedingungen waren wie folgt (20°C):

50 V für 14 h, 200 V für 1 h, 500 V für 1 h, 10 000 V für 1 h, 10 000 V für 6 h.

Nach der IEF wurden die Streifen mit demineralisiertem Wasser abgespült und für die weitere Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.4.2 Massespezifische Auftrennung (2. Dimension)

2.4.4.2.1 Gelanfertigung

Für das Ansetzen von sechs Gelen wurden 180 ml 30%ige Acrylamidlösung (Rotiphorese® Gel 30, Carl Roth, Karlsruhe), 113 ml 1,5 M Tris/HCl (181,71 g Tris [Carl Roth, Karlsruhe], 400 mg SDS [GE Healthcare], pH 8,8) und 155 ml demineralisiertes Wasser in einem Rundkolben gemischt und mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Millipore® Modell XX5522050) für 20 min entgast. Danach wurde die Lösung für 10 min im Kühlschrank bei 4°C–10°C gelagert. Zum Anfertigen der Gele stand eine Gel-Gießvorrichtung (Ettan DALTsix gel caster, Amersham Biosciences) mit Gelplatten bereit. Vor dem Eingießen der Gel-Lösung wurde dieser 225 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED, GE Healthcare) und 1,8 ml 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS, Life Technologies) hinzugefügt. Die Gele wurden mit 0,1% SDS überschichtet. Die Polymerisierung erfolgte bei 18°C für ungefähr fünf Stunden. Die polymerisierten Gele wurden aus der Gießvorrichtung entnommen und auf ihre Qualität

überprüft. Nur einwandfreie, luftblasenfreie und einheitlich polymerisierte Gele wurden weiterverwendet. Vor der Benutzung wurden die Gele über Nacht in Klarsichtfolie und einer Plastiktüte aufbewahrt, um eine vollständige Polymerisierung zu gewährleisten

2.4.4.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein Liter 10x Elphopuffer angesetzt (10 g SDS, 30,3 g Tris, 144 g Glycin [Carl Roth, Karlsruhe], pH 8,8). Dieser wurde anschließend auf die notwendigen Konzentrationen verdünnt. Zunächst wurden die IEF-Streifen mit Equilibrierungspuffer (6M Harnstoff [Sigma Aldrich, Steinheim], 30% Glycerin [Carl Roth, Karlsruhe], 2% SDS, 0,05 M Tris/HCl, 0,02% Bromphenolblau [Merck Biosciences GmbH], pH 8,8) behandelt. Zu 10 ml Equilibrierungspuffer wurde 10 mg/ml DTT hinzugefügt und die Streifen anschließend 15 min equilibriert. Für eine weitere Equilibrierung von 15 min wurde im Equilibrierungspuffer 25 mg/ml Iodacetamid (AppliChem GmbH, Darmstadt) gelöst. Der Puffer wurde nach jeder Equilibrierung entsorgt. Anschließend wurden die Streifen mit 1x Elphopuffer abgespült. Die Streifen wurden im Anschluss auf die Geloberfläche gelegt und mit 0,5%iger Agarose in 1x Elphopuffer überschichtet. Die Gelplatten wurden in der Elektrophorese-Einheit (Ettan DALSix, Amersham Biosciences) platziert. Die untere Kammer wurde mit 1x Elphopuffer und die obere Kammer mit 2x Elphopuffer aufgefüllt. Die integrierte Umwälzpumpe und eine zusätzliche Kühleinheit (23°C, Pharmacia LKB, MultiTemp II) wurden eingeschaltet. Über ein Netzgerät (electrophoresis power supply EPS 3501XL, Amersham Pharmacia Biotech) wurde bei sechs Gelen eine Leistung von zwei Watt für eine Stunde und anschließend von zwölf Watt angelegt, bis das mitlaufende Bromphenolblau den unteren Gelrand erreichte.

2.4.4.3 Auswertung der 2D-Gelelektrophorese

Die Visualisierung der Proteine fand mittels des Typhoon 9400 Fluoreszenz-Scanners (Amersham Biosciences) statt. Die Anregung erfolgte bei den farbstoffspezifischen Wellenlängen von 488 nm (blau), 532 nm (grün) und 633 nm (rot). Die Protein-Detektion und der Abgleich zwischen den Gelen mit anschließender statistischer Auswertung (Student's t-Test) wurde mithilfe der Software Delta2D (Version 4.5.3, Decodon GmbH, Greifswald) vorgenommen. Es wurden nur Protein-Spots für die Analyse berücksichtigt, die eine signifikant induzierte oder reprimierte *Fold change* von mindestens 1,5 aufwiesen. In den Jahren 2018 und 2019 wurden jeweils vier Replikate von Dimethoat und Fenoxycarb von D6 gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zusätzlich fand 2019 eine gemeinsame Auswertung aller

Gele statt. Außerdem wurden 2019 vier Replikate der Flupyradifuron-behandelten Larven von D8 analysiert.

2.4.5 Protein-Charakterisierung mittels Massenspektrometrie (MS)

Vor der eigentlichen Protein-Charakterisierung mussten die ausgewählten Proteine aus dem Gel isoliert werden. Hierzu wurde eine erneute Gelelektrophorese mit zwei Gelen durchgeführt. Um möglichst eindeutige Protein-Spots zu erhalten, wurden pro Gel 400 µg Protein eingesetzt. Für diese Menge wurden entsprechende Volumina mehrerer Proteinproben vereint, die ein Gesamtvolumen von 200 µl nicht überschritten. Es wurde mit DeStreak™ Rehydration Solution auf 300 µl aufgefüllt. CyDye-Farbstoffe kamen nicht zum Einsatz. Zusätzlich zu den Proben wurde während der 2. Dimension ein Marker (Spectra™ Multicolor Protein Ladder, Thermo Scientific) aufgetragen, um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine zu bestimmen. Nach der Gelelektrophorese wurde eine Silberfärbung der Gele vorgenommen. Die im Nachfolgenden genannten Schritte erfolgten pro Gel mit 150 ml der angesetzten Lösung. Die Inkubation erfolgte auf einem Rüttler (GFL 3016, Burgwedel). In einem ersten Schritt wurden die Proteine für 2 x 30 min auf dem Gel fixiert (300 ml Ethanol [Carl Roth, Karlsruhe], 72 ml Eisessig [Carl Roth, Karlsruhe], 228 ml demineralisiertes Wasser). Anschließend erfolgten 3 x 20 min Waschgänge mit Ethanol (450 ml Ethanol, 450 ml demineralisiertes Wasser). Es folgte die Sensitivierung für 1 min mit Natriumthiosulfat (300 ml demineralisiertes Wasser, 150 µl 43% Natriumthiosulfat [Na₂S₂O₃]). Danach wurden die Gele für 3 x 20 sek mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Die Silberinkubation erfolgte im Anschluss für 20 min (300 ml demineralisiertes Wasser, 225 µl Formaldehyd [Carl Roth, Karlsruhe], 0,6 g Silbernitrat [AgNO₃, Carl Roth, Karlsruhe]). Anschließend wurde wieder mit demineralisiertem Wasser für 2 x 20 sek gewaschen, bevor es zur Entwicklung und Visualisierung der Protein-Spots für 3-6 min kam (300 ml demineralisiertes Wasser, 9 g Kaliumcarbonat [K₂CO₃, Carl Roth, Karlsruhe], 3 µl Na₂S₂O₃, 150 µl Formaldehyd). Die Entwicklung wurde durch eine Stopp-Lösung (300 ml demineralisiertes Wasser, 3 g Glycerin) angehalten. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte in demineralisiertem Wasser. Ausgewählte Proteine wurden unter möglichst sterilen Bedingungen aus dem Gel geschnitten und über eine kommerzielle Analytik (LC-MS: Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, Proteome Factory AG, Berlin) charakterisiert. In den zur Verfügung gestellten Daten wurden in jedem Spot mehrere Proteine identifiziert. Die Quantität wurde mittels eines sogenannten *Scores* ausgedrückt: Je höher der entsprechende *Score* ist, desto häufiger kam ein bestimmtes Peptid im analysierten Spot vor. Es wurde angenommen, dass ein Spot dem Protein

mit dem höchsten *Score* entspricht. Im Jahr 2018 wurden acht Proteine, im Jahr 2019 zwei Proteine identifiziert.

3. ERGEBNISSE

2018

3.1 Transkriptomanalyse

3.1.1 Quantität und Qualität der RNA

Die Gesamtkonzentration an RNA lag in der Regel deutlich über $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, das Verhältnis der Absorption bei 260/230 bzw. 260/280 zwischen 1,8 und 2,2. Die RNA-Integrität wurde zudem stichprobenartig mittels des Agilent Technologies 2100 Bioanalyzers untersucht. Die Elektropherogramme zeigten ein deutliches 18S-Signal (Abbildung 8A). Die RIN war bei den meisten Proben entweder unter 7 oder konnte nicht berechnet werden, da bekanntlich die große 28S rRNA bei Insekten während der Analyse zerbricht und somit die Grundlage für eine RIN-Berechnung nicht gegeben ist (Abbildung 8B-D). Eine rein optische Beurteilung der Elektropherogramme zeigte keine Anzeichen von Degradation.

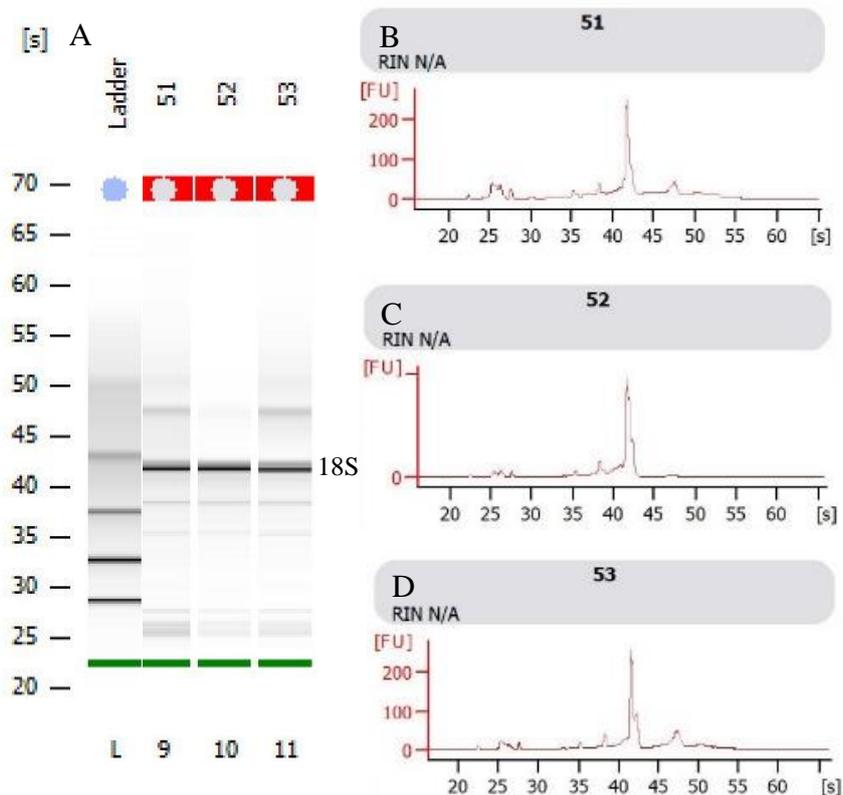


Abbildung 8: Elektrophorese-Daten ausgewählter Proben aus dem Jahr 2018. A: Die Spalte L enthält den RNA-Standard aus dem Kit. Die Spalten 9, 10 und 11 repräsentieren larvale RNA-Proben ($600 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Die 18S-Bande ist kenntlich gemacht. B, C und D zeigen die Elektropherogramme der in A dargestellten Proben. Eine RIN konnte nicht ermittelt werden (N/A). Das starke Signal stellt die 18S rRNA dar.

3.1.2 Auswahl der Primer

Insgesamt wurde die Qualität von 102 Primer-Paaren analysiert. Die Primer-Paare waren mit folgenden Stoffwechsel-Kategorien assoziiert: Alterung, Detoxifikation, Entwicklung, Immunsystem, mitochondrialer Transport, oxidative Phosphorylierung, Enzyme und Autophagie. In den Bienenlarven konnte die Expression von 79 Transkripten bestätigt werden, die in die Auswertung aufgenommen wurden. Ausschlusskriterien waren entweder eine zu geringe Effizienz (<90%) oder fehlende C_T-Werte in der RT-qPCR (Tabelle 18, Anhang). Die RT-qPCR-Effizienz der ausgewerteten Transkripte lag zwischen 90% und 110%. Die spezifischen Primer-Produkte konnten nach erfolgter Sequenzierung bestätigt werden.

3.1.3 RT-qPCR

3.1.3.1 Auswahl der Referenzgene

Für die Analyse der Referenzgene wurde das Programm geNorm verwendet. Dabei wurde zunächst aus den gemessenen C_T-Werten der RT-qPCR (n = 3) ein Normalisierungsfaktor bestimmt. Je geringer dieser Wert, desto stabiler ist die Expression eines Gens (Vandesompele et al. 2002). Für die Normalisierung der RT-qPCR-Daten wurden bei Dimethoat und Fenoxycarb die Gene *enolase*, *gapdh* und *rps18* festgelegt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Referenzgen-Berechnung im Jahr 2018. Es wurden n = 3 C_T-Werte zur Normalisierung verwendet

Behandlung	Referenzgen	Normalisierungs-Faktor
Dimethoat	<i>enolase</i>	0,236
Fenoxycarb	<i>gapdh</i>	0,251
	<i>rps18</i>	0,438

3.1.3.2 Vergleichende Expressionsdaten

Es wurden vergleichende Genexpressionsstudien von drei Replikaten an den Tagen vier (D4), sechs (D6) und acht (D8) durchgeführt (Abbildung 9). An D4 zeigten sich keine signifikanten Änderungen bei den Behandlungsgruppen. An D6 waren sechs Transkripte dysreguliert (Tabelle 19, Anhang), an D8 stieg diese Zahl auf 13 (Tabelle 8, Tabelle 20, Anhang).

Ergebnisse

Tabelle 8: Auflistung signifikant regulierter Transkripte im Jahr 2018

Gen	Behandlung	Tag	\log_2 <i>Fold change</i>	$-\log_{10}$ <i>p</i> -Wert
<i>atg6</i>	Fe	6	-1,64	2,10
<i>tim8</i>	Fe	6	0,82	1,48
<i>gabapap</i>	Fe	6	-1,84	3,38
<i>cyp9e2-1</i>	DM2	6	-1,89	2,82
<i>ache2</i>	DM2	6	-1,69	2,35
<i>toll</i>	DM2	6	-1,32	1,40
<i>mrpl47</i>	Fe	8	-0,39	1,64
<i>mrps12</i>	Fe	8	-0,34	1,32
<i>cyp9e2-1</i>	DM3	8	-2,10	2,52
<i>toll</i>	DM2	8	-1,42	2,54
<i>tim17</i>	Fe	8	-0,51	1,38
<i>tim8</i>	DM1	8	0,77	1,89
<i>tim8</i>	DM3	8	0,66	1,64
<i>cox6c</i>	Fe	8	-0,47	1,70
<i>atg6</i>	Fe	8	-0,43	1,30
<i>gabapap</i>	Fe	8	-0,94	2,89
<i>ache2</i>	DM2	8	-1,51	2,40
<i>hr4</i>	DM3	8	0,79	1,62
<i>antp</i>	DM1	8	0,66	1,47

Ergebnisse

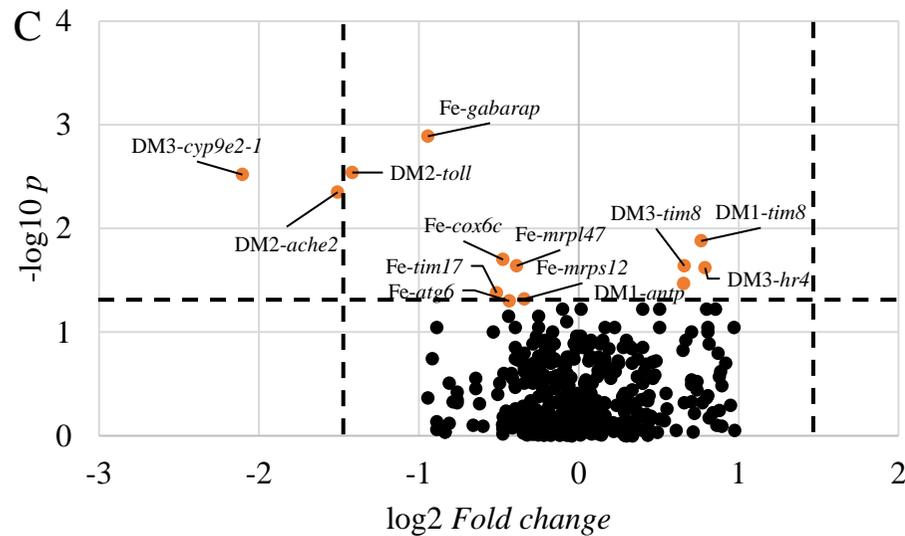
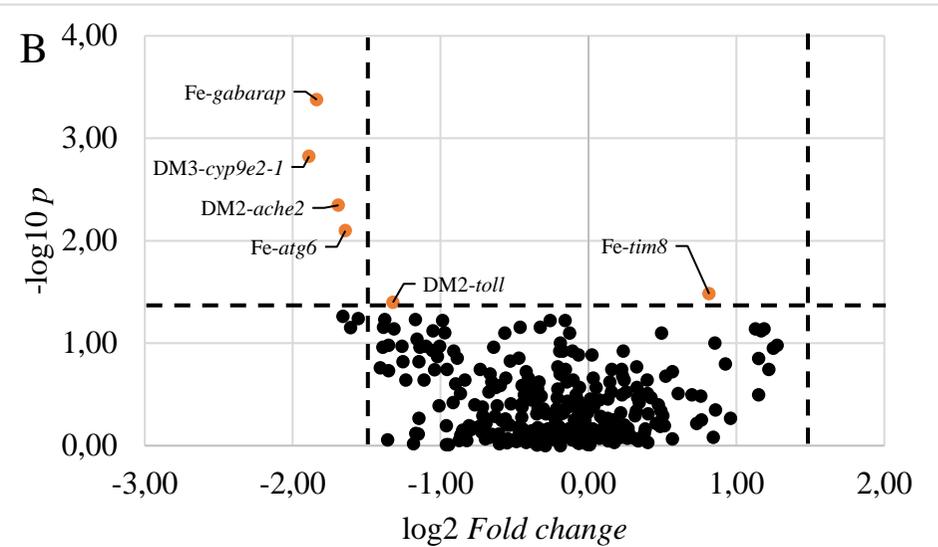
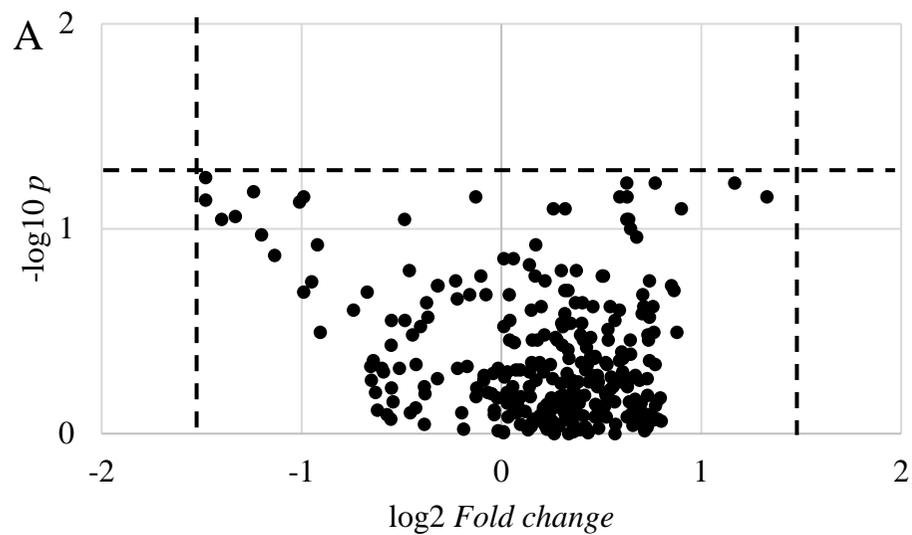


Abbildung 9: Vergleichende Genexpressionsdaten aus dem Jahr 2018. Die Darstellung erfolgt in einem doppelt logarithmischen Diagramm ($n=3$). Die Tage 4 (A), 6 (B) und 8 (C) sind dargestellt. Eingezeichnet ist die Signifikanz p von 0,05 als negativer dekadischer Logarithmus ($\sim 1,3$) und der Grenzwert der $\log_2 \text{Fold change}$ von -1,5 bzw. 1,5. Signifikant regulierte Transkripte sind rot markiert. Für weitere Informationen siehe Tabelle 8.

3.1.3.3 Clusteranalyse

Es hat sich gezeigt, dass an D8 die meisten signifikant regulierten Transkripte auftraten. Da dies die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sich die Transkripte entsprechend ihrer Expressionsprofile in Clustern anordnen, dienten die Daten von diesem Tag als Grundlage der Auswertung. Die Lösungsmittel-Kontrolle ist ebenfalls in der Analyse dargestellt, da das hinzugefügte Aceton als eine Art Behandlung betrachtet werden kann. Die statistische Auswertung zwischen den Kontrollen ergab keine Unterschiede. Es wurde dennoch darauf geachtet, dass jede Behandlungsgruppe nur mit der dazugehörigen Kontrolle verglichen wurde. Das Ziel war es, aus der bestehenden Genliste eine reduzierte Auswahl zu treffen, mit der im Jahr 2019 die Versuche weitergeführt wurden.

Das initiale Genarray ist aus sieben physiologischen Kategorien zusammengesetzt. Aus diesem Grund wurden die Transkripte in der *Heatmap* ebenfalls in sieben Cluster eingeteilt (Abbildung 10). Dazu wurde das dazugehörige Dendrogramm an einem bestimmten Punkt "abgestumpft". Unterhalb dieser Abstumpfung erfolgte dann die Einteilung in Cluster. Jedes Cluster besitzt zudem einen Mittelpunkt, der zu allen weiteren Punkten im Cluster einen ähnlichen Abstand besitzt. Da diese Mittelpunkte die Cluster repräsentieren, wurden diese für eine weitere Verwendung ausgewählt. Dabei handelt es sich um folgende Transkripte: *cox5b* (oxidative Phosphorylierung), *ache1* (Detoxifikation), *hex70b* (Entwicklung), *arp1* (Referenzgen), *e75* (Entwicklung), *apisimin* (Immunsystem) und *proc enz* (Immunsystem). Diese Transkripte vertreten ebenfalls eine Auswahl der physiologischen Kategorien, was ein Hinweis sein kann, welche Stoffwechselwege durch die Pestizideinwirkung beteiligt sind. Weiterhin wurden die signifikant regulierten Transkripte von D8 der Auswahl hinzugefügt. Diese weisen zum Großteil zwar keine \log_2 *Fold change* von $\pm 1,5$ auf, allerdings verweist die Signifikanz auf eine mögliche Dysregulierung. Dies betrifft folgende Zielgene: *mrpl47* und *mrps12* (Alter), *cyp9e2-1* und *ache2* (Detoxifikation), *toll* (Immunsystem), *tim17* und *tim8* (Mitochondrien-Transport), *cox6c* (oxidative Phosphorylierung), *atg6* und *gabarap* (Autophagie) sowie *hr4* und *antp* (Entwicklung).

Die bisherige Zusammenstellung der Transkripte legt den Schluss nahe, dass vor allem die Kategorien Immunsystem, Entwicklung und Detoxifikation betroffen sind. Für diese wurden daher weitere Gene ausgewählt. Die Monooxygenase *cyp9e2-2* zeigt laut *Heatmap* eine ähnliche Regulierung wie *cyp9e2-1*, weshalb dieses Transkript hinzugefügt wurde. Die Familie der Cytochrom P450-Monooxygenasen (CYPs) wird zudem mit der Detoxifikation von Insektiziden in Verbindung gebracht (Feyereisen 1999). Die Transkripte *hr4* und *e75* befinden sich in benachbarten Clustern und sind Teil der Ecdyson-induzierenden Kaskade. Hierzu gehört

Ergebnisse

ebenso das von *hr4* benachbarte *hr39*. Eine übergeordnete Regulierungsfunktion dieser beiden Transkripte übernimmt *hr38*, das Teil des Ecdyson-Rezeptors ist (Thummel 2002). Diese Gene wurden ebenfalls ausgewählt.

In Bezug auf das Immunsystem fällt auf, dass zwei Gene der Toll-Kaskade bereits vertreten sind (*toll*, *apisimin*). Um die Auswirkungen auf diesen Signalweg näher zu untersuchen, wurde *def1* hinzugefügt, das ebenso wie *apisimin* für ein antimikrobielles Peptid codiert (De Gregorio et al. 2002). Als letztes Gen einer stoffwechsel-assoziierten Kategorie wurde *tim16* ausgewählt. Dieses zeigt eine ähnliche Regulierung wie *tim17* und ist essenzieller Bestandteil beim Proteinimport ins Mitochondrium (Bauer et al. 2000, Mokranjac et al. 2007). Zuletzt wurden die Transkripte von potenziellen Referenzgenen ausgewählt, dies umfasst: *gapdh*, *rpl13a*, *rps18* und *enolase*. Damit umfasst das reduzierte Genarray 28 Transkripte, die für eine Weiterverwendung ausgewählt wurden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Ausgewählte Transkripte anhand der Ergebnisse aus 2018

Gen	Kategorie
<i>mrpl47</i>	Alter
<i>mrps12</i>	Alter
<i>cyp9e2-1</i>	Detoxifikation
<i>cyp9e2-2</i>	Detoxifikation
<i>ache1</i>	Detoxifikation
<i>ache2</i>	Detoxifikation
<i>toll</i>	Immunsystem
<i>def1</i>	Immunsystem
<i>apisimin</i>	Immunsystem
<i>proc enz</i>	Immunsystem
<i>tim8</i>	Mitochondrien-Transport
<i>tim16</i>	Mitochondrien-Transport
<i>tim17</i>	Mitochondrien-Transport
<i>cox5b</i>	Oxid. Phosphorylierung
<i>cox6c</i>	Oxid. Phosphorylierung
<i>atg6</i>	Autophagie
<i>gabarap</i>	Autophagie
<i>hr4</i>	Entwicklung
<i>hr38</i>	Entwicklung

Ergebnisse

<i>hr39</i>	Entwicklung
<i>e75</i>	Entwicklung
<i>antp</i>	Entwicklung
<i>hex70b</i>	Entwicklung
<i>arp1</i>	Referenzgen
<i>enolase</i>	Referenzgen
<i>gapdh</i>	Referenzgen
<i>rpl13a</i>	Referenzgen
<i>rps18</i>	Referenzgen

3.2 Proteinanalyse

3.2.1 Quantität der isolierten Proteine

Die Protein-Isolierung der Larvenproben von D6 ergab im Jahr 2018 eine mittlere Ausbeute von 1,53 µg/µl.

3.2.2 2D-Gelelektrophorese

Die Transkriptomanalyse hat gezeigt, dass an Tag 6 (D6) sowohl Fenoxycarb als auch Dimethoat zu signifikanten Dysregulierungen mit \log_2 *Fold changes* von mindestens $\pm 1,5$ führten. Daher wurde dieser Tag ausgewählt, um diese deutlichen Unterschiede auch im Proteom mittels 2D-Gelelektrophorese sichtbar zu machen. Dazu wurde jeweils ein Protein-Pool von jeder Behandlungsgruppe (n=4) in der 2D-PAGE gegen den entsprechenden Kontroll-Pool (n=4) aufgetrennt und insgesamt 853 Proteinspots von der Software detektiert. Nach Anwendung der genannten Kriterien (Signifikanz $\leq 0,05$; *Fold change* mindestens $\pm 1,5$) wurden die daraus resultierenden Spots händisch geprüft, ob diese eine ausreichend starke Färbung aufwiesen und eindeutig von benachbarten Spots unterscheidbar sind (Abbildung 11). Diese zusätzlichen Parameter erleichterten ein späteres Ausschneiden der Spots für die Identifizierung. Daraus ergaben sich insgesamt 72 Spots, die diese Anforderungen erfüllten. Die Anzahl an induzierten und reprimierten Proteinen ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Anzahl an induzierten und reprimierten Protein-Spots der 2D-Gelelektrophorese im Jahr 2018

	DM1	DM2	DM3	Fe
Induziert	5	5	7	2
Reprimiert	13	14	32	32
Insgesamt	18	19	39	34

Im Anschluss wurden acht Spots für eine Identifizierung ausgewählt, die entweder eine stärkere Regulierung und/oder bei mehreren Behandlungsgruppen eine Dysregulation zeigten (Tabelle 11, Tabelle 21, Anhang). Schließlich wurden von sieben Proteinen die entsprechenden Primer nach den oben genannten Kriterien ausgewählt und dem bestehenden Array von 28 Transkripten hinzugefügt, wodurch dieses final 35 Transkripte umfasste. Das *major royal jelly protein* wurde dabei nicht berücksichtigt, da dieses nicht von der Larve selbst gebildet, sondern durch das Gelée royale aufgenommen wird.

Ergebnisse

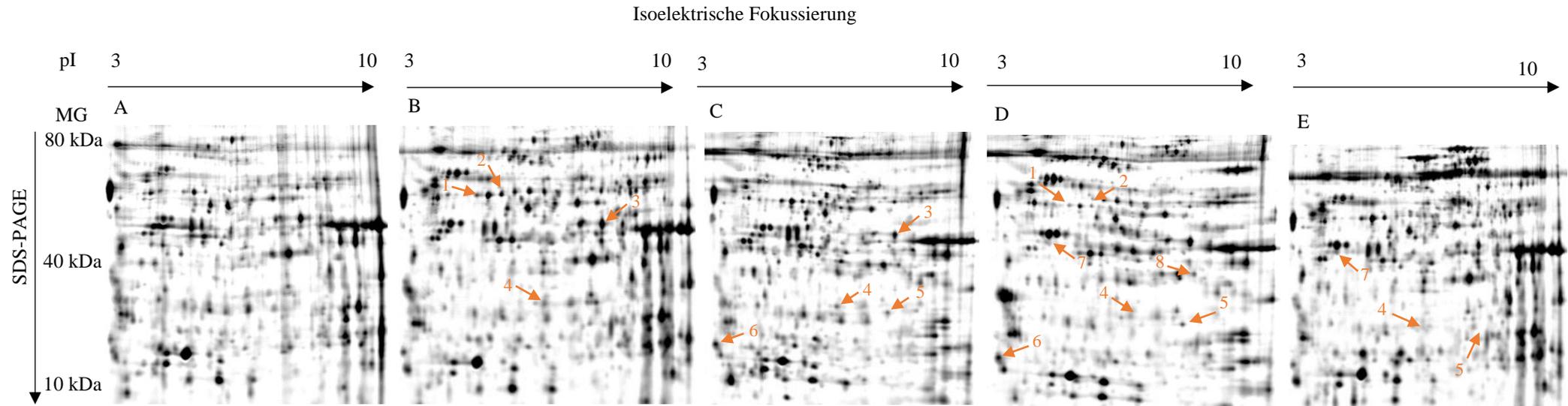


Abbildung 11: 2D-Karten der Proteinproben aus 2018. Protein-Karten von Larven an Tag 6 (D6, n = 4): A) Repräsentative Kontrolle, B) DM1, C) DM2, D) DM3 und E) Fe. Die Spots von differenziell regulierten Proteinen sind eingezeichnet (siehe Tabelle 11). MG = Molekulargewicht in kDa, pI = isoelektrischer Punkt.

Ergebnisse

Tabelle 11: Auflistung der identifizierten Proteine im Jahr 2018. Eine detailliertere Auflistung samt *Fold changes* und Signifikanzniveaus findet sich in Tabelle 21 (Anhang)

Spotnummer	Protein
1	Retinal Dehydrogenase
2	ATP Synthase beta
3	Acyl-CoA Dehydrogenase
4	<i>major royal jelly protein</i>
5	Protein I (2) 37Cc
6	14-3-3 protein zeta
7	3-Ketoacyl-CoA Thiolase
8	26SProteasom Untereinheit

2019

3.3 Transkriptomanalyse

3.3.1 Quantität und Qualität der RNA

In Bezug auf die Quantität und Qualität der isolierten RNA im Jahr 2019 sind die Ergebnisse mit denen aus dem Jahr zuvor vergleichbar. Es wurde ebenfalls wieder stichprobenartig die RNA-Integrität mittels des Agilent Technologies 2100 Bioanalyzers untersucht. Die Elektropherogramme zeigten ein deutliches 18S-Signal (Abbildung 12A). Eine rein optische Beurteilung der Elektropherogramme (Abbildung 12B-D) zeigte keine Anzeichen von Degradation.

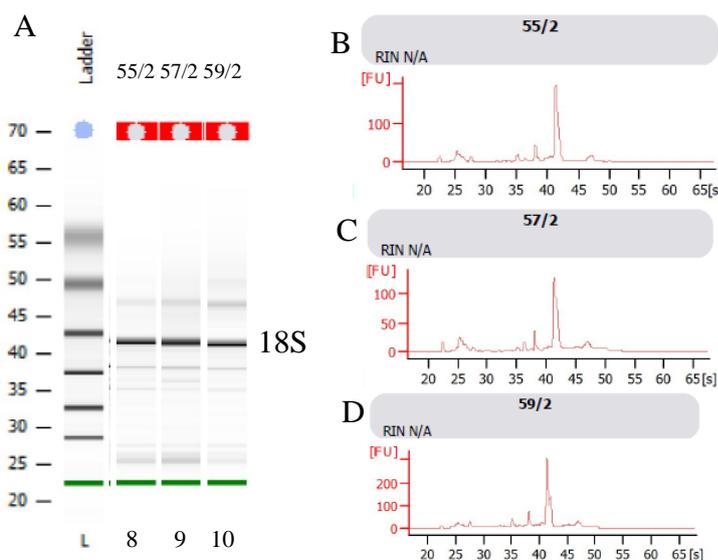


Abbildung 12: Elektrophorese-Daten ausgewählter Proben aus dem Jahr 2019.

A: Die Spalte L enthält den RNA-Standard aus dem Kit. Die Spalten 8, 9 und 10 repräsentieren larvale RNA-Proben (600 ng/ μ l). Die 18S-Bande ist kenntlich gemacht. B, C und D zeigen die Elektropherogramme der in A dargestellten Proben. Eine RIN konnte nicht ermittelt werden (N/A). Das starke Signal stellt die 18S rRNA dar.

3.3.2 RT-qPCR

3.1.2.1 Auswahl der Referenzgene

Die Berechnung erfolgte analog zu 2018. Da Chlorantraniliprol und Flupyradifuron einen deutlichen Einfluss auf die Genexpression zeigten, wurde die Analyse zusätzlich mit dem Programm Normfinder validiert.

Für die Normalisierung der RT-qPCR-Daten wurden bei Dimethoat und Fenoxycarb die Gene *enolase*, *gapdh* und *rpl13a* festgelegt. Bei der Ermittlung der am stabilsten exprimierten Gene für die Gruppen Flupyradifuron und Chlorantraniliprol wurden die Gene *gapdh*, *cox6c* und *ATP synthase beta* gewählt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Ergebnisse der Normalisierungs-Berechnung der Referenzgene durch geNorm und Normfinder. Es wurden n=3 C_t-Werte zur Berechnung verwendet

Behandlung	Referenzgen	Normalisierungs-Faktor	
		geNorm	Normfinder
Dimethoat Fenoxycarb	<i>enolase</i>	0,6	-
	<i>gapdh</i>	0,5	-
	<i>rpl13a</i>	1,3	-
Chlorantraniliprol Flupyradifuron	<i>cox6c</i>	0,4	0,2
	<i>ATP synthase beta</i>	0,5	0,1
	<i>gapdh</i>	0,3	0,1

3.1.2.2 Vergleichende Expressionsdaten

Um den Einfluss der verschiedenen Wirkstoffe auf die Larven zu untersuchen, wurden vergleichende Genexpressionsversuche zwischen den Tagen 4, 6 und 8 mittels RT-qPCR durchgeführt; pro Tag und Wirkstoff wurden sechs Larven analysiert. Die Auswertung aller drei Tage ergab insgesamt 95 Transkripte, die sich signifikant von der Kontrolle unterschieden (Tabelle 22, Anhang).

Für die weitere Auswertung wurden nur Transkripte betrachtet, die eine log₂ *Fold change* von mindestens 1,5 oder -1,5 zeigten. Es wurden 15 verschiedene Transkripte identifiziert, die sich zwischen den Behandlungsgruppen (n=6) und den Kontrollen (n=6) unterschieden.

An Tag 4 (D4, Abbildung 13A) zeigte sich eine signifikante Hochregulierung von *apisimin* in der Chlorantraniliprol-Gruppe (mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: 2,38, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 19,91, p = 0,04$).

Ergebnisse

An Tag 6 (D6, Abbildung 13B) stieg die Anzahl an differenziell exprimierten Genen. Larven, die mit 0,1 µg Dimethoat behandelt wurden, zeigten eine Reprimierung von *hr38* (*hormone receptor-like in 38*, mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: 1,6, one-way ANOVA $F_{(5,12)} = 0,444$, $p = 0,008$) und eine Induktion von *def1* (*defensin1*, mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: 2,32, one-way ANOVA $F_{(5,12)} = 8,61$, $p = 0,01$). Bei einer Behandlung von 0,2 µg Dimethoat war *toll* hochreguliert (mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: 1,55, one-way ANOVA $F_{(5,12)} = 5,95$, $p = 0,004$). Fenoxycarb-Behandlung führte zu einer erhöhten Expressierung von *tim8* (*translocase of inner membrane 8*, mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: 1,62, one-way ANOVA $F_{(5,12)} = 6,43$, $p = 0,0036$). Eine Exposition mit Chlorantraniliprol (mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: 3,43, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 27,33$, $p < 0,001$) und Flupyradifuron (mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: 3,27, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 27,33$, $p = 0,001$) führte zu einer stärkeren Expression von *hr4* (*hormone receptor 4*).

Die meisten Unterschiede fanden sich nach Tag 8 (D8, Abbildung 13C). *Def1* zeigte die höchste Reprimierung nach Exposition mit Flupyradifuron (mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: -7,97, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 31,96$, $p = 0,0033$) und Chlorantraniliprol (mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: -4,64, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 31,96$, $p = 0,034$). Weiterhin führte der Futterzusatz von Flupyradifuron (mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: -3,06, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 32,69$, $p < 0,001$) und Chlorantraniliprol (mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: -1,74, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 32,69$, $p < 0,001$) zu einer verringerten Expression von *e75* (*ecdysone-inducible protein 75*). Das Gen *proclotting enzyme* (*proc enz*), das mit dem Immunsystem assoziiert ist, war in den Behandlungs-Gruppen Flupyradifuron (mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: -2,18, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 7,83$, $p = 0,003$) und 0,05 µg Dimethoat (mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: -1,74, one-way ANOVA $F_{(5,12)} = 0,164$, $p = 0,0011$) reprimiert. Flupyradifuron führte auch zur Herabregulierung der Autophagie-assoziierten Gene *atg6* (*autophagy-related gene 6*, mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: -2,94, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 17,41$, $p < 0,001$) und *gabapap* (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*, mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: -1,89, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 18,81$, $p < 0,001$). Zusätzlich folgte der Exposition mit Flupyradifuron eine differenzielle Regulierung von *26S protease regulatory subunit 10B* (*pro reg*, mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: -1,64, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 40,38$, $p < 0,001$) und *3-ketoacyl-CoA thiolase* (*CoA thio*, mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: 3,12, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 21,6$, $p = 0,021$). Das Zielgen *14-3-3 protein zeta* war ebenfalls nach Zugabe von Flupyradifuron (mittleres log₂ Verhältnis zur Kontrolle: -1,89, one-way ANOVA $F_{(3,8)} = 13,12$, $p = 0,001$) herunterreguliert.

Ergebnisse

Nach Exposition mit 0,05 µg Dimethoat war das Gen *antp* (*antennapedia*) hochreguliert (mittleres \log_2 Verhältnis zur Kontrolle: 1,64, one-way ANOVA $F_{(5,12)} = 3,54$, $p = 0,007$). Nach Anwendung von 0,1 µg Dimethoat kam es zu einer Induktion von *acetylcholinesterase2* (*ache2*, mittleres \log_2 Verhältnis zur Kontrolle: 1,58, one-way ANOVA $F_{(5,12)} = 0,829$, $p = 0,04$).

Aus Abbildung 13 ist ersichtlich, dass mit zunehmender Zeit und damit verbunden auch einer zunehmenden Dosis an aufgenommenem Wirkstoff die Anzahl an differenziell exprimierten Transkripten zunimmt. Der Einfluss der Insektizid-Wirkstoffe kann ebenfalls bei Betrachtung einzelner Transkripte im Verlauf der Beobachtungszeit dargestellt werden. In Abbildung 14 sind drei Transkripte aus den bereits angesprochenen Signalwegen dargestellt. Das in Folge des Toll-Signalweges aktivierte Transkript *defl* zeigt an D4 noch keinen signifikanten Unterschied, allerdings ist nach Dimethoatexposition die Tendenz einer erhöhten Expression zu erkennen. Diese Induktion ist dann an D6 ersichtlich. An D8 ist dieser Expressionsunterschied nicht mehr vorhanden, allerdings liegen auch an diesem Tag die einzelnen Werte tendenziell über der Kontrollgruppe (Abbildung 14A). In Abbildung 14B ist der zeitliche Verlauf von *hr4* aus der Ecdyson-induzierenden Kaskade dargestellt. Bereits an D4 zeigt sich nach der Flupyradifuron-Intoxikation eine signifikant erhöhte Expression, die entsprechende \log_2 *Fold change* liegt allerdings bei 1,24 und wurde daher nicht in der weiteren Analyse betrachtet. An D6 steigt die Expression weiter an und sinkt im Anschluss an D8 in etwa auf das Niveau der Lösungsmittel-Kontrolle. Bei genauerer Betrachtung fällt jedoch auf, dass der Unterschied zwischen den Gruppen bei $p = 0,07$ liegt und damit leicht oberhalb der Signifikanzgrenze. Im weiteren Verlauf wäre daher eine reprimierte Expression möglich.

Aus der Autophagie-Signalkette ist das Transkript *gabarap* nach Flupyradifuron-Fütterung abgebildet (Abbildung 14C). An den Tagen D4 und D6 zeigt sich kein signifikanter Unterschied, wobei man an D6 eine leicht verringerte Transkription vermuten könnte. Diese reprimierte Expression bestätigt sich an D8. Die Streudiagramme der weiteren Transkripte finden sich in Abbildung 18 (Anhang).

Ergebnisse

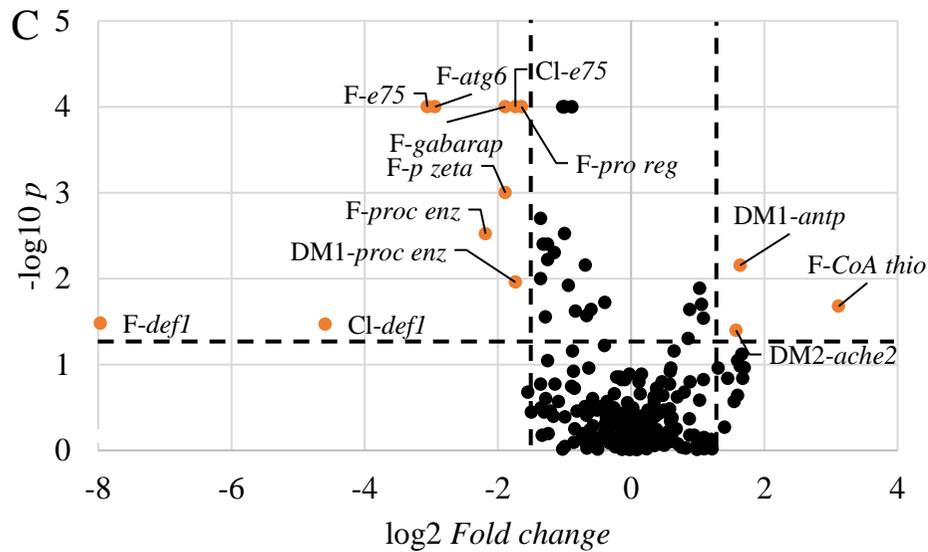
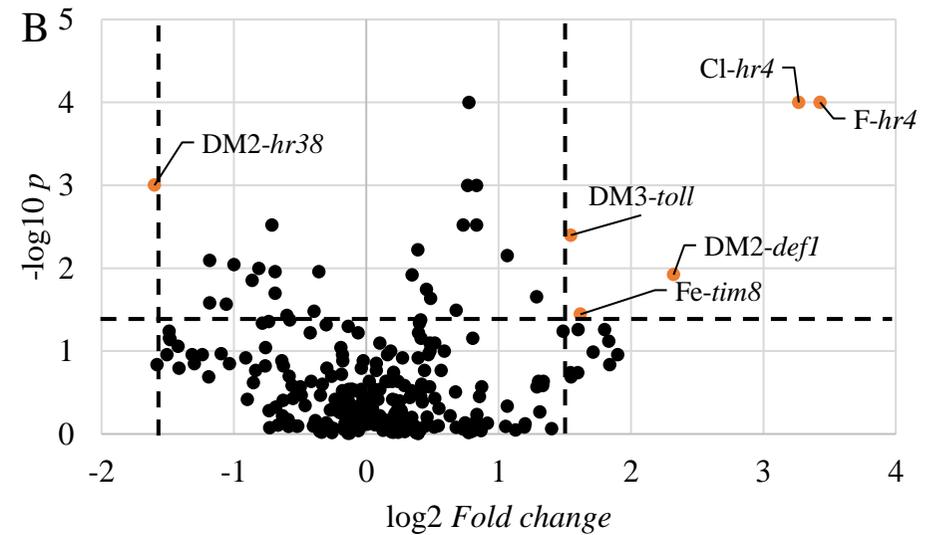
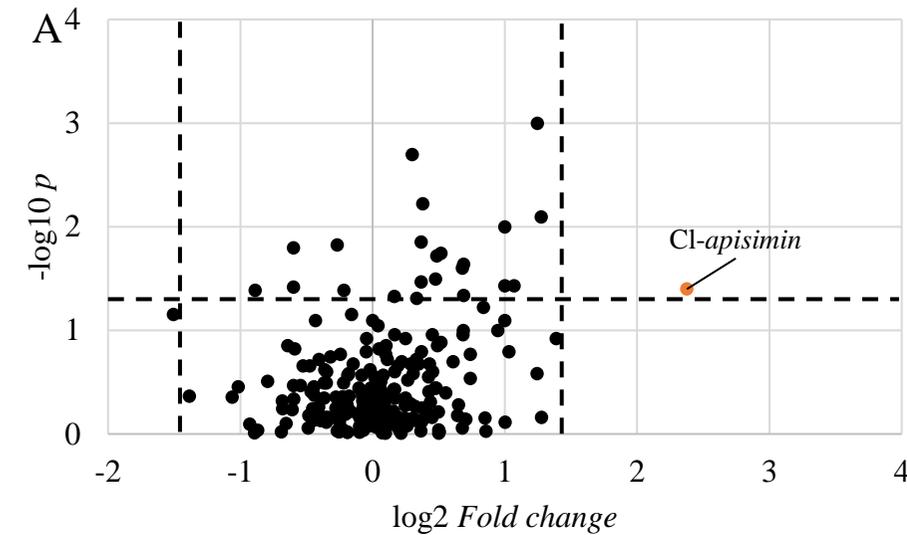


Abbildung 13: Darstellung der Expressionsdaten 2019. Darstellung in einem doppelt logarithmischen Diagramm ($n=6$) von den Tagen 4 (A), 6 (B) und 8 (C). Eingezeichnet ist die Signifikanz von 0,05 als negativer dekadischer Logarithmus ($\sim 1,3$) und der Grenzwert der $\log_2 \text{Fold change}$ von -1,5 bzw. 1,5. Die Transkripte sind benannt und mit dem Kürzel der chemischen Substanz versehen (F = Flupyradifuron, Fe = Fenoxycarb, DM1 = 0,05 μg Dimethoat, DM2 = 0,1 μg Dimethoat, DM3=0,2 μg Dimethoat, Cl = Chlorantraniliprol).

Ergebnisse

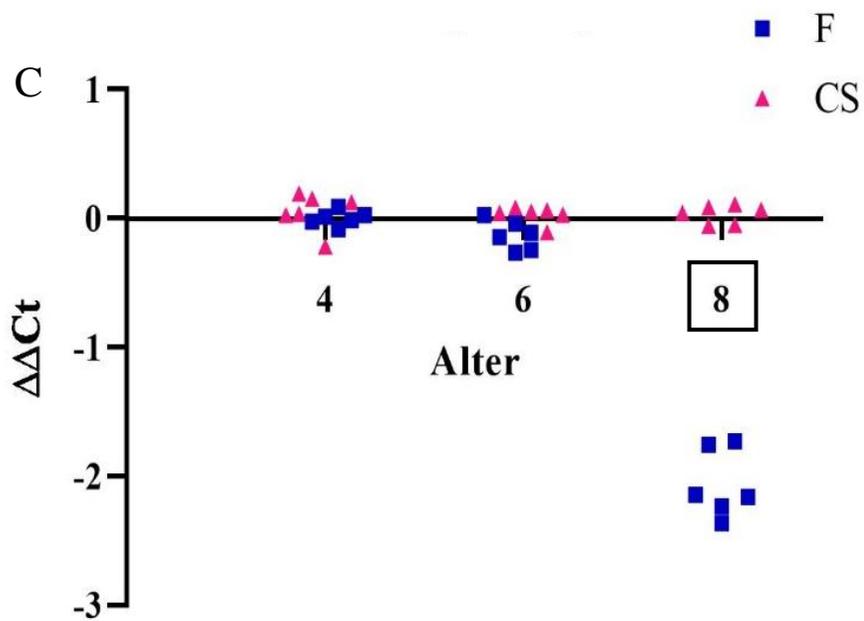
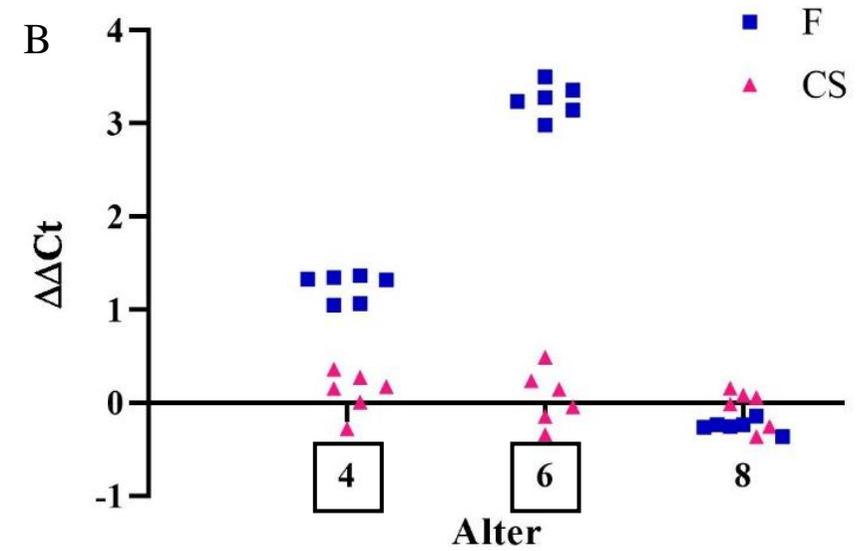
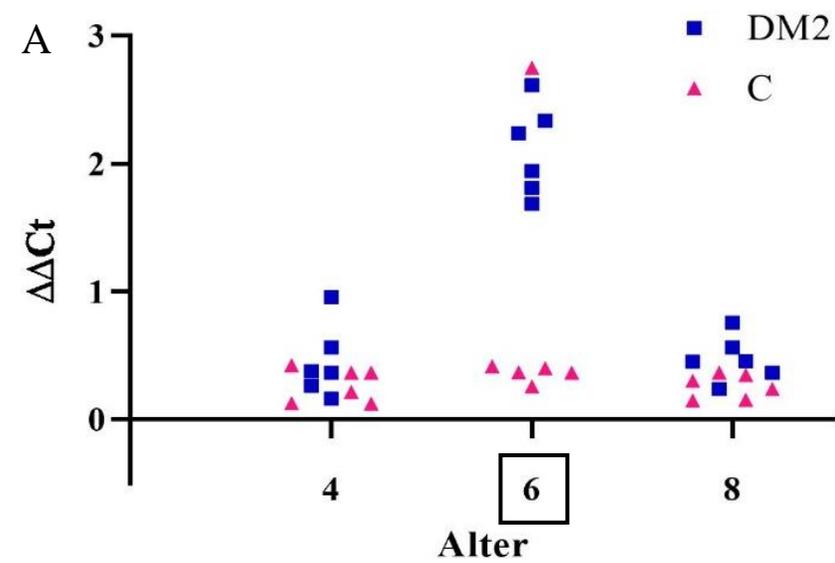


Abbildung 14: Streudiagramme der $\Delta\Delta C_t$ -Werte ausgewählter Transkripte in Abhängigkeit vom Alter. Die verwendeten Symbole beziehen sich auf die entsprechenden Probengruppen. Bei den Transkripten handelt es sich um jeweils einen Vertreter aus den drei angesprochenen Signalwegen. Im Detail sind dies *defl* aus dem Toll-Signalweg (A), *hr4* aus der Ecdyson-induzierenden Kaskade (B) und *gabarap* in der Autophagie-Signalkette. Tage mit signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen sind markiert.

3.4 Proteinanalyse

3.4.1 Quantität der isolierten Proteine

Im Jahr 2019 wurden bei den Dimethoat/Fenoxycarb-Proben im Mittel 3,27 µg/µl und bei den Flupyradifuron-Proben 3,15 µg/µl Protein isoliert.

3.4.2 2D-Gelelektrophorese

Es wurden Proteinproben nach Dimethoat- und Fenoxycarb-Exposition nach Tag 6 (D6, n=4) ausgewertet (Abbildung 15, Tabelle 13). Dazu wurde jeweils ein Protein-Pool aus behandelten Larven (n=4) gegen einen Kontroll-Pool (n=4) in der 2D-PAGE aufgetrennt und insgesamt 1031 Proteine von der Software detektiert. Die Auswahl der Spots erfolgte nach den gleichen Kriterien wie im Jahr 2018. Nach der händischen Beurteilung verblieben 68 Kandidatenproteine. Die Anzahl an induzierten und reprimierten Proteinen ist Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Anzahl an reprimierten und induzierten Kandidatenproteinen im Jahr 2019

	DM1	DM2	DM3	Fe
Induziert	1	15	19	6
Reprimiert	1	21	30	27
Insgesamt	2	36	49	33

Wie im Vorjahr wurden Proteinspots für eine Identifizierung ausgewählt. In diesem Fall wurden zwei Spots ausgesucht, die in Bezug auf die Dimethoat-Konzentrationen eine zeitabhängige Dysregulierung zeigten. Dabei handelte es sich um Enolase und die Glutathion-S-Transferase (Tabelle 14, Tabelle 23, Anhang).

Es hat sich gezeigt, dass die Gele von Dimethoat und Fenoxycarb aus den Jahren 2018 und 2019 zum Großteil eine gute Vergleichbarkeit aufwiesen (Abbildung 15). Aus diesem Grund fand eine zusätzliche Auswertung mit den Daten aus beiden Jahren statt (n=8). Ebenso hat sich bei der Transkript-Analyse gezeigt, dass Flupyradifuron an D8 zu den meisten Änderungen führte. Daher wurde ein Pool dieser Behandlungsgruppe (n=4) gegen den entsprechenden Kontroll-Pool (n=4) gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Ergebnisse

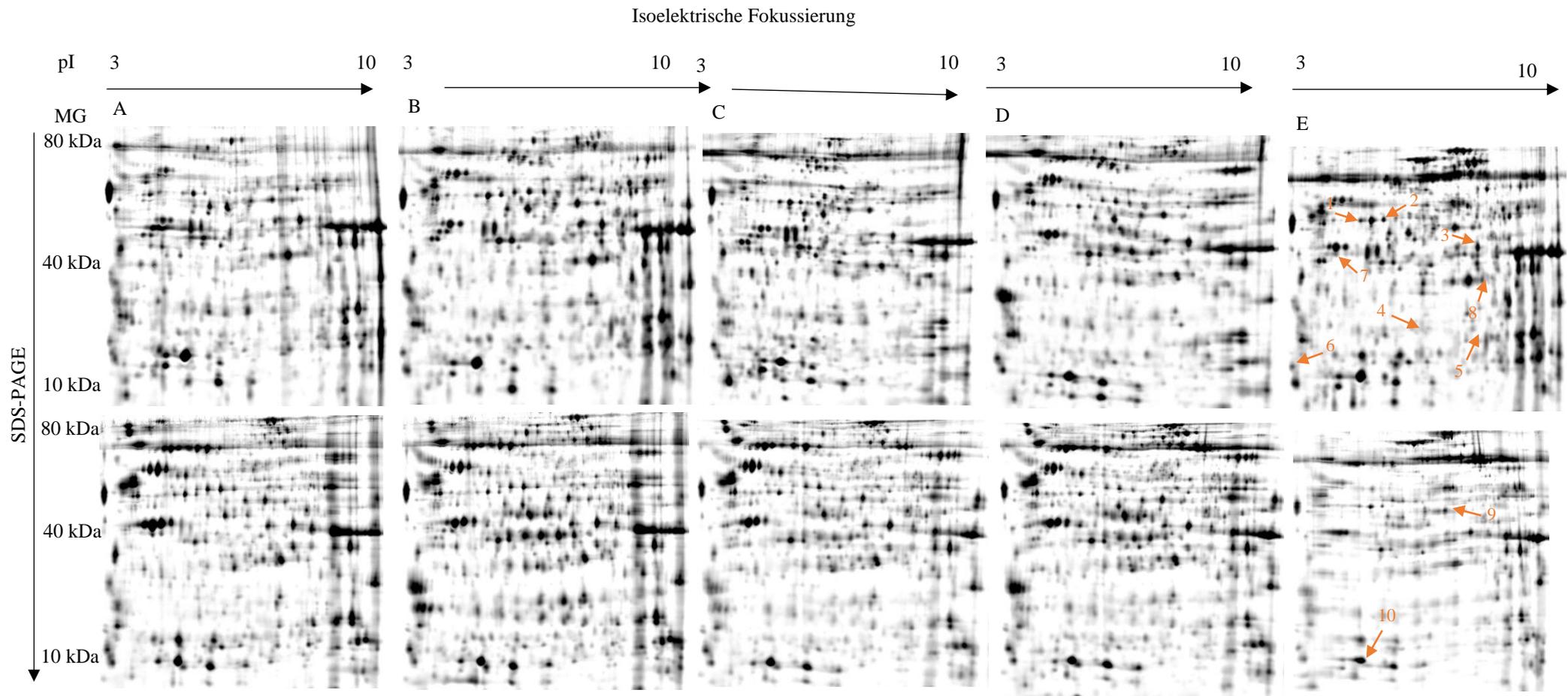


Abbildung 15: Gegenüberstellung der 2D-Gelbilder aus 2018 und 2019. Vergleich der Behandlungsgruppen DM1 (B), DM2 (C), DM3 (D) und Fe (E) aus den Jahren 2018 (oben) und 2019 (unten). Bei (A) handelt es sich um eine repräsentative Kontrolle. Auf dem letzten Gelbild sind die im entsprechenden Jahr identifizierten Proteine markiert (Tabelle 14).

Ergebnisse

Tabelle 14: Auflistung aller identifizierten Proteine in den Jahren 2018 und 2019

Spotnummer	Protein
1	Retinal Dehydrogenase
2	ATP Synthase beta
3	Acyl-CoA Dehydrogenase
4	<i>major royal jelly protein</i>
5	Protein I (2) 37Cc
6	14-3-3 Protein zeta
7	3-Ketoacyl-CoA Thiolase
8	26S Proteasom Untereinheit
9	Enolase
10	Glutathion-S-Transferase

Bei der Dimethoat- und Fenoxycarb-Behandlung wurden insgesamt 983 Proteine von der Software detektiert. Nach Anwendung der bereits erwähnten Selektionskriterien ergaben sich 94 Kandidatenproteine. An D8 nach Exposition mit Flupyradifuron wurden 951 Proteine von der Software identifiziert. Es ergaben sich schließlich 149 Kandidatenproteine. Eine Auflistung der hoch- und herunterregulierten Proteine findet sich in Tabelle 15.

Tabelle 15: Auflistung der induzierten und reprimierten Proteine aus der gemeinsamen Auswertung der Jahre 2018 und 2019 (n=8). Zusätzlich wurden Larven nach Flupyradifuron-Behandlung analysiert (n=4)

	DM1	DM2	DM3	Fe	F
Induziert	8	28	45	6	22
Reprimiert	3	7	26	13	107
Insgesamt	11	35	71	19	129

Von den zehn im Vorfeld identifizierten Proteinen konnten signifikante Dysregulierungen von fünf Proteinspots bestätigt werden (Abbildung 16, Tabelle 16). Die Gruppen DM1 und DM2 wiesen keine signifikanten Unterschiede bei den bekannten Proteinen auf (Tabelle 24, Anhang). Vier der identifizierten Proteine waren in Larven herunterreguliert, die mit 0,2 µg Dimethoat gefüttert wurden. Drei von diesen Proteinen sind Enzyme: Retinal Dehydrogenase 1 (mittlere *Fold change* zur Kontrolle: -1,60, $p = 0,02$), 3-Ketoacyl CoA Thiolase (mittlere *Fold change* zur Kontrolle: -1,68, $p = 0,02$) und Glutathion-S-Transferase (mittlere *Fold change* zur Kontrolle: -1,57, $p < 0,001$). Außerdem war das *major royal jelly protein 2* reprimiert (mittlere

Ergebnisse

Fold change zur Kontrolle: -2,11, $p = 0,02$). Dieses Protein war in Gruppen nach Fenoxycarb-Exposition ebenfalls herunterreguliert (mittlere *Fold change* zur Kontrolle: -4,10, $p < 0,001$). An Tag 8 (D8) nach einer Behandlung mit Flypyradifuron war das Enzym Retinal Dehydrogenase 1 hochreguliert (mittlere *Fold change* zur Kontrolle: +1,80, $p < 0,001$) und die 3-Ketoacyl-CoA Thiolase herunterreguliert (mittlere *Fold change* zur Kontrolle: -16,0, $p = 0,009$). Des Weiteren waren das *major royal jelly protein 2* (mittlere *Fold change* zur Kontrolle: -31,0, $p < 0,001$) und 14-3-3 Protein zeta (mittlere *Fold change* zur Kontrolle: -1,60, $p = 0,01$) reprimiert.

Ergebnisse

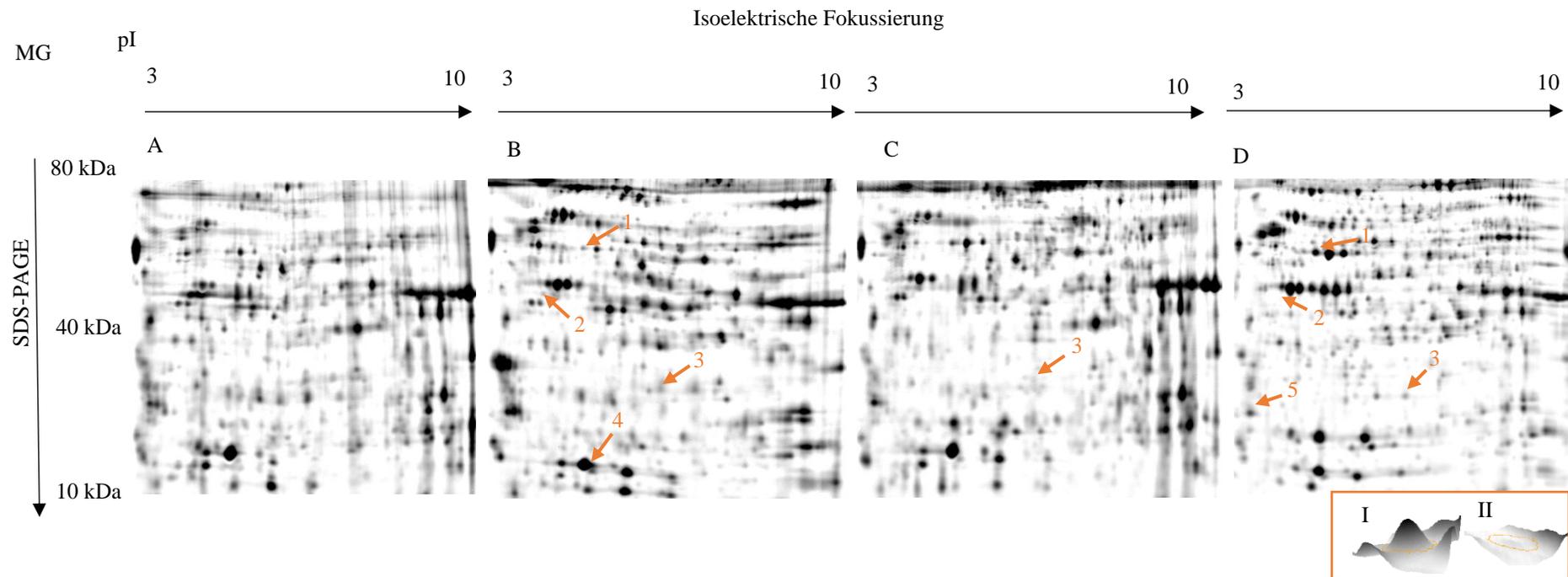


Abbildung 16: 2D-Karten des gemeinsamen Vergleichs im Jahr 2019. Protein-Karten von Larven nach Exposition mit 0,2 µg Dimethoat (B) und Fenoxycarb (C) an Tag 6 (n=8) und mit Flupyradifuron (D) an Tag 8 (n=4). (A) ist eine repräsentative Kontrolle. Die Spots von differenziell regulierten Proteinen sind eingezeichnet (siehe Tabelle 16). MG = Molekulargewicht in kDa, pI = isoelektrischer Punkt. **Inlay:** 3D-Profile der 3-Ketoacyl CoA Thiolase in der Lösungsmittel-Kontrolle (I) und nach Exposition mit Flupyradifuron (II).

Tabelle 16: Spot-Nummern und assoziierte Proteine der 2D-Gelelektrophorese

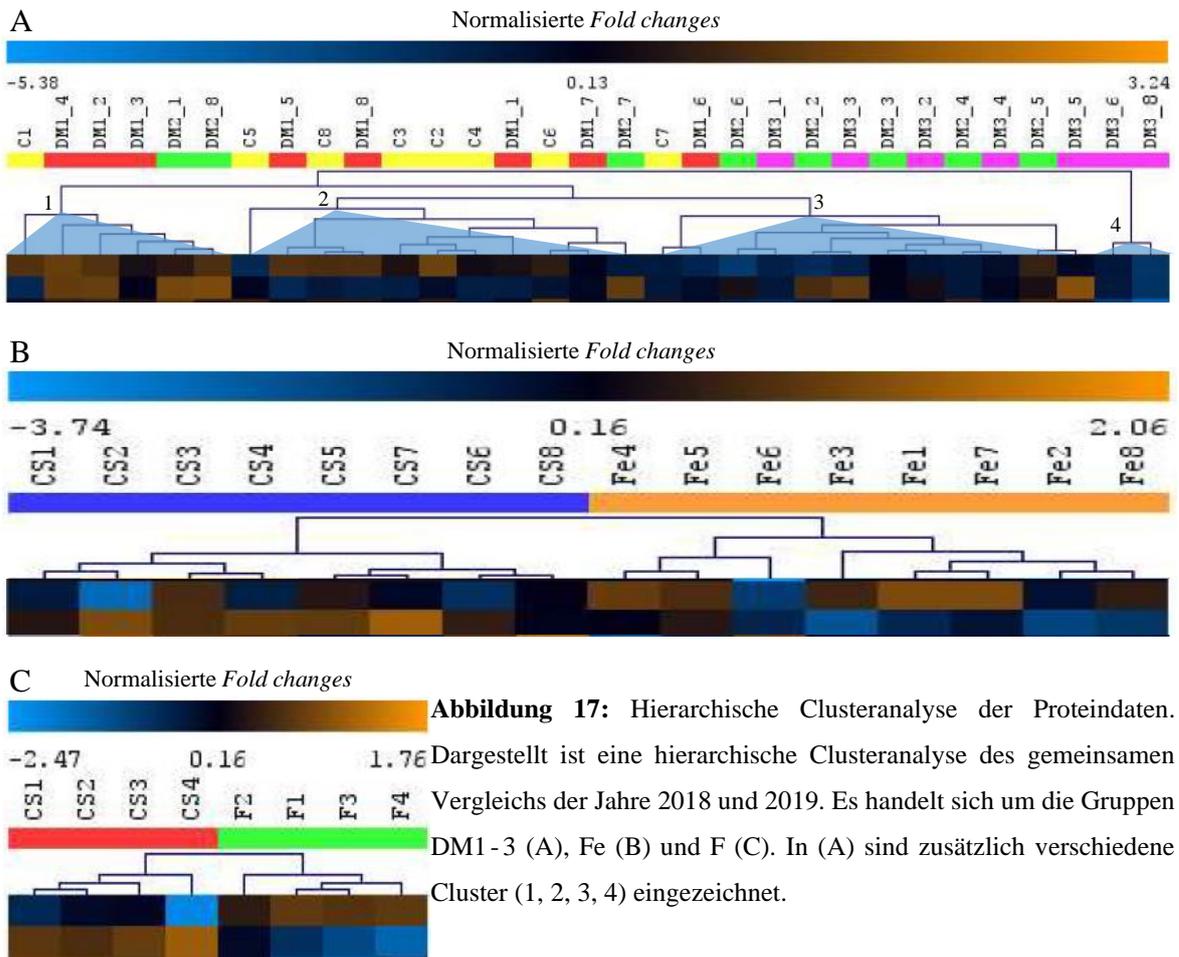
Spot-Nummer	Protein
1	Retinal Dehydrogenase 1
2	3-Ketoacyl CoA Thiolase
3	<i>major royal jelly protein 2</i>
4	Glutathion-S-Transferase
5	14-3-3 Protein zeta

3.4.3 Hierarchische Clusteranalyse der Proteindaten

Die unterschiedlich starken Einflüsse der Insektizid-Wirkstoffe auf die Larven lassen sich auch anhand einer hierarchischen Clusteranalyse der 2D-Gele veranschaulichen (Abbildung 17). Bei den Dimethoat-Behandlungen (Abbildung 17A) lassen sich vier Cluster identifizieren. Die Cluster 1 und 2 bestehen dabei zum Großteil aus der Kontrolle (C) und der niedrigsten Dimethoatkonzentration (DM1). Die Cluster 3 und 4 beinhalten alle Gele aus der Gruppe DM3 und die meisten Gele aus der Gruppe DM2.

Deutlicher wird die Trennung bei Fenoxycarb (Abbildung 17B) und Flupyradifuron (Abbildung 17C). Bei diesen bilden die Lösungsmittel-Kontrolle (CS) und die Behandlungsgruppen (Fe, F) getrennte Cluster. Vor allem bei den Gruppen Fe und F veranschaulicht dies die differenzielle Proteinbiosynthese zwischen den Gruppen. Bei Dimethoat wird dies insbesondere zwischen der Kontrolle und der höchsten Konzentration (DM3) deutlich.

Ergebnisse



Ergebnisse

3.5 Etablierung eines Genarrays zur Beurteilung einer Insektizidintoxikation

Durch die vorliegenden Ergebnisse ist es möglich, ein spezifisches Genarray aus den dysregulierten Transkripten zu erstellen (Tabelle 17). Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass diese 15 Zielgene die stärkste Regulation nach Insektizidapplikation zeigten. Zur Normalisierung der Daten stehen fünf Referenzgene zur Verfügung.

Tabelle 17: Auflistung des etablierten Genarrays nach Insektizidapplikation

Gen	Kategorie	Dysregulierung	Signalweg
<i>atg6</i>	Autophagie	F	Autophagie
<i>gabarap</i>	Autophagie	F	Autophagie
<i>pro reg</i>	Enzym	F	Ubiquitin-Proteasom-System
<i>Coa thio</i>	Enzym	F	Beta-Oxidation
<i>ache2</i>	Detoxifikation	DM2	Cholinerge Signalübertragung
<i>hr38</i>	Entwicklung	DM2	Ecdyson-induzierte Kaskade
<i>hr4</i>	Entwicklung	Cl, F	Ecdyson-induzierte Kaskade
<i>e75</i>	Entwicklung	F, Cl	Ecdyson-induzierte Kaskade
<i>antp</i>	Entwicklung	DM1	Homöobox-Signalwege
<i>p zeta</i>	Entwicklung	F	Ras/Raf-Signalweg
<i>tim8</i>	Mitochondrialer Membrantransport	Fe	TIM22-Import-Signalweg
<i>proc enz</i>	Immunsystem	DM3, F	Koagulation
<i>apisimin</i>	Immunsystem	Cl	Toll
<i>toll</i>	Immunsystem	DM3	Toll
<i>defl</i>	Immunsystem	DM2, Cl, F	Toll
<i>enolase</i>	Referenzgen		
<i>gapdh</i>	Referenzgen		
<i>rpl13a</i>	Referenzgen		
<i>ATP synthase beta</i>	Referenzgen		
<i>cox6c</i>	Referenzgen		

4. DISKUSSION

Da die Daten aus 2018 vor allem als Grundlage der finalen Experimente im Jahr 2019 dienten, werden im Folgenden die Resultate aus der Datenerhebung 2019 besprochen.

4.1 Transkriptomanalyse

4.1.1 Quantität und Qualität der RNA

Die Menge an isolierter RNA aus den eingesetzten Honigbienenlarven war für die nachfolgenden Analysen ausreichend ($> 1 \mu\text{g}$). Die optische Dichte bei 260/230 bzw. 260/280 lag zwischen 1,8 und 2,2 und damit im Bereich einer ausreichenden RNA-Qualität (Barbas et al. 2007, Krebs et al. 2009). Die ermittelten Werte für die RIN entsprechen nicht den in der Literatur angegebenen Kriterien für Säugetiere (Cui et al. 2011). Die elektrophoretischen rRNA Profile von Insekten und Säugern unterscheiden sich deutlich. So treten bei Säugern zwei charakteristische Banden der 18S und 28S rRNA auf. Bei Insekten besteht die 28S rRNA aus zwei Fragmenten, die durch Wasserstoffbrücken verbunden sind. Durch die bei der Vorbehandlung auftretende Denaturierung und die Elektrophorese werden diese schwachen Bindungen gelöst und es entstehen zwei Fragmente ähnlicher Größe. Diese migrieren eng mit der 18S rRNA und folglich erscheint nur eine Bande im Elektropherogramm (Winnebeck et al. 2010). Da die RIN in diesem Fall nicht aussagekräftig ist, wurde zur Evaluierung der Qualität das Elektropherogramm optisch beurteilt.

4.1.2 Vergleichende Expressionsdaten

Die Analyse der RT-qPCR-Daten ergab 15 verschiedene Transkripte, die nach unseren engen Kriterien an den Tagen D4, D6 und D8 differenziell exprimiert wurden. Vier der Transkripte, namentlich *apisimin*, *toll*, *defl* und *prolotting enzyme* sind Teil des Immunsystems. Die Erstgenannten werden im Kontext des Toll-Signalweges erörtert. Das Proclotting Enzym (Proc.ENZ.) ist ein intrazelluläres Protease-Zymogen (Protease-Vorstufe). Die aktive Form, das Clotting Enzym, ist Teil des Gerinnungs-Systems der Hämolymphe (Nakamura et al. 1985). Gerinnung (Koagulation) in Insekten dient dazu, eine Blutung aus dem Exoskelett zu stoppen und offene Wunden zu schließen, um den Eintritt von Pathogenen durch das Gewebe zu verhindern (Theopold et al. 2014). Ein weiterer Bestandteil des Immunsystems ist die Prophenoloxidase-Kaskade, die letztlich zur Aktivierung von Phenoloxidase führt (Söderhäll und Cerenius 1998). Prophenoloxidase katalysiert ebenfalls die Produktion von Melanin (Lemaitre und Hoffmann 2007). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Intermediate des Melanisierungs-Prozesses Pathogene abtöten (Zhao et al. 2007). Außerdem konnte

Diskussion

nachgewiesen werden, dass die Prophenoloxidase Bestandteil des Gerinnungs-Systems ist (Karlsson et al. 2004). Daraus lässt sich schließen, dass die Koagulations-Kaskade in Arthropoden und die Prophenoloxidase-Aktivität miteinander verbunden sind und einen gemeinsamen Ursprung haben (Nagai und Kawabata 2000). Die in unseren Versuchen beobachtete Reprimierung von *proclotting enzyme* könnte ein weiterer Hinweis für die Beeinträchtigungen der Gerinnungs- und Phenoloxidase-Kaskade sein und die Immunantwort in Honigbienen schwächen.

Es konnten darüber hinaus differenziell exprimierte Gene identifiziert werden, die mit der larvalen Entwicklung assoziiert werden (*hr38*, *hr4*, *e75*, *antp*). In Honigbienen sind *hr38*, *hr4* und *e75* Teil des Ecdyson-Signalweges, der durch Foragieren (Sammelflüge) und neuronale Aktivität reguliert wird (Fujita et al. 2013, Singh et al. 2018). Die Expression findet meist in den Pilzkörpern statt, paarige anatomische Strukturen im Zentralhirn, die vor allem für die Verarbeitung integrativer Leistungen, wie z.B. Lernen und Erinnerung, zuständig sind (Yamazaki et al. 2006, Hourcade et al. 2010, Lutz und Robinson 2013). Erläuterungen zu den beobachteten Dysregulierungen erfolgen weiter unten.

Ein weiteres Transkript, das mit der Morphogenese assoziiert ist, ist das Homöobox-Gen *antp*. Bei mehrzelligen Tieren (Metazoa) werden die Körpersegmente während der Entwicklung durch eine spezielle Klasse an regulatorischen Genen festgelegt, den Homöobox (Hox)-Genen (McGinnis und Krumlauf 1992). Diese steuern die Anordnung der Segmente durch die Aktivierung von verschiedenen Genen, die für die Bildung der Körperregionen zuständig sind (Carroll 1995). Intensive Studien in *Drosophila* haben gezeigt, dass es zwei homöotische Genkomplexe gibt: Antennapedia und Bithorax (Lewis 1978, Kaufman et al. 1980). Das Antennapedia-Gen (*antp*) ist Bestandteil des Antennapedia-Komplexes und ist u.a. für die Entwicklung des zweiten Thorax-Segmentes verantwortlich (Struhl 1981, Wakimoto und Kaufman 1981, Schneuwly und Gehring 1985). Der induzierte Phänotyp weist eine Transformation der Antennen zu Beinen des zweiten Thorax-Segmentes auf, kann aber auch Teile des Kopfes in Thorax-Segmente umwandeln (Duncan und Lewis 1982). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Antp* anti-apoptotische Eigenschaften besitzt. Im zentralen Nervensystem von *Drosophila* zeigten apoptotische Neuronen eine geringe *Antp*-Konzentration, im Gegensatz dazu war die Konzentration bei nicht-apoptotischen Neuronen hoch. Eine Hochregulierung von *antp* führte zu einer Inhibierung von Apoptose (Rogulja-Ortmann et al. 2008). Der Wirkmechanismus von Organophosphaten basiert auf der Störung der Informationsweiterleitung im Nervensystem. Dabei wurde auch eine erhöhte Apoptoserate im Gehirn aufgezeigt (Slotkin und Seidler 2012, Arnal et al. 2019). Eine induzierte Expression von

Diskussion

antp könnte eine Gegenreaktion sein, um starken Schäden am zentralen Nervensystem entgegenzuwirken.

Nach Exposition von Larven mit Fenoxycarb an Tag 6 (D6) wurde ein Transkript aus der inneren mitochondrialen Membran induziert (*tim8*). Tim8 gehört zur Gruppe der "small Tim proteins", die beim Import von Proteinen in das Mitochondrium beteiligt sind (Dudek et al. 2013). Tim8 bildet dabei mit Tim13 einen hexameren Komplex im Intermembran-Raum und ist beim Transport von Proteinen zur inneren Membran assoziiert (Curran et al. 2002). Leuenberger et al. (1999) konnten zeigen, dass Tim8 und Tim13 unter optimalen Wachstumsbedingungen nicht essenziell für Hefen sind. Allerdings ist die Funktion dieses Komplexes unter sub-optimalen Bedingungen wichtig, wenn das Membranpotenzial verringert wird (Paschen et al. 2000). In unserer Studie könnte Fenoxycarb zu einem solchen stressinduzierten sub-optimalen Zustand führen, gleichwohl weitere Tim-Proteine in unserer Untersuchung keine veränderte Syntheserate zeigten. Es ist nicht bekannt, warum Tim8 und Tim13 nicht lebensnotwendig sind. Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass ein weiterer mitochondrialer Komplex (Tim9/Tim10) existiert, der ähnliche Aufgaben erfüllt und als wichtiger angesehen wird (Leuenberger et al. 1999, Paschen und Neupert 2001). Das humane homologe Protein von Tim8 ist DDP1. Mutationen von diesem Protein führen unter anderem zum Mohr-Tranebjaerg-Syndrom, einer neurodegenerativen Erkrankung (Koehler et al. 1999). Die Tatsache, dass mehrere Transportsysteme für ähnliche Proteine bestehen, lässt auf die Bedeutsamkeit der Innermembran-Proteine schließen und daher auf das Vorhandensein redundanter Mechanismen (Leuenberger et al. 1999).

Weitere Ergebnisse der Untersuchung zeigten, dass drei differenziell exprimierte Gene an Tag 8 (D8) nach Applikation von Flupyradifuron für spezifische Proteine bzw. Enzyme codieren: 14-3-3 Protein zeta, 26S Proteasom-regulatorische Untereinheit 10B und 3-Ketoacyl CoA Thiolase. Die 14-3-3 Proteinfamilie ist sehr stark konserviert und es finden sich verschiedene Vertreter in Hefen bis zum Menschen (Moore 1967, van Heusden et al. 1992, van Heusden et al. 1995). Bei Insekten kennt man zwei Isotypen: epsilon und zeta (Skoulakis und Davis 1998). In *Drosophila* führt bereits die Null-Mutation eines Isotypen zu einer stark erhöhten Letalität im Larvalstadium (Acevedo et al. 2007). Weiterhin sind Proteine dieser Gruppe an Prozessen der neuronalen Differenzierung (Chang und Rubin 1997, Kockel et al. 1997), Zellteilung und Zelltod (Dong et al. 2007) und Organentwicklung (Le et al. 2016) beteiligt. Es konnte ebenfalls eine Beteiligung bei der Phagozytose nachgewiesen werden, ein wichtiger Teil der Immunantwort in Insekten. Sie sind dabei für die Aufnahme von Bakterien und die Ausbildung des Phagosoms zuständig (Ulvila et al. 2011, Shandala et al. 2011, Trujillo-Ocampo et al. 2017).

Diskussion

Eine hohe Expression von 14-3-3-Genen zeigt sich sowohl in Säugern als auch in Invertebraten während der Entwicklung des zentralen Nervensystems (McConnell et al. 1995, Kockel et al. 1997). In diesem Zusammenhang konnte eine Beteiligung im Ras/Raf-Signalweg während der Bildung der Photorezeptoren bei *Drosophila* nachgewiesen werden. 14-3-3 Protein zeta ist dabei für die Aktivierung von Raf notwendig (Kockel et al. 1997). Der Einfluss auf die Neurophysiologie wird zudem durch eine Beteiligung am olfaktorischen Lernverhalten unterstützt (Skoulakis und Davis 1996). Diese Beobachtungen spiegeln die Beeinträchtigung von Flupyradifuron im Nervensystem wider. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reprimierung könnte entsprechend zu einer Störung der larvalen Entwicklung bzw. des Immunsystems führen. Ein weiteres Transkript war eine Untereinheit des 26S Proteasoms, was womöglich eine Herabregulierung der Protease an sich andeutet. Das 26S Proteasom ist ein großer enzymatischer Komplex im Zytosol und Nukleus eukaryontischer Zellen, in dem Proteine in Peptide und Aminosäuren abgebaut werden (Voges et al. 1999, Goldberg 2003). Zusätzlich ist das 26S Proteasom bei weiteren biologischen Prozessen involviert: Regulierung des Zellzyklus durch den Abbau von Cyclinen und cyclin-abhängigen Kinasen (Kaiser et al. 1999, Koepp et al. 1999), postembryonale Gewebsmodellierungen (Dawson et al. 1995, Löw et al. 1997) und sowohl bei der Induktion als auch Reprimierung des Zelltodes (Orlowski 1999, Grimm und Osborne 2000, Steller 2008). Insbesondere in Bezug auf die Metamorphose während der Individualentwicklung spielt programmierter Zelltod (Apoptose) eine wichtige Rolle. In der Motte *Manduca sexta* konnten Löw et al. (2001) zeigen, dass das 26S Proteasom in die Apoptose ventraler Muskelzellen involviert ist, die nicht länger im Imago benötigt werden. Die in unseren Experimenten beobachtete Reprimierung könnte daher eine verstärkte Ansammlung von Polypeptiden im Zytosol vorantreiben, was zur Aktivierung von zwei Prozessen führen kann: (1) Wenn es zu einem schnellen Anstieg an Proteinen kommt, wird Apoptose initiiert, z.B. durch die Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins P53; (2) wenn der Anstieg langsamer voranschreitet, werden sogenannte Hitzeschock-Proteine exprimiert, die einer unkontrollierten Akkumulierung entgegenwirken (Gabai et al. 1998). In der ebenfalls durchgeführten 2D-Gelelektrophorese konnten tatsächlich Hitzeschock-Proteine nachweisen, allerdings nur in geringen Quantitäten. Nichtsdestotrotz sind diese Beobachtungen ein Hinweis auf eine mögliche Schädigung der zellulären Abbauprozesse und einer entsprechenden Anhäufung von Proteinen im Zellinneren. In anderen Spezies kommt es in Folge von Proteasom-Dysfunktion und Proteinansammlungen zu neurodegenerativen Erkrankungen oder Apoptose (Kisselev und Goldberg 2001, Schmidt und Finley 2014).

Diskussion

Der mögliche Einfluss von Flupyradifuron auf die Zellphysiologie wird zudem durch die Herabregulierung von zwei weiteren Transkripten an Tag 8 (D8) unterstützt, die vor allem mit der Autophagie in Zusammenhang stehen: *atg6* und *gabarap*. Die Diskussion dieser Daten wird weiter unten fortgesetzt.

Beim Zielgen *3-ketoacyl CoA thiolase* zeigte sich eine Hochregulierung nach Flupyradifuron-Anwendung. Das assoziierte Enzym katalysiert den letzten Schritt der Beta-Oxidation im Fettsäure-Stoffwechsel (Uchida et al. 1992). Słowińska et al. (2019) erklärten eine Induktion dieser Thiolase mit einer erhöhten Syntheserate von Hexamerinen, die als Speicherproteine oder Aminosäurequelle dienen. Diese Annahme trifft in diesem Fall wahrscheinlich nicht zu, da alle untersuchten Hexamerine in der RT-qPCR keine Regulierung der mRNA aufwiesen. Der erhöhte Abbau von Lipiden könnte einen stärkeren Energieumsatz im larvalen Metabolismus indizieren, zumal Intermediate der Beta-Oxidation ebenfalls als Vorstufen in anderen Biosynthesewegen genutzt werden, z.B. zur Immunantwort oder Detoxifikation (Feyereisen 1999, Pearce und Pearce 2013, Akram 2014). Anhand dieser Annahmen könnte Flupyradifuron zu einem erhöhten Metabolismus führen, da verschiedene Mechanismen des Immunsystems und der Detoxifikation aktiviert werden (Ganeshan und Chawla 2014).

Das letzte differenziell exprimierte Transkript war *acetylcholinesterase2 (ache2)* an Tag 8 (D8) nach Anwendung von 0,1 µg Dimethoat. Acetylcholinesterase ist ein Schlüsselenzym im Nervensystem der Vertebraten und Invertebraten. In Vertebraten ist nur ein Locus bekannt; in den meisten Insekten, die Honigbiene eingeschlossen, wurden zwei Loci identifiziert (*ache1* codiert für AChE1, *ache2* codiert für AChE2, Kim et al. 2012, Kim und Lee 2013). Bei Vorhandensein von zwei Esterasen wird angenommen, dass ein Enzym vor allem die katalytischen Eigenschaften im zentralen Nervensystem zeigt, während das andere in weiteren physiologischen Prozessen exprimiert wird. In Hymenopteren wird *ache2* stärker exprimiert und als katalytische Hauptkomponente betrachtet (Shapira et al. 2001, Kim und Lee 2013). Aufgrund ihrer essenziellen Funktion in der cholinergen Weiterleitung sind Acetylcholinesterasen ein häufiger Angriffspunkt für Insektizide, z.B. Organophosphate wie Dimethoat (Casida und Durkin 2013). Sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten führen Vergiftungen durch AChE-Inhibitoren zum Verlust der Muskelkontrolle, Paralyse oder Schädigung innerer Organe (Miller und Kennedy 1972, Moser 1995, Patil und David 2010, Bhavan et al. 2011). Die Induktion in der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls von Williamson et al. (2013a) nach akuter Exposition von Insektiziden gezeigt werden. Es wird angenommen, dass eine verstärkte Expression eine physiologische Anpassung ist, um die Inhibierung zu kompensieren (Bass und Field 2011). Eine Hochregulierung nach akuter Exposition könnte

ebenfalls zu einer erhöhten cholinergen Übertragung und zu verbesserten Lern- und Gedächtnisleistungen führen (Shapira et al. 2001, Guez et al. 2010, Williamson et al. 2013b). Eine chronische Überexpression ist ein typischer Mechanismus, den man bei der Resistenzbildung gegenüber Organophosphaten beobachtet (Kwon et al. 2010, Shang et al. 2014). Die Induktion in der vorliegenden Auswertung ist vermutlich eine Gegenreaktion zur Inhibierung. Diese Beobachtung traf allerdings nicht bei Larven zu, die mit 0,2 µg Dimethoat behandelt wurden. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass die Expressionsprofile in dieser Behandlungsgruppe eine höhere Varianz ohne signifikanten Trend aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

4.1.3 Physiologische Signalwege

4.1.3.1 Toll-Signalweg

Wie bereits angesprochen, nimmt der Toll-Signalweg eine Schlüsselrolle bei der Immunantwort in Insekten ein. Eine weitere wichtige Komponente stellt die Imd-Signalkaskade dar (Evans et al. 2006a). Beide Signalwege führen bei Aktivierung zu einer erhöhten Expression von antimikrobiellen Peptiden (Viljakainen 2015). Ebenfalls haben beide Signalwege gemeinsam, dass die Pathogenabwehr über NF-κB-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird; bei Toll handelt es sich um Dorsal, bei Imd um Relish, die in den Zellkern transloziert werden und die Genexpression initiieren (Belvin und Anderson 1996, Georgel et al. 2001). Da in der vorliegenden Arbeit mehrere Faktoren der Toll-Signaltransduktion betroffen waren und Lourenço et al. (2018) zeigen konnten, dass *dorsal* die Expression von u.a. *defl* kontrolliert, wurde in diesem Fall angenommen, dass dieser Signalweg beeinflusst wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Toll nicht nur an der humoralen, sondern auch an der zellulären Immunantwort beteiligt ist. Zettervall et al. (2004) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine erhöhte Expression zu einer verstärkten Bildung von Lamelloyten führte, speziellen Hämozyten, die Pathogene mittels Verkapselung (*encapsulation*) bekämpfen. Weitere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Toll-Signalkaskade im Kontext mit anderen Signalwegen für die Proliferation und Dichte der Hämozyten eine entscheidende Rolle einnimmt (Sorrentino et al. 2004, Zettervall et al. 2004). Zudem konnten Bettencourt et al. (2004) bei Dorsal-Mutanten zeigen, dass die Phenoloxidase-Aktivität verringert war. Neben der Beteiligung an der Abwehr von diversen Mikroorganismen (Lemaitre et al. 1997), ist dieser Signalweg ebenfalls an der Embryogenese beteiligt. Durch einen Konzentrationsgradienten des Transkriptionsfaktors Dorsal wird die dorso-ventrale Achse des Embryos definiert (Chasan 1993). Dorsal führt dabei zur erhöhten Expression von ventral-

spezifischen Genen, während gleichzeitig dorsale Gene reprimiert werden und sich dadurch die dorso-ventrale Polarität ausbildet.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Insektizide verschiedene Signalwege beeinflussen, die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen erhöhen oder das Verhalten und die kognitiven Leistungen beeinträchtigen (Blacquiere et al. 2012, Müller 2018). Insbesondere der Einfluss auf das Immunsystem ist Gegenstand der Forschung (Desneux et al. 2007, Garrido et al. 2013). Nach Exposition von Neonicotinoiden konnten Di Prisco et al. (2013) zeigen, dass bei Arbeiterinnen die Expression eines NF- κ B-Inhibitors erhöht war und dadurch die Immunantwort gegenüber eines Virus verringert wurde. Weiterhin führten subletale Rückstände in Pollen und Wachs bei jungen Bienen zu einer erhöhten Immunsuppression (Pettis et al. 2012). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Expression von AMPs reprimiert wird (Aufauvre et al. 2014, Shi et al. 2017a, Tarek et al. 2018). Eine mögliche Ursache für diese Konsequenzen ist die Einflussnahme auf den Toll-Signalweg. Bei mehreren Insekten, u.a. auch der Honigbiene, konnte nachgewiesen werden, dass *toll* oder *toll*-ähnliche Rezeptoren durch Pestizide reprimiert werden (Fine et al. 2017, Zhang et al. 2017, Zhao et al. 2020).

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Wirkstoffgabe des Juvenilhormon-Analogons Fenoxycarb kein transkriptioneller Einfluss auf diese Signalkaskade nachgewiesen werden. In Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass Insektizide dieser Kategorie zu einer Repression von AMPs führten (Flatt et al. 2008). Bei *Bombyx mori* hingegen kam es zu einem Anstieg der AMP-Produktion nach Behandlung mit Juvenilhormon (Tian et al. 2010). Gründe für diese gegensätzlichen Ergebnisse werden im Fazit diskutiert. Dass es in den durchgeführten Experimenten zu keinen Änderungen kam, kann als Ursache haben, dass Fenoxycarb vor allem in der späteren Entwicklung aktiv wird und bei der eingesetzten Dosis zu einer hohen Puppenmortalität führen würde (Aupinel et al. 2007).

Bei den zwei höchsten Konzentrationen des Organophosphats Dimethoat konnten induzierte Änderungen von AMPs an Tag 6 (D6) detektiert werden. Dies widerspricht den Befunden in anderen Arbeiten (Gregorc et al. 2012, Di Prisco et al. 2013). In weiteren Organismengruppen konnte Folgendes festgestellt werden: Bei Mausmakrophagen zeigte sich die Beteiligung eines *toll*-ähnlichen Rezeptors nach Exposition eines Organophosphats an der Immunantwort (Pestka und Zhou 2006). Im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* erhöhte sich die Expression von AMPs nach Inkubation mit dem Organophosphat Dichlorvos (Lewis et al. 2013). Eine mögliche Einwirkung von Organophosphaten auf das Immunsystem von Honigbienen könnte über die Entstehung von Sauerstoff-Radikalen erklärt werden. In anderen Insekten induzierten

Diskussion

Organophosphate die Expression von verschiedenen Genen, die als Biomarker für oxidativen Stress gelten (Yu et al. 2011, Mandi et al. 2020). In *Drosophila* und der Mücke *Aedes aegypti* konnte der damit verbundene Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies mit der Aktivierung der Toll-Signalkaskade in Verbindung gebracht werden (Pan et al. 2012, Louradour et al. 2017). Die Applikation des Diamids Chlorantraniliprol führte an Tag 4 (D4) zu einer Induktion von *apisimin* und an Tag 8 (D8) zu einer Reprimierung von *defensin1*. Ein Vergleich mit Literaturdaten erweist sich als schwierig, da dieses Insektizid erst seit 2008 auf dem Markt ist (Jeanguenat 2013) und umfangreiche Transkriptom-Studien bei Honigbienen fehlen. In bisherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Chlorantraniliprol bei adulten Bienen bis 72 Stunden nach Exposition zu einer erhöhten Freisetzung von AMPs führte (Christen und Fent 2017). Bei der Motte *Mythimna separata* kam es 24 Stunden nach der Behandlung zu einer Reprimierung von *defensin* (Wang et al. 2018). Bei Heuschrecken konnten Jia et al. (2016) zeigen, dass nach Applikation des Diamids die Phenoxidase-Aktivität 24 Stunden später ein Maximum erreichte und sich in den folgenden Tagen verringerte. Da die Oxidase-Aktivität mit der erhöhten Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen assoziiert wird (Nappi et al. 2004), könnte dies auch zur Aktivierung des Toll-Signalweges führen (Louradour et al. 2017). Die erhöhte Produktion von Radikalen wird zudem dadurch unterstützt, dass Chlorantraniliprol beim Asiatischen Reisbohrer *Chilo suppressalis* für mindestens 48 Stunden die Aktivität des Antioxidants Glutathion-S-Transferase steigerte (Huang et al. 2011, Liu et al. 2016). Die genannten Arbeiten können teilweise die Beobachtungen in dieser Arbeit widerspiegeln, allerdings ist die Datenlage in Bezug auf Honigbienen spärlich und bedarf weiteren Untersuchungen.

Flupyradifuron führte an Tag 8 (D8) zu einer verringerten Expression von *defl*. Ebenfalls in Bezug auf dieses Insektizid ist ein umfassender Literaturvergleich schwierig, da es erst seit wenigen Jahren zugelassen ist (Jeschke et al. 2015). Bisherige Arbeiten umfassen Untersuchungen bzgl. der Mortalität, Physiologie, Lernleistung, Motorik oder Flugleistung (Tan et al. 2017, Tosi und Nieh 2019, Hesselbach und Scheiner 2019a, Hesselbach et al. 2019b). Unterschiede im Transkriptom zeigten u.a. die Induktion von *apisimin* und die Zunahme oxidativen Stresses (Al Naggar und Baer 2019, Chakrabarti et al. 2020). Dies legt eine Beteiligung der Toll-Kaskade nahe. Al Naggar und Paxton (2020) hingegen konnten nach Applikation von Flupyradifuron keine Änderung in der Expression eines Toll-Rezeptors feststellen, was möglicherweise mit der geringen Dosis in Zusammenhang steht. Weitere Ursachen für eine Reprimierung könnten Beeinträchtigungen in den AMP-produzierenden

Strukturen sein, dem Fettkörper (Bulet et al. 1999), den Hämocyten (Dimarcq et al. 1997) oder den Malphigischen Gefäßen (Gillespie et al. 1997).

4.1.3.2 Ecdyson-induzierte Kaskade

Essenzielle Taktgeber in der larvalen Entwicklung sind die Titer von Ecdyson und Juvenilhormon (Nijhout 1998). Ecdysteroide werden dabei in der Prothoraxdrüse, das Juvenilhormon in den paarigen Corpora allata synthetisiert (Riddiford 1994, Ou et al. 2016). Die in dieser Arbeit dysregulierten Gene *hr4*, *hr38* und *e75* codieren für sogenannte nukleäre Rezeptoren, an die Ecdysteroide binden und die Expression weiterer Gene initiieren (Bonneton und Laudet 2012). Diese Expressions-Hierarchie wird über das sogenannte Ashburner-Modell beschrieben (Ashburner und Richards 1976): Ecdyson, das an die jeweiligen Rezeptoren gebunden ist, initiiert die Hochregulierung von einigen wenigen Genen (*early genes*). Die gebildeten Proteine inhibieren ihre eigene Expression und führen gleichzeitig zur Induktion einer größeren Gen-Kaskade (*late genes*). Im Zuge der Ontogenese werden über diese Signalkette Prozesse der Neurogenese, Metamorphose, Segmentierung und Häutung gesteuert (King-Jones und Thummel 2005).

In Arthropoden konnte gezeigt werden, dass Juvenilhormon-Analoga und Organophosphate die Titer verschiedener Hormone, u.a. Ecdyson, beeinflussen und dadurch die Physiologie bzw. larvale Entwicklung stören (Cripe et al. 2003, Kodrík und Socha 2005, Tuberty und McKenney Jr 2005, Velki et al. 2011). Ähnliche Beobachtungen konnten mit Pyrethroiden und Organophosphaten bei Säugetieren gemacht werden (Rattner und Michael 1985, Pine et al. 2008, Du et al. 2010).

Im vorliegenden Versuchsdesign führte Fenoxycarb zu keiner differenziellen Regulierung der Ecdyson-Kaskade. Eine naheliegende Erklärung ist, dass sich die toxischen Eigenschaften erst mit Beginn der Metamorphose zeigen (Wilson 2004). An Tag 6 (D6) zeigte die höchste Dimethoat-Konzentration eine Reprimierung von *hr38*. Eine mögliche Erklärung könnte eine verringerte Produktion von Ecdyson sein. Bei Ratten konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene Organophosphate, darunter auch Dimethoat, die Plasmakonzentration an Steroiden senken. Grund hierfür waren Gewebeschäden an den Geschlechtsorganen (Afifi et al. 1991, Abd et al. 1994, Akbel et al. 2018). Bei *Bombyx mori* wurden nach Exposition mit dem Organophosphat Phoxim ebenfalls Gewebeschäden an der Seidendrüse beobachtet (Li et al. 2014). Neben einer direkten Schädigung der Produktionsorgane, ist auch ein Einfluss auf den Syntheseweg von Ecdyson möglich. Walsh et al. (2000) konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass Dimethoat die Expression von *StAR* reprimiert; StAR transferiert Cholesterol

Diskussion

zur Steroidgenese in die Mitochondrien. Eine weitere Erklärung liefern die Untersuchungen von Halme et al. (2010) zur Regulierung des prothorakotropen Hormons (PTTH). Bei Wildtypen von *D. melanogaster* kommt es während der larvalen Entwicklung zur schubweisen Expression von *ptth*, wodurch die Prothoraxdrüse Ecdyson sezerniert (Warren et al. 2006). Halme et al. (2010) konnten nun zeigen, dass Gewebeschäden an den Imaginalscheiben die Expression von *ptth* inhibieren und damit die Ecdyson-Ausschüttung retardiert wird. Dadurch wird die Larvalphase verlängert, um die Regeneration der histologischen Schäden zu unterstützen.

Chlorantraniliprol und Flupyradifuron induzierten an Tag 6 (D6) die Expression von *hr4* und führten an Tag 8 (D8) zu einer Repression von *e75*. Die erhöhte Expression könnte mit einer verstärkten Ecdyson-Ausschüttung in Verbindung stehen, wie sie auch bei He et al. (2019) auftrat. Diese stimulierende Wirkung einer schädlichen Substanz wird als Hormesis bezeichnet (Calabrese und Baldwin 2001). Das Prinzip der Hormesis kann bei allen Organismengruppen beobachtet werden, insbesondere auch beim Einsatz subletaler Insektizidkonzentrationen (Calabrese und Baldwin 1997, Ge et al. 2010, Zhang et al. 2017). Die Gründe für Hormesis sind noch Gegenstand der Diskussion (Stebbing 1997, Jager et al. 2013). Eine Hypothese geht von einer Austauschbeziehung (*trade-off*) aus: Aufgrund der physiologischen Kosten des Stressors kommt es zu einer Verschiebung der Ressourcennutzung im Organismus (Forbes 2000). So konnte bei Samenkäfern festgestellt werden, dass sich nach Insektizidexposition die Fertilität erhöhte, um die verringerte Lebensdauer zu kompensieren (Mallqui et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit könnte die subletale Dosis von Chlorantraniliprol bzw. Flupyradifuron zu physiologischen Beeinträchtigungen führen, wodurch es zu einer Stimulierung des Wachstums kommen kann und damit zu einem erhöhten Ecdysontiter. Eine mögliche Konsequenz wäre eine verringerte Lebensspanne der Adulttiere, wie sie in anderen Arbeiten nach Insektizidexposition im Larvenstadium auftrat (Sawby et al. 1992, Vasuki 1992, Tadei et al. 2019).

Die Reprimierung von *e75* könnte auf einen verringerten Ecdysontiter hinweisen (Meng et al. 2020) oder die Folge einer stimulierenden Wirkung der beiden Insektizide sein. So konnten Xu et al. (2017) bei der Motte *Chilo suppressalis* feststellen, dass die Synthese von Juvenilhormon nach Applikation von Chlorantraniliprol anstieg, ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen Insektengiften gemacht (Wang et al. 2005, Yu et al. 2007, Yu et al. 2010). Da das Juvenilhormon inhibierend auf den Ecdyson-Signalweg wirkt, könnte dies die Genexpression verringern. Eine weitere Möglichkeit wäre die bereits angesprochene inhibierte Expression von *ptth* durch Gewebeschäden (Halme et al. 2010) oder die Schädigung von Ecdyson-

sezernierenden Organen (Darvas et al. 1992, Yamazaki et al. 2011, Bindu et al. 2015). Es ist ebenso möglich, dass die Expression von *e75* auf Transkriptionsebene gestört wird. Hinweise darauf liefert die Reprimierung von *14-3-3 protein zeta* in den vorliegenden Daten. Kellner et al. (2012) konnten zeigen, dass 14-3-3 als Gerüstproteine (*scaffold proteins*) für verschiedene Transkriptionsfaktoren dienen, die an Promoter- und *Enhancer*-Regionen binden und damit die Transkription von Ecdyson-induzierten Genen steuern. Eine reprimierte Expression von *14-3-3* könnte dazu führen, dass die Stabilität der Transkriptions-Komplexe beeinträchtigt und die Expression von Zielgenen entsprechend verringert wird. Diese Störung des endokrinen Systems müsste zudem die Entwicklungszeit der Larven verlängern, was nach Insektizidgabe beobachtet werden konnte (Huang et al. 2016, Wang et al. 2017, Müller et al. 2019).

4.1.3.3 Autophagie-Signalweg

Autophagie ist ein Prozess, bei dem zelleigene Bestandteile abgebaut und verwertet werden. Autophagie wird vor allem in Perioden mit Nahrungsmangel induziert, um essenzielle Nährstoffe zu gewinnen. Der Abbau von verschiedenen Komponenten im Zytoplasma erfolgt in sogenannten Autophagolysosomen (Mizushima 2007). Die Bildung dieses Zellorganells wird durch diverse Autophagie-assoziierte Gene (*autophagy-related genes*, ATGs) kontrolliert (Suzuki und Ohsumi 2007). Das Autophagosom fusioniert dabei mit einem lysosomalen Kompartiment zu einem Komplex, in dem die hydrolytische Verdauung unter Freisetzung von Nährstoffen stattfindet (Xie und Klionsky 2007). Weiterhin wird Autophagie zur Bekämpfung von Bakterien und Viren genutzt und ist damit eine wichtige Komponente des Immunsystems (Shahnazari und Brumell 2011, Brutscher et al. 2015). Zudem induziert ein Anstieg des Ecdysontiters Autophagie im Fettkörper und anderen Geweben, um larvale Strukturen abzubauen und Ressourcen für die Bildung des Adulttieres bereitzustellen (Lee und Baehrecke 2001, Rusten et al. 2004).

Im hier untersuchten Versuchsdesign führte die Applikation von Fenoxycarb zu keiner differenziellen Regulierung beteiligter Gene, mögliche Gründe hierfür wurden bereits erläutert. Teilweise findet sich diese Beobachtung auch in Literaturdaten (Sass und Kovacs 1975). Ebenfalls führte Dimethoat zu keinen Unterschieden im Vergleich zur Kontrolle. In anderen Arbeiten finden sich Hinweise auf eine erhöhte Autophagie neuronalen Gewebes. Dies spiegelt auch den Wirkmechanismus wider, da Organophosphate die cholinerge Informationsweiterleitung stören (Song und Xie 2012, Singh et al. 2018, Liu et al. 2020). Auch bei Chlorantraniliprol kam es zu keinen transkriptionellen Änderungen in diesem Zusammenhang. Arbeiten an Säugerzellen kamen zu dem Schluss, dass intrazelluläres Calcium

Diskussion

eine wichtige Funktion bei der Informationsweiterleitung und Regulierung der Autophagie einnimmt (Decuyper et al. 2013, Bootman et al. 2018). Da der Wirkmechanismus von Chlorantraniliprol auf einem erhöhten Efflux von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum basiert, ist eine Modulation des Autophagie-Signalweges nicht auszuschließen. Einzig Flupyradifuron führte zu einer Herabregulierung von *atg6* und *gabarap*. ATG6 ist dabei im initialen Schritt der Autophagosom-Bildung beteiligt, während GABARAP für die Reifung des Autophagosom-Lysosom-Komplexes notwendig ist (Pattingre et al. 2008, Nguyen et al. 2016). Eine Ursache für die Reprimierung der Autophagie-Aktivität könnte die verhinderte Degradierung des cytosolischen Proteins p53 sein. Tasdemir et al. (2008) konnten zeigen, dass durch die Inhibierung des Proteasoms der Abbau von p53 verhindert wurde und die Autophagie-Initiierung nicht erfolgte. Dieser Effekt ist auf molekularer Ebene mit der Aktivierung der AMPK-abhängigen Inhibierung des mTOR-Signalweges verknüpft (Feng et al. 2005). Die reduzierte Expression einer Proteasom-Untereinheit konnte in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen werden. Diese Schlussfolgerung legt die Vermutung nahe, dass das Ubiquitin-Proteasom-System auch durch Flupyradifuron beeinflusst wird. In beiden Prozessen dient die Ubiquitinierung von zellulären Strukturen als Degradations-Signal (Ciechanover 2015). Eine weitere Verknüpfung besteht durch das Ubiquitin-ähnliche Protein ATG8 (Homolog zu GABARAP in niederen Eukaryonten). ATG8 ist zum einen bei der Regulierung der Proteasom-Aktivität, zum anderen bei der Bildung der Autophagosom-Membran beteiligt (Marshall et al. 2015, Zhao und Zhang 2019).

Ein anderer Grund für die Reprimierung von Autophagie ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der ebenfalls den Autophagie-Inhibitor mTOR hochreguliert (Djavaheri-Mergny et al. 2006). Weiterhin ist eine Störung der Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor STAT3 und der Protein-Kinase R möglich, z.B. durch eine Überexpression von STAT3. Solange STAT3 an die Kinase gebunden ist, kann diese keine weiteren Faktoren phosphorylieren, die die Autophagie-Kaskade initiieren (Shen et al. 2012). STAT3 ist Bestandteil des JAK/STAT-Signalweges, der auch an der Immunantwort beteiligt ist (Bang 2019). Eine weitere Zielstruktur von STAT3 ist Beclin1 (Säugetierhomolog von ATG6). STAT3 bindet dabei an die Promoterregion von *beclin1*, wodurch die Expression und Autophagie-Kaskade inhibiert werden (Miao et al. 2014). Eine Regulierung von Autophagie kann nicht nur prä-transkriptional erfolgen, sondern auch post-translational. Studien zeigen, dass Neonicotinoide, die einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Flupyradifuron haben, die Caspase-Aktivität erhöhen (Özdemir et al. 2018, Annabi et al. 2019). Verschiedene Caspasen sind in der Lage, Beclin1 zu spalten und damit Autophagie zu verhindern (Wirawan et al. 2010).

Ein weiterer Abbaumechanismus ist die bereits erwähnte Apoptose, der programmierte Tod einer einzelnen Zelle. Apoptose kann sowohl über extrazelluläre als auch intrazelluläre Signale ausgelöst werden (Saelens et al. 2004). In den vergangenen Jahrzehnten konnten diverse Mechanismen identifiziert werden, die in beiden Prozessen involviert sind. Hierzu gehören (1) verschiedene Signalwege, die regulierend wirken (Arico et al. 2001, Crighton et al. 2006), (2) Moleküle, die in beiden Vorgängen beteiligt sind (Erlich et al. 2007, Funderburk et al. 2010) oder ähnliche aktivierenden Stimuli (Xie et al. 2016). Ebenso ist Apoptose mit einer verstärkten Aktivierung von Caspasen assoziiert (Li und Yuan 2008). Die von Wirawan et al. (2010) gezeigte Spaltung von Beclin1 durch Caspasen führte nicht nur zur Inhibierung von Autophagie, sondern auch zu einer Migration eines der entstandenen Produkte zu den Mitochondrien. Dies induzierte die Freisetzung von mitochondrialen pro-apoptischen Faktoren. Dies lässt vermuten, dass die aufgezeigten Dysregulierungen nicht nur auf den Autophagie-Signalweg einwirken, sondern auch auf die Mechanismen der Apoptose.

4.2 Proteinanalyse

Nach Wirkstoff-Exposition mit Dimethoat und Fenoxycarb (D6) bzw. Flupyradifuron (D8) wurden Larven mittels 2D-PAGE auf ihre Proteinproduktion hin untersucht. Durch Peptid-Fingerprint wurden 10 Proteine identifiziert, von denen fünf in einer Gesamtauswertung bestätigt werden konnten. Eines davon war die Retinal Dehydrogenase I, die u.a. die Synthese von Retinoiden aus sekundären Pflanzenstoffen katalysiert. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Insektizide in vielen Organismen zu oxidativem Stress und den damit verbundenen Zell- und Gewebeschädigungen führen (Lukaszewicz-Hussain 2010). Sekundäre Pflanzenstoffe, wie z.B. Tocopherole und Carotinoide im Pollen, dienen als Schutz gegen freie Radikale und werden über die Ernährung der Bienen aufgenommen (Mărgăoan et al. 2014). Weiterhin fungieren Carotinoide als Vorstufen von Retinoiden. Die Umwandlung von Retinaldehyd zu Retinsäure findet über die Katalyse des Enzyms Retinal Dehydrogenase I statt (Helmer et al. 2015). In Vertebraten wurde Retinsäure intensiv untersucht, da sie wichtige Funktionen bei der Bildung der Extremitäten, des Sehapparates und der Neurogenese übernimmt (Williams und Bohnsack 2019). In Insekten besitzen Retinoide ebenfalls vielfältige Aufgaben; vom visuellen System bis zur Morphogenese (Carlson et al. 1967, Němec et al. 1993). Der Einsatz von Agrochemikalien kann den Metabolismus der Retinoide beeinträchtigen (Boily et al. 2004). Aufgrund der gemeinsamen Terpenoid-Struktur mit dem Juvenilhormon weisen Retinoide außerdem hormonelle Eigenschaften auf (Nakamura et al. 2007). Halme et al. (2010) konnten in diesem Zusammenhang herausfinden, dass es in *Drosophila* einen

Diskussion

Retinoid-abhängigen Signalweg gibt, der die Verpuppung durch Inhibierung der Ecdyson-Expression verzögert: In Wildtyp-Fliegen wird das Gen *ptth* nach dem letzten Larvenstadium hochreguliert, um die Verpuppung zu initiieren. Bei Gewebeschäden bewirkten Retinsäure oder andere Metabolite eine Inhibierung der *ptth*-Expression. Dies führte zu einer verlängerten Larvalphase und könnte die Regeneration von Gewebe unterstützen. Analoge Beobachtungen konnten bei Vertebraten gemacht werden (Maden und Hind 2003). Die Reprimierung eines essenziellen Enzyms in diesem Signalweg nach Exposition von 0,2 µg Dimethoat könnte die Interaktion von Retinoiden und *ptth*-Neuronen stören. Folglich würde es trotz auftretender Gewebeschäden zur Verpuppung kommen und die Regeneration unvollständig sein. Eine gegensätzliche Beobachtung lässt sich nach der Fütterung mit Flupyradifuron machen: Hier führte die Exposition zu einer Induktion dieses Enzyms. Das unterstützt die anfängliche Hypothese über die verlängerte Entwicklung zur Regeneration.

Ein weiteres identifiziertes Protein war die 3-Ketoacyl CoA Thiolase. Dieses Enzym katalysiert den letzten Schritt der mitochondrialen Beta-Oxidation und wurde bereits in 4.1.2 besprochen. Im Gegensatz zur Transkriptomanalyse zeigt das Protein eine verringerte Syntheserate. Scharlaken et al. (2007) machten nach Pathogen-Einfluss ebenfalls diese Beobachtung und folgerten daraus einen verringerten Fettsäure-Metabolismus. Eine Reprimierung der Thiolase nach Dimethoat- bzw. Flupyradifuron-Applikation könnte demnach die Bereitstellung von ATP und Intermediaten für andere biologischen Prozesse negativ beeinflussen. Aufgrund der vorliegenden Transkriptom-Daten ist eine Schädigung der Mitochondrien bzw. des mitochondrialen Transports anzunehmen. Dennoch scheinen die Ergebnisse widersprüchlich. Gegenläufige Entwicklungen von Genexpression und Proteinbildung sind nicht unüblich und wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Vogel und Marcotte 2012).

Ebenfalls reprimiert war das *major royal jelly protein 2* nach einer Behandlung mit 0,2 µg Dimethoat, Fenoxycarb und Flupyradifuron. Gelée royale wird von jungen Arbeiterinnen sekretiert (Ammenbienen), um die Larven während den ersten drei Tagen mit Nahrung zu versorgen (Snodgrass 1925). Königinnenlarven erhalten anschließend ausschließlich Gelée royale, während Arbeiterinnenlarven mit einer Mischung aus Gelée royale, Pollen und Honig gefüttert werden, Drohnen erhalten kein Gelée royale (Winston 1991). Aufgrund dieser Beobachtung wird Gelée royale auch als Königinnen-Futtersaft bezeichnet. Gelée royale besteht vor allem aus Wasser, Proteinen, Fettsäuren und Zuckern. Über 50% des Trockengewichts bilden Proteine, von denen die zehn bekannten *major royal jelly*-Proteine bis zu 90% ausmachen (Helbing et al. 2017, Xue et al. 2017). Diese Proteine dienen in erster Linie als Nährstoffe für die Bienenbrut, da sie in Ammenbienen exprimiert werden und nicht mehr in

Diskussion

älteren Arbeiterinnen (Kubo et al. 1996, Ohashi et al. 1997). Nichtsdestotrotz zeigen genauere Untersuchungen ein breiteres Verwendungsspektrum dieser Proteine im Bienenvolk: Durch die Bindung an ein *major royal jelly protein* erfolgt der Austausch von RNA zwischen Arbeiterinnen und Larven als wichtiger Faktor der sozialen Immunität (Maori et al. 2019), Mitwirkung an der phänotypischen Plastizität und dem altersabhängigen Polyethismus (Dobritzsch et al. 2019) oder antimikrobielle und antioxidative Eigenschaften (Park et al. 2019a, Park et al. 2019b). Weiterhin konnten Chen et al. (2017) zeigen, dass *major royal jelly*-Proteine die Gedächtnisleistungen und kognitiven Fähigkeiten bei Nagetieren verbesserten. In *Drosophila* zeigte eine entsprechende Protein-Supplementation eine Erhöhung der Lebenserwartung und Fertilität (Xin et al. 2016). Nach Injektion von *E. coli* zeigten Larven eine Herabregulierung dieser Speicherproteine in der Hämolymphe (Randolt et al. 2008). Die gleiche Beobachtung konnte nach Infektion mit dem Pathogen *Paenibacillus larvae* gemacht werden (Chan et al. 2009). Die inverse Korrelation zwischen Energiehaushalt und wirtsspezifischer Antwort konnte auch in Hummeln und Schmetterlingen gezeigt werden (Moret und Schmid-Hempel 2000, Asgari und Schmidt 2004). Die bisherigen Daten verdeutlichen, dass Insektizid-Wirkstoffe Auswirkungen auf den larvalen Metabolismus haben. Allerdings sind die damit verbundenen Konsequenzen nicht offensichtlich. Die Aktivierung verschiedener Signalwege, die die Detoxifikation, Immunantwort oder Regeneration initiieren, könnten den Metabolismus erhöhen und damit auch den Bedarf an Nährstoffen, die durch die *major royal jelly*-Proteine bereitgestellt werden (Rand et al. 2015). Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Futter-Aufnahme reduziert wurde. Dies könnte am Wirkstoff liegen oder indirekt durch eine Verringerung des larvalen Wachstums verursacht sein (Davis et al. 1988, Baron et al. 2017, Sgolastra et al. 2018).

Es hat sich gezeigt, dass bei den Dimethoatgruppen nur in DM3 die Dysregulation von identifizierten Proteinen bestätigt werden konnte. Im Vergleich zu DM1 und DM2 zeigte diese Gruppe auch die meisten Unterschiede im Proteinmuster. Dies lässt sich auch anhand der hierarchischen Clusteranalyse feststellen. Bei dieser werden zwei der identifizierten Cluster fast ausschließlich von der Kontrollgruppe und DM1 gebildet, was auf eine vergleichsweise geringe Änderung in der Proteinproduktion hinweist. Die verbliebenen Cluster werden zum Großteil von den Gruppen DM2 und DM3 gebildet. Insbesondere die Gele der Gruppe DM3 sind ausschließlich in diesen zu finden. Dadurch wird ersichtlich, dass diese beiden Konzentrationen bereits einen stärkeren Einfluss auf die Proteinbiosynthese ausüben. Eine deutlichere Auftrennung erfolgte bei den Behandlungen mit Fenoxycarb und Flupyradifuron.

Diskussion

Nach der Anwendung von Flupyradifuron zeigte das Protein 14-3-3 zeta eine verringerte Syntheserate. Dieses Protein wurde bereits in der Transkriptomanalyse identifiziert. In diesem Fall korrelieren Transkriptexpression und Proteinbildung. Die vielfältigen Aufgaben dieser Proteinfamilie im Zusammenhang mit der Larvalentwicklung und Immunantwort wurden bereits in der Transkriptomanalyse erläutert (Chang und Rubin 1997, Le et al. 2016, Trujillo-Ocampo et al. 2017). Die Korrelation von Genexpression und Proteinsynthese ist ein starkes Indiz für eine Beeinträchtigung der beteiligten biochemischen Reaktionswege.

Ein weiteres reguliertes Protein war die Glutathion-S-Transferase. Honigbienen, wie auch alle anderen Organismen, sind permanent einer großen Bandbreite an biotischen und abiotischen Stressoren ausgesetzt, hierzu gehören u.a. Pestizide, Schwermetalle oder freie Radikale (Allen und Sohal 1986, Lukaszewicz-Hussain 2010, Nikolić et al. 2019). Daher haben sowohl Tiere als auch Pflanzen verschiedene Strategien entwickelt, um u.a. oxidativen Stress zu verringern; hierzu zählt die Familie der Glutathion-S-Transferasen (Board und Menon 2013). Ihre Hauptfunktion liegt darin, Glutathion an körperfremde Stoffe zu addieren, um deren Reaktivität zu verringern und die Wasserlöslichkeit zu erhöhen (Hayes et al. 2005). Aufgrund ihrer essenziellen Rolle in der Detoxifikation konnte eine Induktion in Zusammenhang mit der wirtseigenen Antwort auf exogene Stressoren beobachtet werden (Loucif-Ayad et al. 2008, Yan et al. 2013, Liu et al. 2016, Li et al. 2017, Tavares et al. 2017). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass die Produktion der Transferase nach Anwendung von Fremdstoffen nicht immer konsistent ist, was eine differenziertere Regulierung vermuten lässt (Zhu et al. 2017, Hayat et al. 2018, Nikolić et al. 2019, Mitton et al. 2020). Zudem können Enzymaktivität und Genexpression gegensätzlich korrelieren (Nikolić et al. 2019). Ein Grund für unterschiedliche Expressionsprofile könnten die verschiedenen Klassen der Glutathion-S-Transferasen sein, die an diversen physiologischen Prozessen beteiligt sind und unabhängig voneinander reguliert werden (Hayes et al. 2005, Zimniak und Singh 2006). Eine weitere Ursache sind die unterschiedlichen Reaktionen, die als Antwort auf Xenobiotika aktiviert werden, zum Beispiel die Induktion des Keap1-Nrf2-Signalweges. Die Aktivierung dieses Signalweges ist die primäre Reaktion auf oxidativen Stress. Wenn keine freien Radikale anwesend sind, ubiquitiniert Keap1 den Transkriptionsfaktor Nrf2, wodurch dieser im Proteasom degradiert wird. Freie Radikale führen hingegen dazu, dass Keap1 deaktiviert wird und Nrf2 in den Zellkern wandern kann, um die Expression von antioxidativen Genen zu induzieren (Baird und Yamamoto 2020). Daher kann die vorliegende Repression dieses Enzyms auf einen möglichen Einfluss auf diesen Signalweg hindeuten und damit die larvale Immunantwort schwächen.

4.3 Etablierung eines Genarrays zur Beurteilung einer Insektizidintoxikation

Die aufgezeigten Ergebnisse konnten genutzt werden, um ein Genarray aus den Daten der Transkript- und Proteinanalyse zu erstellen. Dieses umfasst alle signifikant dysregulierten Gene mit einer \log_2 *Fold change* von mindestens $\pm 1,5$. Zusätzlich wurden fünf Referenzgene hinzugefügt. Da die Wahl der Normalisierungsgene von den Testsubstanzen und dem Versuchsorganismus abhängig ist, kann die Stabilität dieser Transkripte zunächst überprüft und anschließend angepasst werden. Häufig werden drei Gene zur Normalisierung verwendet (Ling und Salvaterra 2011). Durch die Gene des Immunsystems kann u.a ein Einfluss auf den Toll-Signalweg und die Aktivierung von AMPs nachgewiesen werden. Die Beeinträchtigung von zellulären Strukturen oder Abbaumechanismen wird durch die Autophagie- oder Proteasom-Kaskade deutlich. Das Zielgen *ache2* kann vor allem Aufschluss darüber geben, ob die neuronale Signalübertragung eingeschränkt wird. Insbesondere in Bezug auf die Larvalentwicklung und in diesem Kontext der Einfluss auf das endokrine System wird durch die ausgewählten Transkripte abgebildet. Weiterhin sind auch Aussagen zum Energiehaushalt (beta-Oxidation) und mitochondrialen Membrantransport möglich. Es ist auffällig, dass keine Gene aus der Familie der Cytochrom P450-Familie durch die Insektizidanwendung eine stärkere Regulierung zeigten. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind maßgeblich an der metabolischen Detoxifikation von Xenobiotika und der Resistenzbildung gegenüber Pestiziden beteiligt (Johnson 2015, Manjon et al. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung mit einer erhöhten Mortalität nach Insektizidintoxikation korrelierte (Iwasa et al. 2004, Johnson 2015). Die Beobachtung in dieser Arbeit findet sich auch teilweise in anderen Studien (Christen et al. 2019). Eine mögliche Erklärung ist, dass andere Detoxifikationsmechanismen wie Glutathion-S-Transferasen oder Carboxylesterasen aktiv werden (Li et al. 2007), die im getesteten Array nicht vertreten sind. Zudem ist ein Grund die festgelegte Grenze einer \log_2 *Fold change* von mindestens $\pm 1,5$. Unter den signifikant regulierten Transkripten finden sich auch Vertreter der P450-Familie, allerdings erfüllen diese nicht das Kriterium einer ausreichenden Dysregulierung (Tabelle 22, Anhang).

4.4 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde der chronische Einfluss von subletalen Dosen verschiedener Insektizid-Wirkstoffe auf die larvale mRNA-Expression und Proteinbiosynthese untersucht. Die Wirkstoffe wurden dabei über das Futter appliziert. Die für diese Arbeit angewandte Kombination aus dem Fütterungsprotokoll der OECD und der anschließenden biochemischen Analyse fand bisher in der Forschung keinerlei Betrachtung. Die Ergebnisse zeigen, dass auch subletale Wirkstoffgaben zu Unterschieden im Transkriptom oder Proteinmuster führen können, ohne dass ein phänotypischer/toxischer Einfluss auf die larvale Entwicklung beobachtet werden konnte. Die Resultate können als Teil einer umfassenden Risikobewertung von Pestiziden betrachtet werden, die mit anschließenden Freilandversuchen und feld-realistischen Dosen verifiziert werden müssen. Allerdings hat sich auch gezeigt, dass die erhobenen Daten nicht immer mit Untersuchungen aus der Literatur konsistent sind. Dies kann mehrere Ursachen haben: (1) Die Wirkung von Insektiziden unterscheidet sich zwischen Organismen, sowohl inter-, bzw. intraspezifisch als auch zwischen den Geschlechtern (Siegfried 1993, Villanueva et al. 2013, Li et al. 2017), (2) die Auswirkungen hängen mit den eingesetzten Dosen zusammen, wie es auch in dieser Arbeit bei Dimethoat deutlich wird, (3) die Einwirkdauer spielt eine entscheidende Rolle; bei einer längeren Exposition sind stärkere Auswirkungen zu erwarten (Leong et al. 2020) und (4) der Zeitpunkt kann die Genexpression beeinflussen, z.B. beim Vergleich unterschiedlicher Entwicklungsstadien oder Untersuchungen nach definierten Zeitintervallen (Contreras-Garduño et al. 2012, Garzón et al. 2015).

Weiterhin liefert die vorliegende Arbeit Hinweise auf die mögliche Interaktion von Insektiziden und dem endokrinen System von Insekten. Vor allem Transkripte in den vorgestellten Signalwegen legen den Schluss nahe, dass Insektizide den Hormonhaushalt im Organismus stören. Die grundlegenden Mechanismen sind bisher noch nicht eindeutig geklärt, da die Beobachtungen nicht einheitlich sind. Zum einen zeigen aktuelle Studien, dass Chlorantraniliprol und Clothianidin die Konzentration an Häutungshormonen bzw. dem Speicherprotein Vitellogenin in der Hämolymphe senken (Ullah et al. 2019, Meng et al. 2020). Zum anderen weisen Versuche darauf hin, dass Chlorantraniliprol und Imidacloprid die Produktion von Juvenilhormon induzieren (Yu et al. 2007, Xu et al. 2017). Die vorliegenden Resultate deuten eine Beeinträchtigung auf das endokrine System bei Insekten und eine Veränderung des hormonellen Gleichgewichts durch subletale Dosen von Insektiziden an. Zusätzlich sind diese Ergebnisse ein Hinweis auf eine mögliche Kopplung zwischen der Insektizid-assoziierten physiologischen Reaktion und der hormonellen Regulation bei Insekten. Es ist bekannt, dass der Nrf2-Keap1-Signalweg bei Säugetieren und Insekten durch

Xenobiotika-Exposition aktiviert wird (Sykiotis und Bohmann 2008, Misra et al. 2011). Bei *Drosophila* konnten Deng und Kerppola (2013) außerdem nachweisen, dass dieser Signalweg bei der Kontrolle der Metamorphose durch Regulierung der Ecdyson-Produktion beteiligt ist. Insbesondere im Larvalstadium sind die Hormone Ecdyson und Juvenilhormon die Taktgeber der Morphogenese. Eine detailliertere Betrachtung der Synthesewege des Juvenilhormons könnten hierbei weitere Veränderungen verdeutlichen. So konnten Xu et al. (2017) zeigen, dass beim Asiatischen Reisbohrer (*Chilo suppressalis*) die Exposition mit Chlorantraniliprol zu einer erhöhten Expression des Enzyms Farnesyl-Diphosphat-Synthase führte, die den letzten Schritt der Juvenilhormon-Synthese katalysiert. Eine Hochregulierung würde folglich die Larvalentwicklung verlängern. Diese verlängerte Entwicklungsphase konnte sowohl nach Chlorantraniliprol- als auch nach Flupyradifuron-Exposition beobachtet werden (Lai und Su 2011, Liang et al. 2019).

Der Einfluss auf den Toll-Signalweg legt nahe, dass die eingesetzten Insektizide die Immunantwort bei Larven beeinflussen. Dies ist konsistent mit Beobachtungen in der Literatur (James und Xu 2012). Die Toll-Kaskade ist allerdings nicht die einzige Barriere für Pathogene. Ebenfalls wichtige Funktionen übernehmen der Imd- und der JAK/STAT-Signalweg, deren Aktivierung über die NF- κ B-Transkriptionsfaktoren Relish und Domeless gesteuert wird (De Gregorio et al. 2002, Myllymäki und Rämet 2014). Eine Untersuchung weiterer Transkripte in diesen Signalketten kann den Einfluss von Insektiziden weiter verdeutlichen.

Die Beeinträchtigung auf den Autophagie-Weg lässt vermuten, dass die Mechanismen zum Abbau von zellulären Bestandteilen oder Organellen beeinträchtigt werden. Eine weitere Betrachtung von Autophagie-Markern wäre in diesem Kontext sinnvoll, um das Ausmaß genauer festzulegen. Hierzu würden sich vor allem die Expressionsprofile der verschiedenen TOR-Komplexe oder MAP-Kinasen eignen, da diese den Aktivierungsprozess der Autophagie steuern (Loewith et al. 2002, Zhou et al. 2015). Insbesondere die Betrachtung des Gens *atg6* ist interessant, da es sowohl bei der Autophagie beteiligt ist als auch Apoptose initiieren kann (Wirawan et al. 2010). Durch die Untersuchung weiterer zellulärer Apoptose-Marker wäre es möglich, diesen Einfluss weiter zu eruieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen weiterhin den Schluss zu, dass die Insektizide verschiedene Gewebe wie den Fettkörper oder die Neuroanatomie schädigen. Zudem gibt es Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Mitochondrien oder der Hämocyten. In diesem Kontext können histologische Untersuchungen zur Beurteilung der Gewebeintegrität (Aljedani 2018), immunzytochemische Untersuchungen von Synapsen (Groh et al. 2004) oder Enzymaktivitäts-Assays aus Mitochondrienhomogenat (Jackman und Willis 1996) vorgenommen werden.

Diskussion

Weiterführende Experimente könnten zudem untersuchen, ob der Entwicklungshemmer Fenoxycarb im Vergleich zu den übrigen Wirkstoffen ein anderes Expressionsmuster zeigt, wenn man die Analysen in einem späteren Entwicklungsstadium durchführt. Fenoxycarb führte bei Larven phänotypisch zwar zu keinen Beeinträchtigungen, allerdings erhöhte es die Mortalität der Puppen (Aupinel et al. 2007). Diese Beobachtung wird dahingehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit unterstützt, dass sich nach Fenoxycarb-Exposition die wenigsten Unterschiede zeigten. Wenn es in diesem Kontext möglich wäre, distinkte Abweichungen zwischen den verschiedenen Mechanismen der Wirkstoffe festzustellen, könnten anhand dieser Daten spezifische Analysemethoden entwickelt werden.

Weiterhin legen die Ergebnisse dar, dass Flupyradifuron sowohl bei der Transkript- als auch bei der Proteinanalyse die meisten Unterschiede verursachte. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die verwendete kumulative Dosis von $1,54 \mu\text{g}/\text{Larve}$ zu hoch war. In Vorversuchen zeigte diese Dosis zwar keine Erhöhung der Mortalität und wurde entsprechend als subletal definiert, jedoch muss dies nicht zwangsläufig bedeuten, dass es zu keinen physiologischen Änderungen kommen kann. Der Übergang von subletal zu letal ist bei Flupyradifuron noch nicht klar definiert, da der Einfluss auf Honigbienen erst seit wenigen Jahren untersucht wird (Carleton 2014, Nauen et al. 2015). Hinzu kommt die Tatsache, dass verschiedene Genotypen, Herkünfte und Altersstadien unterschiedlich stark auf Xenobiotika reagieren (Nauen et al. 2001, Rinkevich et al. 2015). Dies spiegelt sich auch in den bisherigen Arbeiten zum Einfluss von Flupyradifuron auf Honigbienen wider. Die letale Dosis, bei der 50% der getesteten Individuen sterben, wird bei adulten Bienen mit $1,2 \mu\text{g}/\text{Biene}$ angegeben (EFSA 2015). Es hat sich allerdings gezeigt, dass dieser Wert auch bis zu $3 \mu\text{g}/\text{Biene}$ betragen kann (Tosi und Nieh 2019). Anders verhält es sich bei den Wirkstoffen Fenoxycarb und Dimethoat. Diese finden bereits seit Jahrzehnten ihren Einsatz und sind daher gut auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Deshalb dienen diese Substanzen unter anderem auch als Referenzchemikalien im von Aupinel et al. (2007) entwickelten Protokoll zur Larvenfütterung.

Ein weiterer Aspekt für zukünftige Arbeiten ist die Untersuchung in Zellkulturen. Dadurch ist es möglich, Einflüsse auf zellulärer Ebene unter definierten Bedingungen festzustellen. Aufgrund ihrer genetischen Uniformität sind die generierten Ergebnisse zudem kohärenter. Etwa 1 000 Insekten-Zelllinien wurden bisher beschrieben, wovon über 80% von Dipteren oder Lepidopteren stammen (Hink und Butz 1985). Bergem et al. (2006) untersuchten Zellen aus verschiedenen Geweben der Honigbiene und kamen zu dem Schluss, dass embryonale Zellen adäquate Voraussetzungen besitzen. Seitdem wurden zwei permanente Zelllinien bei der Honigbiene beschrieben: Kitagishi et al. (2011) immortalisierten embryonale Zellen durch den

Diskussion

Transfer eines humanen Proto-Onkogens. Allerdings wurde in der Zelllinie auch der Flügeldeformations-Virus nachgewiesen. Inwieweit der Gentransfer die endogene Genexpression beeinflusst, ist ebenfalls nicht bekannt. Eine weitere Zelllinie aus Embryonen wurde durch Goblirsch et al. (2013) etabliert. Nichtsdestotrotz erwies sich eine dauerhafte Kultivierung als schwierig. Eine Reproduktion der genannten Zelllinien in anderen Arbeitsgruppen wurde bisher nicht beschrieben. Die Etablierung einer stabilen Zelllinie könnte zudem auch in das Zulassungsverfahren und die Prüfung von Pestiziden integriert werden.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur molekularen Wirkung von Insektizid-Wirkstoffen ergeben sich weitere Ansätze, um die Auswirkungen von Xenobiotika spezifischer zu analysieren und damit auch mögliche Beeinträchtigungen am Bienenvolk früher zu diagnostizieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Effekt verschiedener Insektizid-Wirkstoffe auf das larvale mRNA-Transkriptom und auf die Proteinbiosynthese von *Apis mellifera* (LINNAEUS, 1758)

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss verschiedener Insektizid-Wirkstoffe auf das larvale Transkriptom und die Proteinbildung der Honigbiene *Apis mellifera*. Die Westliche Honigbiene gilt aufgrund ihrer Ökosystemdienstleistungen als eines der wichtigsten Nutztiere des Menschen. Durch die Bestäubung landwirtschaftlicher Nutzpflanzen und Blüten weltweit nimmt sie ökonomisch und ökologisch eine Schlüsselposition ein. Im Laufe der 2000er beobachtete man global einen starken Rückgang an Honigbienen, der zunächst nicht erklärt werden konnte. Mögliche Ursachen waren der Befall durch Pathogene oder verschiedene Virus-Erkrankungen der Bienen. Andere Erklärungen sahen den Hauptgrund in der landwirtschaftlichen Verwendung von Pestiziden oder dem Verlust an Lebensraum. Insbesondere der Einsatz von Insektiziden wurde aufgrund ihrer Wirkung auf Nicht-Zielorganismen kritisiert. Hierbei gerieten die Auswirkungen von subletalen Pestizid-Konzentrationen auf die Physiologie der Honigbiene in den Fokus. In Studien konnte gezeigt werden, dass geringe Konzentrationen eines Insektizids nicht zum Tod führen, allerdings negative Effekte auf das motorische Verhalten, die Flugfähigkeiten oder die Lern- und Gedächtnisleistungen zeigen.

Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurde der Einfluss sublethaler Konzentrationen der neuen Wirkstoffe Flupyradifuron und Chlorantraniliprol untersucht. Im Vergleich kamen die etablierten Wirkstoffe Dimethoat und Fenoxycarb zum Einsatz. Gemäß den Vorgaben der OECD Richtlinie 239 erfolgte die Fütterung von Bienenlarven über acht Tage. Die Applikation der Wirkstoffe fand an vier aufeinanderfolgenden Tagen statt und an den Tagen vier, sechs und acht wurden Individuen für eine spätere Analyse eingefroren. Die Dosis an aufgenommenem Wirkstoff erhöhte sich bis zu einem maximalen Wert nach Tag 6. Die Analyse ausgewählter Transkripte erfolgte mittels eines RT-qPCR-Arrays (79 Kandidatengene). Die anschließende Proteinanalyse erfolgte durch eine 2D-Gelelektrophorese, um die Veränderungen im Transkriptom auch im Proteinmuster nachzuweisen.

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse zeigten, dass vor allem Gene betroffen waren, die mit der Larvalentwicklung, Physiologie oder Immunantwort assoziiert waren. Dies betraf vor allem den Toll-Signalweg, die Ecdyson-induzierte Kaskade und die Autophagie-Signaltransduktion. In der Proteinanalyse waren Änderungen in Bezug auf das Immunsystem, den Metabolismus und die Entwicklung festzustellen (>900 Proteinspots). Die beiden geringsten Dosen von Dimethoat (0,05 µg und 0,1 µg) wiesen keine signifikanten Unterschiede bei den identifizierten

Zusammenfassung

Proteinen auf. Es ließ sich feststellen, dass mit zunehmender Dosis an Wirkstoff auch die Anzahl an differenziell exprimierten Transkripten zunahm. Zudem zeigte Flupyradifuron in der Transkript- und Proteinanalyse die meisten Änderungen im Vergleich zur Kontrolle auf. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die applizierte Dosis an Flupyradifuron trotz subletaler Konzentration bei den durchgeführten Versuchen noch zu hoch angesetzt war. Nichtsdestotrotz wurden endogene Effekte nach Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen in subletalen Konzentrationen nachgewiesen. Weiterhin deutet sich an, dass der Fettkörper, die Mitochondrien oder auch die Hämocyten geschädigt werden.

Zum einen führen die vorliegenden Ergebnisse zu der Folgerung, dass die Analyse der Genexpression und Proteinbiosynthese ein weiteres nützliches Werkzeug im Zuge einer holistischen Risikoabschätzung der Wirkung von Agrochemikalien auf Honigbienen darstellt. Zum anderen ist es wichtig, neben der Betrachtung der Transkripte ebenfalls die korrelierenden Proteine in die Auswertung mit einzubeziehen, um ein komplexeres Bild des zellulären Zustandes zu erhalten.

6. SUMMARY

Influence of different insecticidal substances on larval mRNA transcriptome and protein biosynthesis of *Apis mellifera* (LINNAEUS, 1758)

In the present work the influence of four different insecticidal substances on larval mRNA transcriptome and protein production of the western honeybee was investigated. The honeybee *Apis mellifera* is considered as one of the most important farm animals worldwide because of her ecosystem services. The main benefit of the western honeybee is not the production of honey or wax but the pollination of most of today's crops and flowers. During the 2000s a decrease in honeybee colonies especially in the US could be observed. Possible drivers like the infestation with different pathogens or viruses were considered. Other reasons might be the loss of habitats or the use of pesticides in agriculture. In particular, the use of insecticides was criticized because of their impact on non-target organisms. Especially the impact of sublethal concentrations on honeybees' physiology were discussed. In other studies, it could be shown that small amounts of insecticides did not lead to death but impaired the honeybees' motor system, the flight ability and the memory and learning capability.

In this work the influence of sublethal concentrations of the new substances flupyradifurone and chlorantraniliprole were tested. Additionally, the established substances dimethoate and fenoxycarb were tested to compare the results. The instructions of the OECD guideline 239 for chronic feeding of honeybee larvae were the basis for this study. The substances were applied on four days in a row and on three days larvae were sampled for later analysis. The dose of ingested substance increased until a maximum was reached after six days. The expression of defined transcripts was analyzed via a RT-qPCR array (79 targets). The protein analysis was conducted using a 2D gel electrophoresis to correlate changes of transcript and changes in protein abundances.

The results of the RT-qPCR showed differences in transcripts of the immune system, physiology, and larval development. In detail, the Toll signaling pathway, the ecdysone-mediated cascade and the autophagy signal transduction were mainly affected. The protein analysis showed differences in the expression profiles of targets associated with the immune system, metabolism and development (>900 protein spots). Concerning the identified proteins, the least doses of dimethoate (0.05 µg and 0.1 µg) showed no significant differences. Nevertheless, we could show that with increased doses the number of differential expressed targets increased in transcriptome and protein analysis. Additionally, flupyradifurone showed the most changes in both RT-qPCR and 2D gel electrophoresis compared to the control. One possible reason might be that the applied dose was too high even though we used sublethal

Summary

concentrations. Nonetheless, significant effects of the applied substances at sublethal concentrations were detected. Furthermore, the results indicate impairments of the fat body, the mitochondria or the hemocytes, respectively.

In summary, the results show that on one hand the analysis of expression profiles is an additional useful tool in regard of a holistic risk assessment of xenobiotics. On the other hand, mRNA expression and protein biosynthesis should be considered both in analysis to receive a more precise insight into the cellular physiology.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abd M.e.-A., A. Sahlab, M.e.-K. Abd (1994). Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift **101**(6): 230-232.
- Abramson S.N., Z. Radic, D. Manker, D.J. Faulkner, P. Taylor (1989). Onchidal: a naturally occurring irreversible inhibitor of acetylcholinesterase with a novel mechanism of action. Molecular pharmacology **36**(3): 349-354.
- Acevedo S.F., K.K. Tsigkari, S. Grammenoudi, E.M. Skoulakis (2007). In vivo functional specificity and homeostasis of Drosophila 14-3-3 proteins. Genetics **177**(1): 239-253.
- Adam B., G. Lengvari (1950). Beekeeping at Buckfast Abbey. Bee World **31**(12): 89-91.
- Affifi N., A. Ramadan, M. El-Aziz, E. Saki (1991). Influence of dimethoate on testicular and epididymal organs, testosterone plasma level and their tissue residues in rats. DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift **98**(11): 419-423.
- Aizen M.A., L.D. Harder (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. Current biology **19**(11): 915-918.
- Akbel E., D. Arslan-Acaroz, H.H. Demirel, I. Kucukkurt, S. Ince (2018). The subchronic exposure to malathion, an organophosphate pesticide, causes lipid peroxidation, oxidative stress, and tissue damage in rats: the protective role of resveratrol. Toxicology research **7**(3): 503-512.
- Akram M. (2014). Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. Cell biochemistry and biophysics **68**(3): 475-478.
- Al Nagggar Y., B. Baer (2019). Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). Scientific reports **9**(1): 1-11.
- Al Nagggar Y., R.J. Paxton (2020). The novel insecticides flupyradifurone and sulfoxaflor do not act synergistically with viral pathogens in reducing honey bee (*Apis mellifera*) survival but sulfoxaflor modulates host immunocompetence. Microbial biotechnology.
- Aljedani D.M. (2018). Research Article Comparing the Histological Structure of the Fat Body and Malpighian Tubules in Different Phases of Honeybees, *Apis mellifera jemenatica* (Hymenoptera: Apidae).
- Allen R., R. Sohal (1986). Role of glutathione in the aging and development of insects, *Insect aging*, Springer: 168-181.
- Altschul S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology **215**(3): 403-410.
- Andersen C.L., J.L. Jensen, T.F. Ørntoft (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer research **64**(15): 5245-5250.
- Annabi E., I. Ben Salem, S. Abid-Essefi (2019). Acetamiprid, a neonicotinoid insecticide, induced cytotoxicity and genotoxicity in PC12 cells. Toxicology mechanisms and methods **29**(8): 580-586.
- Arico S., A. Petiot, C. Bauvy, P.F. Dubbelhuis, A.J. Meijer, P. Codogno, E. Ogier-Denis (2001). The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. Journal of Biological Chemistry **276**(38): 35243-35246.
- Arnal N., G. Morel, C.A. Marra, M. Astiz (2019). Pro-apoptotic effects of low doses of dimethoate in rat brain. Toxicology and applied pharmacology **363**: 57-63.
- Asgari S., O. Schmidt (2004). Isolation of an imaginal disc growth factor homologue from *Pieris rapae* and its expression following parasitization by *Cotesia rubecula*. Journal of insect physiology **50**(8): 687-694.

- Ashburner M., G. Richards (1976). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*: III. Consequences of ecdysone withdrawal. Developmental biology **54**(2): 241-255.
- Aufauvre J., B. Misme-Aucouturier, B. Viguès, C. Texier, F. Delbac, N. Blot (2014). Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. PLoS One **9**(3): e91686.
- Aupinel P., D. Fortini, H. Dufour, J. Tasei, B. Michaud, J. Odoux, M. Pham-Delegue (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. Bulletin of insectology **58**(2): 107.
- Aupinel P., D. Fortini, B. Michaud, F. Marolleau, J.N. Tasei, J.F. Odoux (2007). Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new in vitro standardized feeding method. Pest Management Science: formerly Pesticide Science **63**(11): 1090-1094.
- Babicki S., D. Arndt, A. Marcu, Y. Liang, J.R. Grant, A. Maciejewski, D.S. Wishart (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. Nucleic acids research **44**(W1): W147-W153.
- Baehrecke E. (2000). Steroid regulation of programmed cell death during *Drosophila* development. Cell Death & Differentiation **7**(11): 1057-1062.
- Baird L., M. Yamamoto (2020). The Keap1-Nrf2 pathway: From mechanism to medical applications, Oxidative Stress, Elsevier: 125-147.
- Bang I.S. (2019). JAK/STAT signaling in insect innate immunity. Entomological Research **49**(8): 339-353.
- Barbas C.F., D.R. Burton, J.K. Scott, G.J. Silverman (2007). Quantitation of DNA and RNA. Cold Spring Harbor Protocols **2007**(11): pdb. ip47.
- Baron G.L., N.E. Raine, M.J. Brown (2017). General and species-specific impacts of a neonicotinoid insecticide on the ovary development and feeding of wild bumblebee queens. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **284**(1854): 20170123.
- Bass C., I. Denholm, M.S. Williamson, R. Nauen (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. Pesticide Biochemistry and Physiology **121**: 78-87.
- Bass C., L.M. Field (2011). Gene amplification and insecticide resistance. Pest management science **67**(8): 886-890.
- Bauer M.F., S. Hofmann, W. Neupert, M. Brunner (2000). Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. Trends in cell biology **10**(1): 25-31.
- Belvin M.P., K.V. Anderson (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. Annual review of cell and developmental biology **12**(1): 393-416.
- Bergem M., K. Norberg, R.M. Aamodt (2006). Long-term maintenance of in vitro cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. BMC developmental biology **6**(1): 17.
- Bettencourt R., H. Asha, C. Dearolf, Y.T. Ip (2004). Hemolymph-dependent and-independent responses in *Drosophila* immune tissue. Journal of cellular biochemistry **92**(4): 849-863.
- Bhavan P.S., P. Geraldine, R. Sowdeswari (2011). Sub-lethal impact of carbaryl on food utilization in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. Journal of environmental biology **32**(3): 369.
- Bindu P., B. Priya, V. Akhilesh, K. Jisha, K. Rukhsana, C. Sebastain (2015). Toxicological effect of chlorantraniliprole on fat body and haemolymph metabolism in the final instar larvae of silk insect *Bombyx mori* L. Int J Sci Nat **6**(2): 177-182.
- Blacquièrre T., G. Smagghe, C.A. Van Gestel, V. Mommaerts (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. Ecotoxicology **21**(4): 973-992.
- Board P.G., D. Menon (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. Biochimica et biophysica acta (bba)-general subjects **1830**(5): 3267-3288.

- Bodirsky B.L., S. Rolinski, A. Biewald, I. Weindl, A. Popp, H. Lotze-Campen (2015). Global food demand scenarios for the 21st century. *PloS one* **10**(11).
- Bohlmann J., J. Crock, R. Jetter, R. Croteau (1998). Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (E)- α -bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*). *Proceedings of the national academy of sciences* **95**(12): 6756-6761.
- Boily M., M. Bisson, P. Spear (2004). Retinoids—biomarkers and molecular basis for chemicals toxic effects (Rétinoïdes-Biomarqueurs et base moléculaire d'effets de substances toxiques). *Ecotoxicologie Moléculaire—Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy, Québec: 197-256.
- Bonneton F., V. Laudet (2012). Evolution of nuclear receptors in insects, *Insect endocrinology*, Elsevier: 219-252.
- Bootman M.D., T. Chehab, G. Bultynck, J.B. Parys, K. Rietdorf (2018). The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus? *Cell Calcium* **70**: 32-46.
- Boyer P.D. (1997). The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annual review of biochemistry* **66**(1): 717-749.
- Brandt A., A. Gorenflo, R. Siede, M. Meixner, R. Büchler (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of insect physiology* **86**: 40-47.
- Brodsgaard H.F., C.J. Brodsgaard, H. Hansen, G.L. Lövei (2003). Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Apidologie* **34**(2): 139-145.
- Brutscher L.M., K.F. Daughenbaugh, M.L. Flenniken (2015). Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current opinion in insect science* **10**: 71-82.
- Bulet P., C. Hetru, J.-L. Dimarcq, D. Hoffmann (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology* **23**(4-5): 329-344.
- Bustin S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* **25**(2): 169-193.
- Bustin S.A. (2004). *AZ of quantitative PCR*. International University Line La Jolla, CA.
- Calabrese E.J., L.A. Baldwin (1997). The dose determines the stimulation (and poison): development of a chemical hormesis database. *International Journal of Toxicology* **16**(6): 545-559.
- Calabrese E.J., L.A. Baldwin (2001). Hormesis: a generalizable and unifying hypothesis. *Critical reviews in toxicology* **31**(4-5): 353-424.
- Calatayud-Vernich P., F. Calatayud, E. Simó, J.A.P. Aguilar, Y. Picó (2019). A two-year monitoring of pesticide hazard in-hive: High honey bee mortality rates during insecticide poisoning episodes in apiaries located near agricultural settings. *Chemosphere* **232**: 471-480.
- Carleton J. (2014). Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Foliar, Soil Drench, and Seed Treatment Uses of the New Insecticide Flupyradifurone (BYI 02960).
- Carlson S.D., H.R. Steeves, J.S. VandeBerg, W.E. Robbins (1967). Vitamin A deficiency: effect on retinal structure of the moth *Manduca sexta*. *Science* **158**(3798): 268-270.
- Carnescchi E., C. Svendsen, S. Lasagni, A. Grech, N. Quignot, B. Amzal, C. Toma, S. Tosi, A. Rortais, J. Cortinas-Abrahantes (2019). Investigating combined toxicity of binary mixtures in bees: Meta-analysis of laboratory tests, modelling, mechanistic basis and implications for risk assessment. *Environment international* **133**: 105256.
- Carroll S.B. (1995). Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* **376**(6540): 479.
- Casida J.E., K.A. Durkin (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual review of entomology* **58**: 99-117.

- Chakrabarti P., E.A. Carlson, H.M. Lucas, A.P. Melathopoulos, R.R. Sagili (2020). Field rates of Sivanto™(flupyradifurone) and Transform®(sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Plos one* **15**(5): e0233033.
- Chan Q.W., A.P. Melathopoulos, S.F. Pernal, L.J. Foster (2009). The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC genomics* **10**(1): 387.
- Chang H.C., G.M. Rubin (1997). 14-3-3 epsilon positively regulates Ras-mediated signaling in *Drosophila*. *Genes & Development* **11**(9): 1132-1139.
- Chasan R. (1993). Maternal control of dorsal-ventral polarity and pattern in the embryo. *The development of Drosophila melanogaster*.
- Chen D., R. Guo, X. Xu, C. Xiong, Q. Liang, Y. Zheng, Q. Luo, Z. Zhang, Z. Huang, D. Kumar (2017). Uncovering the immune responses of *Apis mellifera ligustica* larval gut to *Ascospaera apis* infection utilizing transcriptome sequencing. *Gene* **621**: 40-50.
- Chen D., F. Liu, J.-B. Wan, C.-Q. Lai, L.-r. Shen (2017). Effect of major royal jelly proteins on spatial memory in aged rats: Metabolomics analysis in urine. *Journal of Agricultural and food Chemistry* **65**(15): 3151-3159.
- Chen H., Y. Du, Z. Zhu, C. Xiong, Y. Zheng, D. Chen, R. Guo (2020). Transcriptome data of control and *Ascospaera apis* infected *Apis mellifera ligustica* larval guts. *Data in Brief*: 105264.
- Chernysh S., N. Gordya, T. Suborova (2015). Insect antimicrobial peptide complexes prevent resistance development in bacteria. *PLoS One* **10**(7): e0130788.
- Christen V., K. Fent (2017). Exposure of honey bees (*Apis mellifera*) to different classes of insecticides exhibit distinct molecular effect patterns at concentrations that mimic environmental contamination. *Environmental pollution* **226**: 48-59.
- Christen V., Y. Joho, M. Vogel, K. Fent (2019). Transcriptional and physiological effects of the pyrethroid deltamethrin and the organophosphate dimethoate in the brain of honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution* **244**: 247-256.
- Ciechanover A. (2015). The unravelling of the ubiquitin system. *Nature reviews Molecular cell biology* **16**(5): 322-324.
- Cloyd R.A. (2019). Effects of Pesticides and Adjuvants on the Honey Bee, *Apis mellifera*: An Updated Bibliographic Review, Modern Beekeeping, IntechOpen.
- Commission E. (1996). Commission Directive 96/12/EC of 8 March 1996 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. *Offic. J. Eur. Communities* **65**: 20-37.
- Consortium H.G.S. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**(7114): 931.
- Contreras-Garduño J., G. Villanueva, A. Alonso-Salgado (2012). Phenoloxidase production: the importance of time after juvenile hormone analogue administration in *Hetaerina americana* (Fabricius)(Zygoptera: Calopterygidae). *Odonatologica* **41**(1): 1.
- Council N.R. (2000). The future role of pesticides in US agriculture. National Academies Press.
- Cox-Foster D.L., S. Conlan, E.C. Holmes, G. Palacios, J.D. Evans, N.A. Moran, P.-L. Quan, T. Briese, M. Hornig, D.M. Geiser (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**(5848): 283-287.
- Crick F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**(5258): 561-563.
- Crighton D., S. Wilkinson, J. O'Prey, N. Syed, P. Smith, P.R. Harrison, M. Gasco, O. Garrone, T. Crook, K.M. Ryan (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**(1): 121-134.
- Cripe G., C. McKenney Jr, M. Høglund, P. Harris (2003). Effects of fenoxycarb exposure on complete larval development of the xanthid crab, *Rhithropanopeus harrisi*. *Environmental Pollution* **125**(2): 295-299.

- Cuervo A.M. (2008). Autophagy and aging: keeping that old broom working. Trends in Genetics **24**(12): 604-612.
- Cui C., E.L. Benard, Z. Kanwal, O.W. Stockhammer, M. van der Vaart, A. Zakrzewska, H.P. Spaink, A.H. Meijer (2011). Infectious disease modeling and innate immune function in zebrafish embryos, *Methods in cell biology*, Elsevier: 273-308.
- Cunha A.D., A.M. Nascimento, K.R. Guidugli, Z.L. Simões, M.M. Bitondi (2005). Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. Journal of insect physiology **51**(10): 1135-1147.
- Curran S.P., D. Leuenberger, E. Schmidt, C.M. Koehler (2002). The role of the Tim8p–Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. The Journal of cell biology **158**(6): 1017-1027.
- Darvas B., H.H. Rees, N. Hoggard, M.H.T. El-Din, E. Kuwano, I. Bélai, T. Timár (1992). Cytochrome P-450 inducers and inhibitors interfering with ecdysone 20-monooxygenases and their activities during postembryonic development of *Neobellieria bullata* Parker. Pesticide science **36**(2): 135-142.
- Davis A.R., K. Solomon, R. Shuel (1988). Laboratory studies of honeybee larval growth and development as affected by systemic insecticides at adult-sublethal levels. Journal of Apicultural Research **27**(3): 146-161.
- Davis K.F., P. D'Odorico, M.C. Rulli (2014). Moderating diets to feed the future. Earth's Future **2**(10): 559-565.
- Dawson S.P., J.E. Arnold, N.J. Mayer, S.E. Reynolds, M.A. Billett, C. Gordon, L. Colleaux, P.M. Kloetzel, K. Tanaka, R.J. Mayer (1995). Developmental changes of the 26 S proteasome in abdominal intersegmental muscles of *Manduca sexta* during programmed cell death. Journal of Biological Chemistry **270**(4): 1850-1858.
- De Gregorio E., P.T. Spellman, P. Tzou, G.M. Rubin, B. Lemaitre (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. The EMBO journal **21**(11): 2568-2579.
- De Smet L., F. Hatjina, P. Ioannidis, A. Hamamtzoglou, K. Schoonvaere, F. Francis, I. Meeus, G. Smaghe, D.C. de Graaf (2017). Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. PloS one **12**(2): e0171529.
- Decuypere J.-P., D. Kindt, T. Luyten, K. Welkenhuyzen, L. Missiaen, H. De Smedt, G. Bultynck, J.B. Parys (2013). mTOR-controlled autophagy requires intracellular Ca²⁺ signaling. PloS one **8**(4): e61020.
- Delanoue R., M. Slaidina, P. Léopold (2010). The steroid hormone ecdysone controls systemic growth by repressing dMyc function in *Drosophila* fat cells. Developmental cell **18**(6): 1012-1021.
- Deng H., T.K. Kerppola (2013). Regulation of *Drosophila* metamorphosis by xenobiotic response regulators. PLoS genetics **9**(2): e1003263.
- Derecka K., M.J. Blythe, S. Malla, D.P. Genereux, A. Guffanti, P. Pavan, A. Moles, C. Snart, T. Ryder, C.A. Ortori (2013). Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. PloS one **8**(7).
- Desneux N., A. Decourtye, J.-M. Delpuech (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annu. Rev. Entomol. **52**: 81-106.
- Di Prisco G., V. Cavaliere, D. Annoscia, P. Varricchio, E. Caprio, F. Nazzi, G. Gargiulo, F. Pennacchio (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(46): 18466-18471.
- Dimarcq J.-L., J.-L. Imler, R. Lanot, R.A.B. Ezekowitz, J.A. Hoffmann, C.A. Janeway, M. Lagueux (1997). Treatment of 1 (2) mbn *Drosophila* tumorous blood cells with the

- steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. Insect biochemistry and molecular biology **27**(10): 877-886.
- Dinter A., K.E. Brugger, N.-M. Frost, M.D. Woodward (2009). Chlorantraniliprole (Rynaxypyr): A novel DuPont™ insecticide with low toxicity and low risk for honey bees (*Apis mellifera*) and bumble bees (*Bombus terrestris*) providing excellent tools for uses in integrated pest management, Hazards of pesticides to bees - 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group, Julius-Kühn-Archiv
- Dittmeyer R., W. Keim, G. Kreysa, K. Winnacker, L. Kuchler (2004). Chemische Technik. Band 8, Ernährung, Gesundheit, Konsumgüter, Wiley-VCH.
- Djavaheri-Mergny M., M. Amelotti, J. Mathieu, F. Besançon, C. Bauvy, S. Souquère, G. Pierron, P. Codogno (2006). NF- κ B activation represses tumor necrosis factor- α -induced autophagy. Journal of Biological Chemistry **281**(41): 30373-30382.
- Dobritzsch D., D. Aumer, M. Fuszard, S. Erler, A. Buttstedt (2019). The rise and fall of major royal jelly proteins during a honeybee (*Apis mellifera*) workers' life. Ecology and Evolution **9**(15): 8771-8782.
- Dong S., S. Kang, T.-L. Gu, S. Kardar, H. Fu, S. Lonial, H.J. Khoury, F. Khuri, J. Chen (2007). 14-3-3 integrates pro-survival signals mediated by the AKT and MAPK pathways in ZNF198-FGFR1-transformed hematopoietic cells. Blood **110**(1): 360-369.
- Doublet V., M. Labarussias, J.R. de Miranda, R.F. Moritz, R.J. Paxton (2015). Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. Environmental microbiology **17**(4): 969-983.
- Du G., O. Shen, H. Sun, J. Fei, C. Lu, L. Song, Y. Xia, S. Wang, X. Wang (2010). Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. Toxicological Sciences **116**(1): 58-66.
- Dudek J., P. Rehling, M. van der Laan (2013). Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1833**(2): 274-285.
- Duncan I., E.B. Lewis (1982). Genetic control of body segment differentiation in *Drosophila*., in: Subtelny S. and Green P.B. (Eds.), *Developmental Order: Its Origin and Regulation*: 533-554.
- Dunn M.J. (1996). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels, *Protein Purification Protocols*, Springer: 363-370.
- EFSA (2013). EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). EFSA Journal **11**(7): 3295.
- EFSA (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flupyradifurone. EFSA Journal **13**(2): 101.
- EFSA (2018). Evaluation of the data on clothianidin, imidacloprid and thiamethoxam for the updated risk assessment to bees for seed treatments and granules in the EU. EFSA Supporting Publications **15**(2): 1378E.
- Ellis J.D., J.D. Evans, J. Pettis (2010). Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. Journal of Apicultural Research **49**(1): 134-136.
- Erlich S., L. Mizrachy, O. Segev, L. Lindenboim, O. Zmira, S. Adi-Harel, J.A. Hirsch, R. Stein, R. Pinkas-Kramarski (2007). Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. Autophagy **3**(6): 561-568.
- Esther E., H. Human, S. Smit, M. Beukes, Z. Apostolides, S.W. Nicolson, C.W. Pirk (2017). Proteomic and metabolomic analysis reveals rapid and extensive nicotine detoxification ability in honey bee larvae. Insect biochemistry and molecular biology **82**: 41-51.
- Evans J., K. Aronstein, Y.P. Chen, C. Hetru, J.L. Imler, H. Jiang, M. Kanost, G. Thompson, Z. Zou, D. Hultmark (2006a). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. Insect molecular biology **15**(5): 645-656.

- Evans J.D. (2006b). Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. Journal of invertebrate pathology **93**(2): 135-139.
- Eveleth Jr D.D., J.L. Marsh (1986). Sequence and expression of the Cc gene, a member of the dopa decarboxylase gene cluster of *Drosophila*: possible translational regulation. Nucleic acids research **14**(15): 6169-6183.
- Feng Z., H. Zhang, A.J. Levine, S. Jin (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(23): 8204-8209.
- Feyereisen R. (1999). Insect P450 enzymes. Annual review of entomology **44**(1): 507-533.
- Fine J.D., D.L. Cox-Foster, C.A. Mullin (2017). An inert pesticide adjuvant synergizes viral pathogenicity and mortality in honey bee larvae. Scientific reports **7**(1): 1-9.
- Fishel F.M. (2018). IRAC's Insecticide mode of Action Classification, University of Florida IFS Extension.
- Flatt T., A. Heyland, F. Rus, E. Porpiglia, C. Sherlock, R. Yamamoto, A. Garbuzov, S.R. Palli, M. Tatar, N. Silverman (2008). Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*. Journal of Experimental Biology **211**(16): 2712-2724.
- Forbes V.E. (2000). Is hormesis an evolutionary expectation? Functional Ecology **14**(1): 12-24.
- Fujita N., Y. Nagata, T. Nishiuchi, M. Sato, M. Iwami, T. Kiya (2013). Visualization of neural activity in insect brains using a conserved immediate early gene, Hr38. Current Biology **23**(20): 2063-2070.
- Fukami J.-I. (1980). Metabolism of several insecticides by glutathion S-transferase. Pharmacology & therapeutics **10**(3): 473-514.
- Funderburk S.F., Q.J. Wang, Z. Yue (2010). The Beclin 1-VPS34 complex—at the crossroads of autophagy and beyond. Trends in cell biology **20**(6): 355-362.
- Gabai V.L., A.B. Meriin, J.A. Yaglom, V.Z. Volloch, M.Y. Sherman (1998). Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. FEBS letters **438**(1-2): 1-4.
- Gallai N., J.-M. Salles, J. Settele, B.E. Vaissière (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecological economics **68**(3): 810-821.
- Ganeshan K., A. Chawla (2014). Metabolic regulation of immune responses. Annual review of immunology **32**: 609-634.
- Garrido P.M., K. Antúnez, M. Martín, M.P. Porrini, P. Zunino, M.J. Eguaras (2013). Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. Journal of Insect Physiology **59**(1): 113-119.
- Garzón A., P. Medina, F. Amor, E. Viñuela, F. Budia (2015). Toxicity and sublethal effects of six insecticides to last instar larvae and adults of the biocontrol agents *Chrysoperla carnea* (Stephens)(Neuroptera: Chrysopidae) and *Adalia bipunctata* (L.)(Coleoptera: Coccinellidae). Chemosphere **132**: 87-93.
- Ge L.-Q., J.-C. Wu, K.-F. Zhao, Y. Chen, G.-Q. Yang (2010). Induction of Nlvg and suppression of Nljhe gene expression in *Nilaparvata lugens* (Stål)(Hemiptera: Delphacidae) adult females and males exposed to two insecticides. Pesticide biochemistry and physiology **98**(2): 269-278.
- Georgel P., S. Naitza, C. Kappler, D. Ferrandon, D. Zachary, C. Swimmer, C. Kopczynski, G. Duyk, J.-M. Reichhart, J.A. Hoffmann (2001). *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. Developmental cell **1**(4): 503-514.

- Gerland P., A.E. Raftery, H. Ševčíková, N. Li, D. Gu, T. Spoorenberg, L. Alkema, B.K. Fosdick, J. Chunn, N. Lalic (2014). World population stabilization unlikely this century. Science **346**(6206): 234-237.
- Ghisla S., C. Thorpe (2004). Acyl-CoA dehydrogenases. European Journal of Biochemistry **271**(3): 494-508.
- Gibson G., S.V. Muse (2002). A primer of genome science. Sinauer Sunderland^ eMass Mass.
- Gibson U., C.A. Heid, P.M. Williams (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome research **6**(10): 995-1001.
- Gillespie J.P., M.R. Kanost, T. Trenczek (1997). Biological mediators of insect immunity. Annual review of entomology **42**(1): 611-643.
- Glavinic U., T. Tesovnik, J. Stevanovic, M. Zorc, I. Cizelj, Z. Stanimirovic, M. Narat (2019). Response of adult honey bees treated in larval stage with prochloraz to infection with *Nosema ceranae*. PeerJ **7**: e6325.
- Goblirsch M.J., M.S. Spivak, T.J. Kurtti (2013). A cell line resource derived from honey bee (*Apis mellifera*) embryonic tissues. PLoS One **8**(7).
- Goldberg A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Nature **426**(6968): 895.
- Görg A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, W. Weiss (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. ELECTROPHORESIS: An International Journal **21**(6): 1037-1053.
- Goulson D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. Journal of Applied Ecology **50**(4): 977-987.
- Gregorc A., J.D. Evans, M. Scharf, J.D. Ellis (2012). Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). Journal of Insect Physiology **58**(8): 1042-1049.
- Grimm L.M., B.A. Osborne (2000). The role of the proteasome in apoptosis, in: Hilt W. and Wolf D.H. (Eds.), *Proteasomes: the world of regulatory proteolysis*, CRC Press: 315-325.
- Groh C., J. Tautz, W. Rössler (2004). Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(12): 4268-4273.
- Grube A., D. Donaldson, T. Kiely, L. Wu (2011). Pesticides industry sales and usage. US EPA, Washington, DC.
- Guez D., H. Zhu, S.W. Zhang, M.V. Srinivasan (2010). Enhanced cholinergic transmission promotes recall in honeybees. Journal of insect physiology **56**(9): 1341-1348.
- Guo Y., C.L. Goodman, D.W. Stanley, B.C. Bonning (2020). Cell Lines for Honey Bee Virus Research.
- Gygi S.P., Y. Rochon, B.R. Franza, R. Aebersold (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Molecular and cellular biology **19**(3): 1720-1730.
- Halme A., M. Cheng, I.K. Hariharan (2010). Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in *Drosophila*. Current Biology **20**(5): 458-463.
- Han B., L. Zhang, M. Feng, Y. Fang, J. Li (2013). An integrated proteomics reveals pathological mechanism of honeybee (*Apis cerena*) sacbrood disease. Journal of proteome research **12**(4): 1881-1897.
- Hanley N., T.D. Breeze, C. Ellis, D. Goulson (2015). Measuring the economic value of pollination services: Principles, evidence and knowledge gaps. Ecosystem Services **14**: 124-132.
- Hayat K., M. Afzal, M.A. Aqueel, S. Ali, M.F. Saeed, Q.M. Khan, M. Ashfaq, C.A. Damalas (2018). Insecticide exposure affects DNA and antioxidant enzymes activity in honey bee species *Apis florea* and *A. dorsata*: Evidence from Punjab, Pakistan. Science of the Total Environment **635**: 1292-1301.

- Haydak M.H. (1970). Honey bee nutrition. Annual review of entomology **15**(1): 143-156.
- Hayes J.D., J.U. Flanagan, I.R. Jowsey (2005). Glutathione transferases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **45**: 51-88.
- He F., S. Sun, H. Tan, X. Sun, C. Qin, S. Ji, X. Li, J. Zhang, X. Jiang (2019). Chlorantraniliprole against the black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae): From biochemical/physiological to demographic responses. Scientific reports **9**(1): 1-17.
- Hedlin A.F. (1966). Prevention of insect-caused seed loss in Douglas-fir with systemic insecticides. The Forestry Chronicle **42**(1): 76-82.
- Helbing S., H.M.G. Lattorff, R.F. Moritz, A. Buttstedt (2017). Comparative analyses of the major royal jelly protein gene cluster in three *Apis* species with long amplicon sequencing. DNA Research **24**(3): 279-287.
- Helmer S.H., A. Kerbaol, P. Aras, C. Jumarie, M. Boily (2015). Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). Environmental Science and Pollution Research **22**(11): 8010-8021.
- Heming B.S. (2018). Insect development and evolution. Cornell University Press.
- Henry M., M. Beguin, F. Requier, O. Rollin, J.-F. Odoux, P. Aupinel, J. Aptel, S. Tchamitchian, A. Decourtye (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. Science **336**(6079): 348-350.
- Hesselbach H., R. Scheiner (2019a). The novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. Ecotoxicology **28**(3): 354-366.
- Hesselbach H., J. Seeger, F. Schilcher, M. Ankenbrand, R. Scheiner (2019b). Chronic exposure to the pesticide flupyradifurone can lead to premature onset of foraging in honeybees (*Apis mellifera*). Journal of Applied Ecology.
- Hink W., J. Butz (1985). Primary culture of antivenom gland cells. In vitro cellular & developmental biology **21**(6): 333-339.
- Hopwood J., A. Code, M. Vaughan, D. Biddinger, M. Shepherd, S.H. Black, E. Lee-Mäder, C. Mazzacano (2016). How neonicotinoids can kill bees. Xerces Society for Invertebrate Conservation, Portland, OR.
- Hourcade B., T.S. Muenz, J.-C. Sandoz, W. Rössler, J.-M. Devaud (2010). Long-term memory leads to synaptic reorganization in the mushroom bodies: a memory trace in the insect brain? Journal of Neuroscience **30**(18): 6461-6465.
- Huang J., S. Wu, G. Ye (2011). Molecular characterization of the sigma class glutathione S-transferase from *Chilo suppressalis* and expression analysis upon bacterial and insecticidal challenge. Journal of economic entomology **104**(6): 2046-2053.
- Huang L., M. Lu, G. Han, Y. Du, J. Wang (2016). Sublethal effects of chlorantraniliprole on development, reproduction and vitellogenin gene (*CsVg*) expression in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. Pest management science **72**(12): 2280-2286.
- Huang Z. (2010). Honey bee nutrition. American Bee Journal **150**(8): 773-776.
- Hultmark D. (2003). *Drosophila* immunity: paths and patterns. Current opinion in immunology **15**(1): 12-19.
- Huseth A.S., T.M. Chappell, A. Chitturi, A.L. Jacobson, G.G. Kennedy (2018). Insecticide resistance signals negative consequences of widespread neonicotinoid use on multiple field crops in the US cotton belt. Environmental science & technology **52**(4): 2314-2322.
- Ishihama Y., Y. Oda, T. Tabata, T. Sato, T. Nagasu, J. Rappsilber, M. Mann (2005). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. Molecular & Cellular Proteomics **4**(9): 1265-1272.

- Iwasa T., N. Motoyama, J.T. Ambrose, R.M. Roe (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. Crop Protection **23**(5): 371-378.
- Jackman M.R., W.T. Willis (1996). Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. American Journal of Physiology-Cell Physiology **270**(2): C673-C678.
- Jager T., A. Barsi, V. Ducrot (2013). Hormesis on life-history traits: is there such thing as a free lunch? Ecotoxicology **22**(2): 263-270.
- James R., J. Xu (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. Journal of invertebrate pathology **109**(2): 175-182.
- Jay S.C. (1963). The development of honeybees in their cells. Journal of Apicultural Research **2**(2): 117-134.
- Jeanguenat A. (2013). The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides. Pest management science **69**(1): 7-14.
- Jeschke P., R. Nauen (2008). Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. Pest Management Science: formerly Pesticide Science **64**(11): 1084-1098.
- Jeschke P., R. Nauen, O. Gutbrod, M.E. Beck, S. Matthiesen, M. Haas, R. Velten (2015). Flupyradifurone (Sivanto™) and its novel butenolide pharmacophore: Structural considerations☆. Pesticide Biochemistry and Physiology **121**: 31-38.
- Jia M., G. Cao, Y. Li, X. Tu, G. Wang, X. Nong, D.W. Whitman, Z. Zhang (2016). Biochemical basis of synergism between pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and insecticide chlorantraniliprole in *Locusta migratoria* (Meyen). Scientific reports **6**(1): 1-15.
- Johnson R.M. (2015). Honey bee toxicology. Annual review of entomology **60**.
- Johnson R.M., M.D. Ellis, C.A. Mullin, M. Frazier (2010). Pesticides and honey bee toxicity—USA. Apidologie **41**(3): 312-331.
- Kaiser P., V. Moncollin, D.J. Clarke, M.H. Watson, B.L. Bertolaet, S.I. Reed, E. Bailly (1999). Cyclin-dependent kinase and Cks/Suc1 interact with the proteasome in yeast to control proteolysis of M-phase targets. Genes & Development **13**(9): 1190-1202.
- Kang H.J., S.-K. Jung, S.J. Kim, S.J. Chung (2008). Structure of human α -enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography **64**(6): 651-657.
- Karlsson C., A.M. Korayem, C. Scherfer, O. Loseva, M.S. Dushay, U. Theopold (2004). Proteomic analysis of the *Drosophila* larval hemolymph clot. Journal of Biological Chemistry **279**(50): 52033-52041.
- Kaufman T.C., R. Lewis, B. Wakimoto (1980). Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: the homoeotic gene complex in polytene chromosome interval 84a-B. Genetics **94**(1): 115-133.
- Kellner W.A., E. Ramos, K. Van Bortle, N. Takenaka, V.G. Corces (2012). Genome-wide phosphoacetylation of histone H3 at *Drosophila* enhancers and promoters. Genome research **22**(6): 1081-1088.
- Kim Y.H., D.J. Cha, J.W. Jung, H.W. Kwon, S.H. Lee (2012). Molecular and kinetic properties of two acetylcholinesterases from the western honey bee, *Apis mellifera*. PLoS One **7**(11).
- Kim Y.H., S.H. Lee (2013). Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? Insect biochemistry and molecular biology **43**(1): 47-53.
- King-Jones K., C.S. Thummel (2005). Nuclear receptors—a perspective from *Drosophila*. Nature Reviews Genetics **6**(4): 311-323.
- Kirsch-Volders M. (2012). Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of industrial pollutants. Springer Science & Business Media.
- Kisselev A.F., A.L. Goldberg (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. Chemistry & biology **8**(8): 739-758.

- Kitagishi Y., N. Okumura, H. Yoshida, Y. Nishimura, J.-i. Takahashi, S. Matsuda (2011). Long-term cultivation of in vitro *Apis mellifera* cells by gene transfer of human c-myc proto-oncogene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **47**(7): 451-453.
- Klein A.-M., B.E. Vaissiere, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen, T. Tscharntke (2006). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B* **274**(1608): 303-313.
- Kleinjans H., S. Van Keulen, T. Blacquièrre, C. Booi, C. Hok-A-Hin, A. Cornelissen, C. van Dooremalen (2012). The possible role of honey bees in the spread of pollen from field trials, Ameco Environmental Services & Plant Research International.
- Klionsky D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of cell science* **118**(1): 7-18.
- Kocaturk N.M., D. Gozuacik (2018). Crosstalk between mammalian autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Frontiers in cell and developmental biology* **6**: 128.
- Kockel L., G. Vorbrüggen, H. Jäckle, M. Mlodzik, D. Bohmann (1997). Requirement for *Drosophila* 14-3-3 zeta in Raf-dependent photoreceptor development. *Genes & Development* **11**(9): 1140-1147.
- Kodrík D., R. Socha (2005). The effect of insecticide on adipokinetic hormone titre in the insect body. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* **61**(11): 1077-1082.
- Koehler C.M., D. Leuenberger, S. Merchant, A. Renold, T. Junne, G. Schatz (1999). Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(5): 2141-2146.
- Koepp D.M., J.W. Harper, S.J. Elledge (1999). How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* **97**(4): 431-434.
- Kozlowski L.P. (2016). IPC–isoelectric point calculator. *Biology direct* **11**(1): 55.
- Krebs S., M. Fischaleck, H. Blum (2009). A simple and loss-free method to remove TRIzol contaminations from minute RNA samples. *Analytical biochemistry* **387**(1): 136-138.
- Krupke C.H., G.J. Hunt, B.D. Eitzer, G. Andino, K. Given (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS one* **7**(1): e29268.
- Kubo T., M. Sasaki, J. Nakamura, H. Sasagawa, K. Ohashi, H. Takeuchi, S. Natori (1996). Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *The Journal of Biochemistry* **119**(2): 291-295.
- Kummu M., H. De Moel, M. Porkka, S. Siebert, O. Varis, P.J. Ward (2012). Lost food, wasted resources: Global food supply chain losses and their impacts on freshwater, cropland, and fertiliser use. *Science of the total environment* **438**: 477-489.
- Kwon D., J. Clark, S. Lee (2010). Extensive gene duplication of acetylcholinesterase associated with organophosphate resistance in the two-spotted spider mite. *Insect molecular biology* **19**(2): 195-204.
- Lai T., J. Su (2011). Effects of chlorantraniliprole on development and reproduction of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Journal of Pest Science* **84**(3): 381.
- Larc C. (1983). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. *Miscellaneous pesticides*. International Agency for Research on Cancer, Lyon France.
- Le T.P., L.T. Vuong, A.-R. Kim, Y.-C. Hsu, K.-W. Choi (2016). 14-3-3 proteins regulate Tctp–Rheb interaction for organ growth in *Drosophila*. *Nature communications* **7**: 11501.
- Leach A., J. Mumford (2008). Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. *Environmental Pollution* **151**(1): 139-147.
- Lee C.-Y., E.H. Baehrecke (2001). Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development* **128**(8): 1443-1455.
- Lemaitre B., J. Hoffmann (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* **25**: 697-743.

- Lemaitre B., J.-M. Reichhart, J.A. Hoffmann (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(26): 14614-14619.
- Leong X.-Y., G.V. Singham, A.C. Shu-Chien, S.L. Doggett, C.-Y. Lee (2020). Influences of Exposure Time and Mortality Assessment Interval on Bioassay Results of Insecticide-Resistant Tropical Bed Bugs (Hemiptera: Cimicidae). Insects **11**(9): 640.
- Leuenberger D., N.A. Bally, G. Schatz, C.M. Koehler (1999). Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. The EMBO journal **18**(17): 4816-4822.
- Lewis E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*, *Genes, Development and Cancer*, Springer: 205-217.
- Lewis J.A., E.A. Gehman, C.E. Baer, D.A. Jackson (2013). Alterations in gene expression in *Caenorhabditis elegans* associated with organophosphate pesticide intoxication and recovery. BMC genomics **14**(1): 291.
- Li B., X. Yu, S. Gui, Y. Xie, X. Zhao, J. Hong, Q. Sun, X. Sang, L. Sheng, Z. Cheng (2014). Molecular mechanisms of phoxim-induced silk gland damage and TiO₂ nanoparticle-attenuated damage in *Bombyx mori*. Chemosphere **104**: 221-227.
- Li J., J. Yuan (2008). Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene **27**(48): 6194-6206.
- Li X., M.A. Schuler, M.R. Berenbaum (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. Annual review of entomology **52**.
- Li Z., M. Li, J. He, X. Zhao, V. Chaimanee, W.-F. Huang, H. Nie, Y. Zhao, S. Su (2017). Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honey bees: A comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. Pesticide biochemistry and physiology **140**: 1-8.
- Liang P.-Z., K.-S. Ma, X.-W. Chen, C.-Y. Tang, J. Xia, H. Chi, X.-W. Gao (2019). Toxicity and sublethal effects of flupyradifurone, a novel butenolide insecticide, on the development and fecundity of *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). Journal of economic entomology **112**(2): 852-858.
- Ling D., P.M. Salvaterra (2011). Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis. PloS one **6**(3): e17762.
- Liu C., W. Zhou, Z. Li, J. Ren, X. Li, S. Li, Q. Liu, F. Song, A. Hao, F. Wang (2020). Melatonin Protects Neural Stem Cells Against Tri-Ortho-Cresyl Phosphate-Induced Autophagy. Frontiers in Molecular Neuroscience **13**: 25.
- Liu H., Q. Jia, G. Tettamanti, S. Li (2013). Balancing crosstalk between 20-hydroxyecdysone-induced autophagy and caspase activity in the fat body during *Drosophila* larval-prepupal transition. Insect biochemistry and molecular biology **43**(11): 1068-1078.
- Liu S., F. Liu, H. Jia, Y. Yan, H. Wang, X. Guo, B. Xu (2016). A glutathione S-transferase gene associated with antioxidant properties isolated from *Apis cerana cerana*. The Science of Nature **103**(5-6): 43.
- Lo N., R.S. Gloag, D.L. Anderson, B.P. Oldroyd (2010). A molecular phylogeny of the genus *Apis* suggests that the Giant Honey Bee of the Philippines, *A. breviligula* Maa, and the Plains Honey Bee of southern India, *A. indica* Fabricius, are valid species. Systematic Entomology **35**(2): 226-233.
- Loewith R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J.L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe, M.N. Hall (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. Molecular cell **10**(3): 457-468.
- Loucif-Ayad W., N. Aribi, N. Soltani (2008). Evaluation of secondary effects of some acaricides on *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera, Apidae): acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities. Eur. J. Sci. Res **21**(4): 642-649.

- Louradour I., A. Sharma, I. Morin-Poulard, M. Letourneau, A. Vincent, M. Crozatier, N. Vanzo (2017). Reactive oxygen species-dependent Toll/NF- κ B activation in the *Drosophila* hematopoietic niche confers resistance to wasp parasitism. *Elife* 6: e25496.
- Lourenço A.P., M.M. Florecki, Z.L.P. Simões, J.D. Evans (2018). Silencing of *Apis mellifera* dorsal genes reveals their role in expression of the antimicrobial peptide defensin-1. *Insect molecular biology* 27(5): 577-589.
- Löw P., K. Bussell, S. Dawson, M. Billett, R. Mayer, S. Reynolds (1997). Expression of a 26S proteasome ATPase subunit, MS73, in muscles that undergo developmentally programmed cell death, and its control by ecdysteroid hormones in the insect *Manduca sexta*. *FEBS letters* 400(3): 345-349.
- Löw P., S. Reynolds, M. Sass (2001). Proteolytic activity of 26S proteasomes isolated from muscles of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: differences between surviving muscles and those undergoing developmentally programmed cell death. *Acta Biologica Hungarica* 52(4): 435-442.
- Lukaszewicz-Hussain A. (2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity—Short review. *Pesticide biochemistry and physiology* 98(2): 145-150.
- Lutz C.C., G.E. Robinson (2013). Activity-dependent gene expression in honey bee mushroom bodies in response to orientation flight. *Journal of Experimental Biology* 216(11): 2031-2038.
- Machado I. (2004). Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. *Fortaleza (CE): Federal University of Ceara*: 255-281.
- Maden M., M. Hind (2003). Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 226(2): 237-244.
- Mallqui K.V., J. Vieira, R. Guedes, L. Gontijo (2014). Azadirachtin-induced hormesis mediating shift in fecundity-longevity trade-off in the Mexican bean weevil (*Chrysomelidae: Bruchinae*). *Journal of economic entomology* 107(2): 860-866.
- Mandi M., S. Khatun, P. Rajak, A. Mazumdar, S. Roy (2020). Potential risk of organophosphate exposure in male reproductive system of a non-target insect model *Drosophila melanogaster*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 74: 103308.
- Mane-Padros D., F. Borrás-Castells, X. Belles, D. Martín (2012). Nuclear receptor HR4 plays an essential role in the ecdysteroid-triggered gene cascade in the development of the hemimetabolous insect *Blattella germanica*. *Mol Cell Endocrinol* 348(1): 322-330.
- Manjon C., B.J. Troczka, M. Zaworra, K. Beadle, E. Randall, G. Hertlein, K.S. Singh, C.T. Zimmer, R.A. Homem, B. Lueke (2018). Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Current Biology* 28(7): 1137-1143. e1135.
- Mao W., M.A. Schuler, M.R. Berenbaum (2017). Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(10): 2538-2543.
- Maori E., I.C. Navarro, H. Boncristiani, D.J. Seilly, K.L.M. Rudolph, A. Sapetschnig, C.-C. Lin, J.E. Ladbury, J.D. Evans, J.L. Heeney (2019). A secreted RNA binding protein forms RNA-stabilizing granules in the honeybee royal jelly. *Molecular cell* 74(3): 598-608. e596.
- Mărgăoan R., L.A. Mărghitaș, D.S. Dezmirean, F.V. Dulf, A. Bunea, S.A.a. Socaci, O. Bobiș (2014). Predominant and secondary pollen botanical origins influence the carotenoid and fatty acid profile in fresh honeybee-collected pollen. *Journal of agricultural and food chemistry* 62(27): 6306-6316.
- Marshall R.S., F. Li, D.C. Gemperline, A.J. Book, R.D. Vierstra (2015). Autophagic degradation of the 26S proteasome is mediated by the dual ATG8/ubiquitin receptor RPN10 in *Arabidopsis*. *Molecular cell* 58(6): 1053-1066.

- McConnell J.E., J.F. Armstrong, P.E. Hodges, J.B. Bard (1995). The Mouse 14-3-3 ϵ Isoform, a Kinase Regulator Whose Expression Pattern Is Modulated in Mesenchyme and Neuronal Differentiation. Developmental biology **169**(1): 218-228.
- McGinnis W., R. Krumlauf (1992). Homeobox genes and axial patterning. Cell **68**(2): 283-302.
- Medrzycki P., F. Sgolastra, L. Bortolotti, G. Bogo, S. Tosi, E. Padovani, C. Porrini, A.G. Sabatini (2010). Influence of brood rearing temperature on honey bee development and susceptibility to poisoning by pesticides. Journal of Apicultural Research **49**(1): 52-59.
- Mena B., M. José, R. Alarcón, J. Arnau Gras, R. Bono Cabré, R. Bendayan (2017). Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? Psicothema, 2017, vol. 29, num. 4, p. 552-557.
- Meng X., N. Zhang, X. Yang, L. Miao, H. Jiang, C. Ji, B. Xu, K. Qian, J. Wang (2020). Sublethal effects of chlorantraniliprole on molting hormone levels and mRNA expressions of three Halloween genes in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. Chemosphere **238**: 124676.
- Miao L.-J., F.-X. Huang, Z.-T. Sun, R.-X. Zhang, S.-F. Huang, J. Wang (2014). Stat3 inhibits Beclin 1 expression through recruitment of HDAC3 in nonsmall cell lung cancer cells. Tumor Biology **35**(7): 7097-7103.
- Michener C.D. (1969). Comparative social behavior of bees. Annual review of entomology **14**(1): 299-342.
- Miller T., J. Kennedy (1972). Flight motor activity of houseflies as affected by temperature and insecticides. Pesticide Biochemistry and Physiology **2**(2): 206-222.
- Misra J.R., M.A. Horner, G. Lam, C.S. Thummel (2011). Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. Genes & development **25**(17): 1796-1806.
- Mitton G.A., N. Szawarski, F.M. Mitton, A. Iglesias, M.J. Eguaras, S.R. Ruffinengo, M.D. Maggi (2020). Impacts of dietary supplementation with p-coumaric acid and indole-3-acetic acid on survival and biochemical response of honey bees treated with tau-fluvalinate. Ecotoxicology and environmental safety **189**: 109917.
- Mizushima N. (2007). Autophagy: process and function. Genes & development **21**(22): 2861-2873.
- Mokranjac D., A. Berg, A. Adam, W. Neupert, K. Hell (2007). Association of the Tim14·Tim16 subcomplex with the TIM23 translocase is crucial for function of the mitochondrial protein import motor. Journal of Biological Chemistry **282**(25): 18037-18045.
- Moore B. (1967). First description of 14-3-3 proteins in mammalian brains. Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration: 343-359.
- Moret Y., P. Schmid-Hempel (2000). Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. Science **290**(5494): 1166-1168.
- Moser V.C. (1995). Comparisons of the acute effects of cholinesterase inhibitors using a neurobehavioral screening battery in rats. Neurotoxicology and teratology **17**(6): 617-625.
- Mozhui K., B.M. Snively, S.R. Rapp, R.B. Wallace, R.W. Williams, K.C. Johnson (2017). Genetic analysis of mitochondrial ribosomal proteins and cognitive aging in postmenopausal women. Frontiers in genetics **8**: 127.
- Mueller N.D., J.S. Gerber, M. Johnston, D.K. Ray, N. Ramankutty, J.A. Foley (2012). Closing yield gaps through nutrient and water management. Nature **490**(7419): 254-257.
- Mueller N.D., P.C. West, J.S. Gerber, G.K. MacDonald, S. Polasky, J.A. Foley (2014). A tradeoff frontier for global nitrogen use and cereal production. Environmental Research Letters **9**(5): 054002.
- Müller C. (2018). Impacts of sublethal insecticide exposure on insects—Facts and knowledge gaps. Basic and Applied Ecology **30**: 1-10.
- Müller T., M.A. Gesing, M. Segeler, C. Müller (2019). Sublethal insecticide exposure of an herbivore alters the response of its predator. Environmental Pollution **247**: 39-45.

- Myers E.M. (2003). The circadian control of eclosion. Chronobiol Int **20**(5): 775-794.
- Myllymäki H., M. Rämetsä (2014). JAK/STAT pathway in Drosophila immunity. Scandinavian journal of immunology **79**(6): 377-385.
- Nagai T., S.-i. Kawabata (2000). A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. Journal of Biological Chemistry **275**(38): 29264-29267.
- Nakamura A., R. Stiebler, M.R. Fantappiè, E. Fialho, H. Masuda, M.F. Oliveira (2007). Effects of retinoids and juvenoids on moult and on phenoloxidase activity in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. Acta Tropica **103**(3): 222-230.
- Nakamura T., T. MORITA, S. IWANAGA (1985). Intracellular proclotting enzyme in limulus (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes: its purification and properties. The Journal of Biochemistry **97**(6): 1561-1574.
- Nappi A., L. Kohler, M. Mastore (2004). Signaling pathways implicated in the cellular innate immune responses of *Drosophila*. Invertebrate Survival Journal **1**(1): 5-33.
- Nauen R., U. Ebbinghaus-Kintscher, R. Schmuck (2001). Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Pest Management Science: formerly Pesticide Science **57**(7): 577-586.
- Nauen R., P. Jeschke, R. Velten, M.E. Beck, U. Ebbinghaus-Kintscher, W. Thielert, K. Wölfel, M. Haas, K. Kunz, G. Raupach (2015). Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. Pest management science **71**(6): 850-862.
- Němec V., D. Kodrík, S. Matolín, H. Laufer (1993). Juvenile hormone-like effects of retinoic acid in insect metamorphosis, embryogenesis and reproduction. Journal of insect physiology **39**(12): 1083-1093.
- Nguyen T.N., B.S. Padman, J. Usher, V. Oorschot, G. Ramm, M. Lazarou (2016). Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome–lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. Journal of Cell Biology **215**(6): 857-874.
- Nie L., G. Wu, W. Zhang (2006). Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: a multiple regression to identify sources of variations. Biochemical and biophysical research communications **339**(2): 603-610.
- Nijhout H.F. (1998). Insect hormones. Princeton University Press.
- Nikolić T.V., D. Kojić, S. Orčić, E.L. Vukašinić, D.P. Blagojević, J. Purać (2019). Laboratory bioassays on the response of honey bee (*Apis mellifera* L.) glutathione S-transferase and acetylcholinesterase to the oral exposure to copper, cadmium, and lead. Environmental Science and Pollution Research **26**(7): 6890-6897.
- Nolan T., R.E. Hands, S.A. Bustin (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nature protocols **1**(3): 1559.
- OECD (2016). Guidance Document on Honey Bee (*Apis mellifera*) Larval Toxicity Test Following Repeated Exposure, in: development O.f.e.c.-o.a. (Ed.).
- Oerke E.-C. (2006). Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science **144**(1): 31-43.
- Oerke E.-C., H.-W. Dehne (2004). Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. Crop protection **23**(4): 275-285.
- Ohashi K., S. Natori, T. Kubo (1997). Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. European journal of biochemistry **249**(3): 797-802.
- Oldroyd B., S. Wongsiri (2006). Asian Honey Bees: Biology. Conservation, and Human Interactions.
- Ollerton J., R. Winfree, S. Tarrant (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? Oikos **120**(3): 321-326.
- Oomen P., A. De Ruijter, J. Van Der Steen (1992). Method for honeybee brood feeding tests with insect growth-regulating insecticides. EPPO Bulletin **22**(4): 613-616.

- Orlowski R.Z. (1999). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. Cell death and differentiation **6**(4): 303.
- Ou Q., J. Zeng, N. Yamanaka, C. Brakken-Thal, M.B. O'Connor, K. King-Jones (2016). The insect prothoracic gland as a model for steroid hormone biosynthesis and regulation. Cell reports **16**(1): 247-262.
- Özdemir S., S. Altun, H. Arslan (2018). Imidacloprid exposure cause the histopathological changes, activation of TNF- α , iNOS, 8-OHdG biomarkers, and alteration of caspase 3, iNOS, CYP1A, MT1 gene expression levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Toxicology reports **5**: 125-133.
- Pan X., G. Zhou, J. Wu, G. Bian, P. Lu, A.S. Raikhel, Z. Xi (2012). Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(1): E23-E31.
- Park H.G., B.Y. Kim, M.J. Park, Y. Deng, Y.S. Choi, K.S. Lee, B.R. Jin (2019a). Antibacterial activity of major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. Journal of Asia-Pacific Entomology **22**(3): 737-741.
- Park M.J., B.Y. Kim, H.G. Park, Y. Deng, H.J. Yoon, Y.S. Choi, K.S. Lee, B.R. Jin (2019b). Major royal jelly protein 2 acts as an antimicrobial agent and antioxidant in royal jelly. Journal of Asia-Pacific Entomology **22**(3): 684-689.
- Parker R., M.M. Guarna, A.P. Melathopoulos, K.-M. Moon, R. White, E. Huxter, S.F. Pernal, L.J. Foster (2012). Correlation of proteome-wide changes with social immunity behaviors provides insight into resistance to the parasitic mite, *Varroa destructor*, in the honey bee (*Apis mellifera*). Genome biology **13**(9): R81.
- Paschen S.A., W. Neupert (2001). Protein import into mitochondria. IUBMB life **52**(3-5): 101-112.
- Paschen S.A., U. Rothbauer, K. Káldi, M.F. Bauer, W. Neupert, M. Brunner (2000). The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. The EMBO journal **19**(23): 6392-6400.
- Patil V.K., M. David (2010). Behavioral and morphological endpoints: as an early response to sublethal malathion intoxication in the freshwater fish, *Labeo rohita*. Drug and chemical toxicology **33**(2): 160-165.
- Pattingre S., L. Espert, M. Biard-Piechaczyk, P. Codogno (2008). Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. Biochimie **90**(2): 313-323.
- Patton W.F. (2002). Detection technologies in proteome analysis. Journal of Chromatography B **771**(1-2): 3-31.
- Pearce E.L., E.J. Pearce (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. Immunity **38**(4): 633-643.
- Pestka J., H.-R. Zhou (2006). Toll-like receptor priming sensitizes macrophages to proinflammatory cytokine gene induction by deoxynivalenol and other toxicants. Toxicological Sciences **92**(2): 445-455.
- Pettis J.S., J. Johnson, G. Dively (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. Naturwissenschaften **99**(2): 153-158.
- Pimentel D. (2009). Pesticides and pest control, Integrated pest management: innovation-development process, Springer: 83-87.
- Pimentel D., M. Burgess (2014). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States, Integrated pest management, Springer: 47-71.
- Pimentel D., A. Greiner (1997). Environmental and socio-economic costs of pesticide use. Techniques for reducing pesticide use: Economic and environmental benefits: 51-78.
- Pine M.D., J.K. Hiney, B. Lee, W.L. Dees (2008). The pyrethroid pesticide esfenvalerate suppresses the afternoon rise of luteinizing hormone and delays puberty in female rats. Environmental health perspectives **116**(9): 1243-1247.

- Pistorius J., G. Bischoff, U. Heimbach (2008). Bienenvergiftung durch Wirkstoffabrieb von Saatgut-behandlungsmitteln während der Maisaussaat im Frühjahr. Journal für Kulturpflanzen **61**: 2009.
- Popp J., K. Pető, J. Nagy (2013). Pesticide productivity and food security. A review. Agronomy for sustainable development **33**(1): 243-255.
- Qi S., J.E. Casida (2013). Species differences in chlorantraniliprole and flubendiamide insecticide binding sites in the ryanodine receptor. Pesticide biochemistry and physiology **107**(3): 321-326.
- Raby M., M. Nowierski, D. Perlov, X. Zhao, C. Hao, D.G. Poirier, P.K. Sibley (2018). Acute toxicity of 6 neonicotinoid insecticides to freshwater invertebrates. Environmental toxicology and chemistry **37**(5): 1430-1445.
- Ramakrishnan S.R., C. Vogel, J.T. Prince, R. Wang, Z. Li, L.O. Penalva, M. Myers, E.M. Marcotte, D.P. Miranker (2009). Integrating shotgun proteomics and mRNA expression data to improve protein identification. Bioinformatics **25**(11): 1397-1403.
- Rand E.d., S. Smit, M. Beukes, Z. Apostolides, C. Pirk, S. Nicolson (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. Sci Rep **5**: 11779.
- Randolt K., O. Gimple, J. Geissendörfer, J. Reinders, C. Prusko, M.J. Mueller, S. Albert, J. Tautz, H. Beier (2008). Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America **69**(4): 155-167.
- Rattner B.A., S.D. Michael (1985). Organophosphorus insecticide induced decrease in plasma luteinizing hormone concentration in white-footed mice. Toxicology letters **24**(1): 65-69.
- Requier F., L. Garnery, P.L. Kohl, H.K. Njovu, C.W. Pirk, R.M. Crewe, I. Steffan-Dewenter (2019). The conservation of native honey bees is crucial. Trends in ecology & evolution.
- Richard S. (2010). Food bill would rise \$70 billion a year without pesticides. Farmers Guardian **10**: 11.
- Riddiford L.M. (1994). Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions, Advances in insect physiology, Elsevier: 213-274.
- Rinkevich F.D., J.W. Margotta, J.M. Pittman, R.G. Danka, M.R. Tarver, J.A. Ottea, K.B. Healy (2015). Genetics, synergists, and age affect insecticide sensitivity of the honey bee, *Apis mellifera*. PLoS One **10**(10).
- Rogulja-Ortmann A., S. Renner, G.M. Technau (2008). Antagonistic roles for Ultrabithorax and Antennapedia in regulating segment-specific apoptosis of differentiated motoneurons in the *Drosophila* embryonic central nervous system. Development **135**(20): 3435-3445.
- Rortais A., G. Arnold, M.-P. Halm, F. Touffet-Briens (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. Apidologie **36**(1): 71-83.
- Rossi C.d.A., T.C. Roat, D.A. Tavares, P. Cintra-Socolowski, O. Malaspina (2013). Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Microscopy research and technique **76**(5): 552-558.
- Rounsevell M., J. Annetts, E. Audsley, T. Mayr, I. Reginster (2003). Modelling the spatial distribution of agricultural land use at the regional scale. Agriculture, Ecosystems & Environment **95**(2-3): 465-479.
- Rusten T.E., K. Lindmo, G. Juhász, M. Sass, P.O. Seglen, A. Brech, H. Stenmark (2004). Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. Developmental cell **7**(2): 179-192.

- Ruttner F. (2003). Naturgeschichte der Honigbienen:[Biologie, Sozialleben, Arten und Verbreitung]. Kosmos.
- Sadava D., D.M. Hillis, H.C. Heller, S.D. Hacker (2019a). Nervenzellen, Gliazellen und Nervensysteme, Purves Biologie, Springer-Verlag, 10: 1361-1363.
- Sadava D., D.M. Hillis, H.C. Heller, S.D. Hacker (2019b). Hormone der Tiere, Purves Biologie, Springer-Verlag, 10: 1227.
- Sadava D., D.M. Hillis, H.C. Heller, S.D. Hacker (2019c). Muskeln und Skelette, Purves Biologie, Springer-Verlag, 10: 1443.
- Sadava D., D.M. Hillis, H.C. Heller, S.D. Hacker (2019d). Genome, Purves Biologie, Springer-Verlag, 10: 536f.
- Saelens X., N. Festjens, L.V. Walle, M. Van Gorp, G. Van Loo, P. Vandenabeele (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. Oncogene **23**(16): 2861-2874.
- Sakurai S., M. Kaya (1998). Hemolymph ecdysteroid titer and ecdysteroid-dependent developmental events in the last-larval stadium of the silkworm, *Bombyx mori*: role of low ecdysteroid titer in larval-pupal metamorphosis and a reappraisal of the head critical period. Journal of Insect Physiology **44**(10): 867-881.
- Sánchez-Bayo F., H.A. Tennekes, K. Goka (2013). Impact of systemic insecticides on organisms and ecosystems. Insecticides-development of safer and more effective technologies. Croatia, InTech: 365-414.
- Sanger F., S. Nicklen, A.R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the national academy of sciences **74**(12): 5463-5467.
- Sass M., J. Kovacs (1975). Ecdysterone and an analogue of juvenile hormone on the autophagy in the cells of fat body of mamestra brassicae. Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae **26**(3-4): 189.
- Sastry B.V., C. Sadavongvivad (1978). Cholinergic systems in non-nervous tissues. Pharmacological Reviews **30**: 65-132.
- Sawby R., M. Klowden, R. Sjogren (1992). Sublethal effects of larval methoprene exposure on adult mosquito longevity. Journal of the American Mosquito Control Association **8**(3): 290-292.
- Scharlaken B., D.C. de Graaf, K. Goossens, M. Brunain, L.J. Peelman, F.J. Jacobs (2008). Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. Journal of insect Science **8**(1): 33.
- Scharlaken B., D.C. De Graaf, S. Memmi, B. Devreese, J. Van Beeumen, F.J. Jacobs (2007). Differential protein expression in the honey bee head after a bacterial challenge. Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America **65**(4): 223-237.
- Schmider E., M. Ziegler, E. Danay, L. Beyer, M. Bühner (2010). Is it really robust? Methodology.
- Schmidt M., D. Finley (2014). Regulation of proteasome activity in health and disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1843**(1): 13-25.
- Schneuwly S., W.J. Gehring (1985). Homeotic transformation of thorax into head: developmental analysis of a new Antennapedia allele in *Drosophila melanogaster*. Developmental biology **108**(2): 377-386.
- Schur A., I. Tornier, D. Brasse, W. Muhlen, W. Von der Ohe, K. Wallner, M. Wehling (2003). Honey bee brood ring-test in 2002: method for the assessment of side effects of plant protection products on the honey bee brood under semi-field conditions. Bulletin of Insectology **56**: 91-96.
- Schwanhäusser B., D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen, M. Selbach (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. Nature **473**(7347): 337.

- Seeley T.D. (2014). Honeybee ecology: a study of adaptation in social life. Princeton University Press.
- Sgolastra F., X. Arnan, R. Cabbri, G. Isani, P. Medrzycki, D. Teper, J. Bosch (2018). Combined exposure to sublethal concentrations of an insecticide and a fungicide affect feeding, ovary development and longevity in a solitary bee. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **285**(1885): 20180887.
- Shahnazari S., J.H. Brumell (2011). Mechanisms and consequences of bacterial targeting by the autophagy pathway. Current opinion in microbiology **14**(1): 68-75.
- Shandala T., J.M. Woodcock, Y. Ng, L. Biggs, E.M. Skoulakis, D.A. Brooks, A.F. Lopez (2011). Drosophila 14-3-3 ϵ has a crucial role in anti-microbial peptide secretion and innate immunity. J Cell Sci **124**(13): 2165-2174.
- Shang Q., Y. Pan, K. Fang, J. Xi, A. Wong, J.A. Brennan, C. Cao (2014). Extensive Ace2 duplication and multiple mutations on Ace1 and Ace2 are related with high level of organophosphates resistance in *Aphis gossypii*. Environmental toxicology **29**(5): 526-533.
- Shapira M., C.K. Thompson, H. Soreq, G.E. Robinson (2001). Changes in neuronal acetylcholinesterase gene expression and division of labor in honey bee colonies. Journal of Molecular Neuroscience **17**(1): 1-12.
- Sharova L.V., A.A. Sharov, T. Nedorezov, Y. Piao, N. Shaik, M.S. Ko (2009). Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. DNA research **16**(1): 45-58.
- Shen S., M. Niso-Santano, S. Adjemian, T. Takehara, S.A. Malik, H. Minoux, S. Souquere, G. Mariño, S. Lachkar, L. Senovilla (2012). Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity. Molecular cell **48**(5): 667-680.
- Shi T.-F., Y.-F. Wang, F. Liu, L. Qi, L.-S. Yu (2017a). Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honey bees (Hymenoptera: Apidae). Journal of economic entomology **110**(6): 2283-2289.
- Shiferaw B., M. Smale, H.-J. Braun, E. Duveiller, M. Reynolds, G. Muricho (2013). Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. Food Security **5**(3): 291-317.
- Siegfried B.D. (1993). Comparative toxicity of pyrethroid insecticides to terrestrial and aquatic insects. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal **12**(9): 1683-1689.
- Simon J.Y. (2014). The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC press.
- Singh A., A. Shah, A. Brockmann (2018). Honey bee foraging induces upregulation of early growth response protein 1, hormone receptor 38 and candidate downstream genes of the ecdysteroid signalling pathway. Insect molecular biology **27**(1): 90-98.
- Singh N., V. Lawana, J. Luo, P. Phong, A. Abdalla, B. Palanisamy, D. Rokad, S. Sarkar, H. Jin, V. Anantharam (2018). Organophosphate pesticide chlorpyrifos impairs STAT1 signaling to induce dopaminergic neurotoxicity: Implications for mitochondria mediated oxidative stress signaling events. Neurobiology of disease **117**: 82-113.
- Skoulakis E.M., R.L. Davis (1996). Olfactory learning deficits in mutants for leonardo, a *Drosophila* gene encoding a 14-3-3 protein. Neuron **17**(5): 931-944.
- Skoulakis E.M., R.L. Davis (1998). 14-3-3 proteins in neuronal development and function. Molecular neurobiology **16**(3): 269-284.
- Slotkin T.A., F.J. Seidler (2012). Developmental neurotoxicity of organophosphates targets cell cycle and apoptosis, revealed by transcriptional profiles in vivo and in vitro. Neurotoxicology and teratology **34**(2): 232-241.
- Słowińska M., J. Nynca, B. Bąk, J. Wilde, M. Siuda, A. Ciereszko (2019). 2D-DIGE proteomic analysis reveals changes in haemolymph proteome of 1-day-old honey bee (*Apis*

- mellifera) workers in response to infection with Varroa destructor mites. Apidologie **50**(5): 632-656.
- Snodgrass R.E. (1925). Anatomy and physiology of the honeybee.
- Söderhäll K., L. Cerenius (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current opinion in immunology **10**(1): 23-28.
- Song F., K. Xie (2012). Calcium-dependent neutral cysteine protease and organophosphate-induced delayed neuropathy. Chemico-biological interactions **200**(2-3): 114-118.
- Sorrentino R.P., J.P. Melk, S. Govind (2004). Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in Drosophila. Genetics **166**(3): 1343-1356.
- Squire J.M. (2016). Muscle contraction: Sliding filament history, sarcomere dynamics and the two Huxleys. Global cardiology science & practice **2016**(2).
- Stebbing A. (1997). A theory for growth hormesis. Belle Newsletter **6**.
- Steller H. (2008). Regulation of apoptosis in Drosophila. Cell death and differentiation **15**(7): 1132.
- Struhl G. (1981). A homoeotic mutation transforming leg to antenna in Drosophila. Nature **292**(5824): 635.
- Sur R., A. Stork (2003). Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. Bulletin of Insectology **56**: 35-40.
- Suzuki K., Y. Ohsumi (2007). Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS letters **581**(11): 2156-2161.
- Sykitotis G.P., D. Bohmann (2008). Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in Drosophila. Dev Cell **14**(1): 76-85.
- Tadei R., C.E. Domingues, J.B. Malaquias, E.V. Camilo, O. Malaspina, E.C. Silva-Zacarin (2019). Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. Scientific Reports **9**(1): 1-11.
- Tan K., C. Wang, S. Dong, X. Li, J.C. Nieh (2017). The pesticide flupyradifurone impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. Scientific reports **7**(1): 1-9.
- Tarek H., M.M. Hamiduzzaman, N. Morfin, E. Guzman-Novoa (2018). Sub-lethal doses of neonicotinoid and carbamate insecticides reduce the lifespan and alter the expression of immune health and detoxification related genes of honey bees (*Apis mellifera*). Genetics and Molecular Research **17**(2).
- Tasdemir E., M.C. Maiuri, L. Galluzzi, I. Vitale, M. Djavaheri-Mergny, M. D'amelio, A. Criollo, E. Morselli, C. Zhu, F. Harper (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. Nature cell biology **10**(6): 676-687.
- Tautz J., S. Maier, C. Groh, W. Rössler, A. Brockmann (2003). Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development. Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(12): 7343-7347.
- Tavares D.A., C. Dussaubat, A. Kretzschmar, S.M. Carvalho, E.C. Silva-Zacarin, O. Malaspina, G. Bérail, J.-L. Brunet, L.P. Belzunces (2017). Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. Environmental Pollution **229**: 386-393.
- Tegtmeier E.M., M.D. Duffy (2004). External costs of agricultural production in the United States. International Journal of agricultural sustainability **2**(1): 1-20.
- Theopold U., R. Krautz, M.S. Dushay (2014). The Drosophila clotting system and its messages for mammals. Developmental & Comparative Immunology **42**(1): 42-46.
- Thompson H.M., C. Maus (2007). The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. Pest Management Science: formerly Pesticide Science **63**(11): 1058-1061.

- Thummel C. (2002). Ecdysone-regulated puff genes 2000. *Insect biochemistry and molecular biology* **32**(2): 113-120.
- Tian L., E. Guo, Y. Diao, S. Zhou, Q. Peng, Y. Cao, E. Ling, S. Li (2010). Genome-wide regulation of innate immunity by juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone in the *Bombyx fat body*. *BMC genomics* **11**(1): 1-12.
- Tian L., S. Liu, H. Liu, S. Li (2012). 20-hydroxyecdysone upregulates apoptotic genes and induces apoptosis in the *Bombyx fat body*. *Archives of insect biochemistry and physiology* **79**(4-5): 207-219.
- Tosi S., J. Nieh (2019). Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. *Proceedings of the Royal Society B* **286**(1900): 20190433.
- Trapp J., A. McAfee, L.J. Foster (2017). Genomics, transcriptomics and proteomics: enabling insights into social evolution and disease challenges for managed and wild bees. *Molecular ecology* **26**(3): 718-739.
- Trujillo-Ocampo A., F.E. Cázares-Raga, R.M. Del Angel, F. Medina-Ramírez, L. Santos-Argumedo, M.H. Rodríguez, F. de la Cruz Hernández-Hernández (2017). Participation of 14-3-3 ϵ and 14-3-3 ζ proteins in the phagocytosis, component of cellular immune response, in *Aedes mosquito cell lines*. *Parasites & vectors* **10**(1): 362.
- Tuberty S.R., C.L. McKenney Jr (2005). Ecdysteroid responses of estuarine crustaceans exposed through complete larval development to juvenile hormone agonist insecticides. *Integrative and comparative biology* **45**(1): 106-117.
- Tyers M., M. Mann (2003). From genomics to proteomics. *Nature* **422**(6928): 193-197.
- Uchida Y., K. Izai, T. Orii, T. Hashimoto (1992). Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. *Journal of Biological Chemistry* **267**(2): 1034-1041.
- Ullah F., H. Gul, N. Desneux, K. Tariq, A. Ali, X. Gao, D. Song (2019). Clothianidin-induced sublethal effects and expression changes of vitellogenin and ecdysone receptors genes in the melon aphid, *Aphis gossypii*. *Entomologia Generalis* **39**(2): 137-149.
- Ulvila J., L.M. Vanha-aho, A. Kleino, M. Vähä-Mäkilä, M. Vuoksio, S. Eskelinen, D. Hultmark, C. Kocks, M. Hallman, M. Parikka (2011). Cofilin regulator 14-3-3 ζ is an evolutionarily conserved protein required for phagocytosis and microbial resistance. *Journal of leukocyte biology* **89**(5): 649-659.
- van Heusden G.P.H., D.J. Griffiths, J.C. Ford, T.F. Chin-A-Woeng, P.A. Schrader, A.M. Carr, H.Y. Steensma (1995). The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *European journal of biochemistry* **229**(1): 45-53.
- van Heusden G.P.H., T.J. Wenzel, E.L. Lagendijk, H. De Steensma, J.A. van den Berg (1992). Characterization of the yeast BMH1 gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors. *FEBS letters* **302**(2): 145-150.
- Vandesompele J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* **3**(7): research0034. 0031.
- VanEngelsdorp D., J. Hayes, R.M. Underwood, J. Pettis, N. Gay (2008). A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring 2008.
- VanEngelsdorp D., M.D. Meixner (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of invertebrate pathology* **103**: S80-S95.

- VanEngelsdorp D., R. Underwood, D. Caron, J. Hayes Jr (2007). Estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: A report commissioned by the Apiary Inspectors of America. American Bee Journal.
- Vasuki V. (1992). Adult longevity of certain mosquito species after larval and pupal exposure to sublethal concentration of an insect growth regulator, hexaflumuron. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health **23**(1): 121.
- Velculescu V.E., L. Zhang, W. Zhou, J. Vogelstein, M.A. Basrai, D.E. Bassett Jr, P. Hieter, B. Vogelstein, K.W. Kinzler (1997). Characterization of the yeast transcriptome. Cell **88**(2): 243-251.
- Velki M., D. Kodrík, J. Večeřa, B.K. Hackenberger, R. Socha (2011). Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. General and comparative endocrinology **172**(1): 77-84.
- Viljakainen L. (2015). Evolutionary genetics of insect innate immunity. Briefings in functional genomics **14**(6): 407-412.
- Villanueva G., H. Lanz-Mendoza, S. Hernández-Martínez, M.S. Zavaleta, J. Manjarrez, J.M. Contreras-Gardu, J. Contreras-Gardu (2013). In the monarch butterfly the juvenile hormone effect upon immune response depends on the immune marker and is sex dependent.
- Vogel C., E.M. Marcotte (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. Nature reviews genetics **13**(4): 227-232.
- Voges D., P. Zwickl, W. Baumeister (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. Annual review of biochemistry **68**(1): 1015-1068.
- Wakimoto B.T., T.C. Kaufman (1981). Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the Antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*. Developmental biology **81**(1): 51-64.
- Walsh L., D. Webster, D. Stocco (2000). Dimethoate inhibits steroidogenesis by disrupting transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. Journal of Endocrinology **167**(2): 253-264.
- Wang A.-H., J.-C. Wu, Y.-S. Yu, J.-L. Liu, J.-F. Yue, M.-Y. Wang (2005). Selective insecticide-induced stimulation on fecundity and biochemical changes in *Tryporyza incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of economic entomology **98**(4): 1144-1149.
- Wang J.-D., W.-Z. Wang, Y.-R. Wang, S.-J. Gao, M. Elzaki, R. Wang, R. Wang, M. Wu (2018). Response of detoxification and immune genes and of transcriptome expression in *Mythimna separata* following chlorantraniliprole exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics **28**: 90-98.
- Wang K., R.-L. Fan, W.-N. Ji, W.-W. Zhang, X.-M. Chen, S. Wang, L. Yin, F.-C. Gao, G.-H. Chen, T. Ji (2018). Transcriptome Analysis of Newly Emerged Honeybees Exposure to Sublethal Carbendazim During Larval Stage. Frontiers in genetics **9**: 426.
- Wang R., W. Zhang, W. Che, C. Qu, F. Li, N. Desneux, C. Luo (2017). Lethal and sublethal effects of cyantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) MED. Crop Protection **91**: 108-113.
- Warren J.T., Y. Yerushalmi, M.J. Shimell, M.B. O'Connor, L.L. Restifo, L.I. Gilbert (2006). Discrete pulses of molting hormone, 20-hydroxyecdysone, during late larval development of *Drosophila melanogaster*: Correlations with changes in gene activity. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists **235**(2): 315-326.
- Whitacre D., G. Ware (2004). The pesticide book. Ohio: Meister Media Worldwide: 3-13.
- Wilkins M.R., C. Pasquali, R.D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J.-C. Sanchez, J.X. Yan, A.A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Bio/technology **14**(1): 61-65.

- Williams A.L., B.L. Bohnsack (2019). What's retinoic acid got to do with it? Retinoic acid regulation of the neural crest in craniofacial and ocular development. genesis **57**(7-8): e23308.
- Williams G.R., D.R. Tarpy, D. Vanengelsdorp, M.P. Chauzat, D.L. Cox-Foster, K.S. Delaplane, P. Neumann, J.S. Pettis, R.E. Rogers, D. Shutler (2010). Colony collapse disorder in context. Bioessays **32**(10): 845-846.
- Williamson S.M., D.D. Baker, G.A. Wright (2013b). Acute exposure to a sublethal dose of imidacloprid and coumaphos enhances olfactory learning and memory in the honeybee *Apis mellifera*. Invertebrate Neuroscience **13**(1): 63-70.
- Williamson S.M., C. Moffat, M. Gomersall, N. Saranzewa, C. Connolly, G.A. Wright (2013a). Exposure to acetylcholinesterase inhibitors alters the physiology and motor function of honeybees. Frontiers in physiology **4**: 13.
- Wilson C., C. Tisdell (2001). Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. Ecological economics **39**(3): 449-462.
- Wilson T.G. (2004). The molecular site of action of juvenile hormone and juvenile hormone insecticides during metamorphosis: how these compounds kill insects. Journal of insect physiology **50**(2-3): 111-121.
- Winnebeck E.C., C.D. Millar, G.R. Warman (2010). Why does insect RNA look degraded? Journal of Insect Science **10**(1): 159.
- Winston M.L. (1991). The biology of the honey bee. harvard university press.
- Wirawan E., L.V. Walle, K. Kersse, S. Cornelis, S. Claerhout, I. Vanoverberghe, R. Roelandt, R. De Rycke, J. Verspurten, W. Declercq (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. Cell death & disease **1**(1): e18-e18.
- Woodcock B., J. Bullock, R. Shore, M. Heard, M. Pereira, J. Redhead, L. Ridding, H. Dean, D. Sleep, P. Henrys (2017). Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. Science **356**(6345): 1393-1395.
- Wu-Smart J., M. Spivak (2016). Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. Scientific reports **6**: 32108.
- Wu M.-C., Y.-W. Chang, K.-H. Lu, E.-C. Yang (2017). Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. Insect biochemistry and molecular biology **88**: 12-20.
- Wu Q., J. Patočka, K. Kuča (2018). Insect antimicrobial peptides, a mini review. Toxins **10**(11): 461.
- Xie K., L. Tian, X. Guo, K. Li, J. Li, X. Deng, Q. Li, Q. Xia, Y. Zhong, Z. Huang (2016). BmATG5 and BmATG6 mediate apoptosis following autophagy induced by 20-hydroxyecdysone or starvation. Autophagy **12**(2): 381-396.
- Xie Z., D.J. Klionsky (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. Nature cell biology **9**(10): 1102-1109.
- Xin X.-x., Y. Chen, D. Chen, F. Xiao, L.D. Parnell, J. Zhao, L. Liu, J.M. Ordovas, C.-Q. Lai, L.-r. Shen (2016). Supplementation with major royal-jelly proteins increases lifespan, feeding, and fecundity in *Drosophila*. Journal of agricultural and food chemistry **64**(29): 5803-5812.
- Xu B., K. Qian, N. Zhang, L. Miao, J. Cai, M. Lu, Y. Du, J. Wang (2017). Sublethal effects of chlorantraniliprole on juvenile hormone levels and mRNA expression of JHAMT and FPPS genes in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. Pest management science **73**(10): 2111-2117.
- Xue X., L. Wu, K. Wang (2017). Chemical composition of royal jelly, Bee products-chemical and biological properties, Springer: 181-190.

- Yamazaki Y., M. Kiuchi, H. Takeuchi, T. Kubo (2011). Ecdysteroid biosynthesis in workers of the European honeybee *Apis mellifera* L. *Insect biochemistry and molecular biology* **41**(5): 283-293.
- Yamazaki Y., K. Shirai, R.K. Paul, T. Fujiyuki, A. Wakamoto, H. Takeuchi, T. Kubo (2006). Differential expression of HR38 in the mushroom bodies of the honeybee brain depends on the caste and division of labor. *FEBS letters* **580**(11): 2667-2670.
- Yan H., H. Jia, H. Gao, X. Guo, B. Xu (2013). Identification, genomic organization, and oxidative stress response of a sigma class glutathione S-transferase gene (*AccGSTS1*) in the honey bee, *Apis cerana cerana*. *Cell Stress and Chaperones* **18**(4): 415-426.
- Yang E.-C., H.-C. Chang, W.-Y. Wu, Y.-W. Chen (2012). Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS one* **7**(11): e49472.
- Yu Q.-Y., S.-M. Fang, W.-D. Zuo, F.-Y. Dai, Z. Zhang, C. Lu (2011). Effect of organophosphate phoxim exposure on certain oxidative stress biomarkers in the silkworm. *Journal of economic entomology* **104**(1): 101-106.
- Yu Y.-S., S. Xue, J.-C. Wu, F. Wang, G.-Q. Yang (2007). Changes in levels of juvenile hormone and molting hormone in larvae and adult females of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) after imidacloprid applications to rice. *Journal of economic entomology* **100**(4): 1188-1193.
- Yu Y., G. Shen, H. Zhu, Y. Lu (2010). Imidacloprid-induced hormesis on the fecundity and juvenile hormone levels of the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **98**(2): 238-242.
- Zaluski R., A.C. Bittarello, J.C.S. Vieira, C.P. Braga, P. de Magalhaes Padilha, M. da Silva Fernandes, T. de Souza Bovi, R. de Oliveira Orsi (2020). Modification of the head proteome of nurse honeybees (*Apis mellifera*) exposed to field-relevant doses of pesticides. *Scientific Reports* **10**(1): 1-11.
- Zayed A., G.E. Robinson (2012). Understanding the relationship between brain gene expression and social behavior: lessons from the honey bee. *Annual review of genetics* **46**: 591-615.
- Zettervall C.-J., I. Anderl, M.J. Williams, R. Palmer, E. Kurucz, I. Ando, D. Hultmark (2004). A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**(39): 14192-14197.
- Zhang C., S.-Q. Yan, B.-B. Shen, S. Ali, X.-M. Wang, F.-L. Jin, A.G. Cuthbertson, B.-L. Qiu (2017). RNAi knock-down of the *Bemisia tabaci* Toll gene (*BtToll*) increases mortality after challenge with destruxin A. *Molecular Immunology* **88**: 164-173.
- Zhang P., Y.-H. Zhao, Q.-H. Wang, W. Mu, F. Liu (2017). Lethal and sublethal effects of the chitin synthesis inhibitor chlorfluazuron on *Bradysia odoriphaga* Yang and Zhang (Diptera: Sciaridae). *Pesticide biochemistry and physiology* **136**: 80-88.
- Zhang Y., G. Zhang, X. Huang, R. Han (2014). Proteomic analysis of *Apis cerana* and *Apis mellifera* larvae fed with heterospecific royal jelly and by CSBV challenge. *PLoS One* **9**(8): e102663.
- Zhao J., Y. Wang, X. Li, Z. Gai (2020). Genome-wide identification and characterization of Toll-like receptors (TLRs) in housefly (*Musca domestica*) and their roles in the insecticide resistance. *International Journal of Biological Macromolecules* **150**: 141-151.
- Zhao P., J. Li, Y. Wang, H. Jiang (2007). Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated in vitro by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect biochemistry and molecular biology* **37**(9): 952-959.
- Zhao Y.G., H. Zhang (2019). Autophagosome maturation: an epic journey from the ER to lysosomes. *Journal of Cell Biology* **218**(3): 757-770.

Literaturverzeichnis

- Zhou Y.-Y., Y. Li, W.-Q. Jiang, L.-F. Zhou (2015). MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. Bioscience reports **35**(3).
- Zhu Y.C., J. Yao, J. Adamczyk, R. Luttrell (2017). Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). PloS one **12**(5).
- Zimniak P., S.P. Singh (2006). Families of glutathione transferases. Toxicology of glutathione transferases: 11-26.
- Zucchi R., S. Ronca-Testoni (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. Pharmacological reviews **49**(1): 1-52.

Anhang

ANHANG

Tabelle 18: Auflistung der 102 verwendeten Primer für die RT-qPCR

Zielgen	Primer	Sequenz fw & rev (5'-3')	Kommentar	Kategorie	Accession Number	Referenz
mitochondrial ribosomal protein large1	ame mRpL1 fw	TGCAATGTTGACAGGTTGGT		Alter	XM_001120018.2	Mozhui et al. 2017
	ame mRpL1 rev	CTCTTGTCCTTTTCTAGCTGC		Alter		
mitochondrial ribosomal protein large18	ame mRpL18 fw	ACTGCATTTTGGCATAAACTTGA		Alter	XM_625002.5	Mozhui et al. 2017
	ame mRpL18 rev	TGCAAGCACACGTCCTACAA		Alter		
mitochondrial ribosomal protein large 46	ame mRpL46 fw	ACATCAAGTGGTTCGCCCTT	Fehlender Ct-Wert	Alter	XM_397424.6	Mozhui et al. 2017
	ame mRpL46 rev	TGACGTTCCAAACAAACAGCA		Alter		
mitochondrial ribosomal protein large 47	ame mRpL47 fw	TTCCAAGGATGCCTACTTTTCAA		Alter	XM_397213.5	Mozhui et al. 2017
	ame mRpL47 rev	TCGCCATGAACGTCCTACAC		Alter		
mitochondrial ribosomal protein large 48	ame mRpL48 fw	ATGACAGTTTTGCCTTTCCTCA	Fehlender Ct-Wert	Alter	XM_006559602.2	Mozhui et al. 2017
	ame mRpL48 rev	ACACCTTCAGGTAATGTTGCT		Alter		

Anhang

mitochondrial ribosomal protein small12	ame mRpS12 fw	GCAAAAGGCGTGGTGTATGAA		Alter	XM_006560434.2	
	ame mRpS12 rev	GACCTTCCCCTGGGACAAAA		Alter		
mitochondrial ribosomal protein small30	ame mRpS30 fw	ACAGGCTTGTTATCAAGGTTTTTCA	Fehlender Ct-Wert	Alter	XM_396435.6	
	ame mRpS30 rev	TGACCAGTATTGGCCATTTGTT		Alter		
mitochondrial ribosomal protein large 49	ame mRpL49 fw	CGATCTGGCACGAGAACGA		Alter	XM_001121911.4	
	ame mRpL49 rev	TTCCCCATCTTTTCTGCGTAA		Alter		
mitochondrial ribosomal protein small15	ame mRpS15 fw	TACCGAGGAATGGCAACTGT		Alter	XM_016913468.1	
	ame mRpS15 rev	ATCACCACTTTTCCGAGGATCT		Alter		
acetylcholinesterase 1	ame AChE-1 fw	AGTTGGGCGAGATATGGTTG		Detoxifikation	XM_393751.6	De Smet et al. 2017
	ame AChE-1 rev	GGAAAAATAGAGCGCGTGAG		Detoxifikation		
acetylcholinesterase 2	ame AChE-2 fw	AACCGGCTTAAGGATTCGAT		Detoxifikation	NM_001040230.1	
	ame AChE-2 rev	CCCTCTCCCCTCAATCTTC		Detoxifikation		

Anhang

cytochrome P450 314A1	ame CYP314a1 fw	TCACGAAGCTAGCGCACC		Detoxifikation	XM_006570167.2	
	ame CYP314a1 rev	TGTAAGCGTCGTGAATCTTGT		Detoxifikation		
cytochrome P450 4g11	ame CYP4g11 fw	GGCCGGTCAAAATGGTGTTC	Fehlender Ct-Wert	Detoxifikation	NM_001040233.1	
	ame CYP4g11 rev	AGGATGGCAACCCATCACTG		Detoxifikation		
cytochrome P450 6a13	ame CYP6a13 fw	TCGAAAGGGACGAGGATATG	Fehlender Ct-Wert	Detoxifikation	XM_001123306.4	
	ame CYP6a13 rev	AGTCATGGGATGCCTACTGG		Detoxifikation		
cytochrome P450 6a14	ame CYP6a14 fw	GCGACCAATGCGAATGAAAC		Detoxifikation	XM_016915705.1	
	ame CYP6a14 rev	TCACGGCATTCCACCATTTC		Detoxifikation		
cytochrome P450 6a17	ame CYP6a17 fw	GGCTGGATTTGAAACGTCAT	Fehlender Ct-Wert	Detoxifikation	XM_395671.5	
	ame CYP6a17 rev	CGCGTGGAATTCTTTCATTT		Detoxifikation		
cytochrome P450 6AQ1	ame CYP6AQ1 fw	TTGTGGTGAAAATATCCGTTCAA	Fehlender Ct-Wert	Detoxifikation	NM_001205062.1	

Anhang

	ame CYP6AQ1 rev	AGGGCGAAGGAGTAATCTGC		Detoxifikation		
cytochrome P450 6AS5	ame CYP6AS5 fw	CGTTCGCGATACACCGAGAT	Fehlender Ct-Wert	Detoxifikation	NM_001040234.1	
	ame CYP6AS5 rev	AACGCGCACCAATGCAATTT		Detoxifikation		
cytochrome P450 9e2	ame CYP9e2 fw	GTTACGTCGAGCAAGATCA		Detoxifikation	XM_006562301.2	
	ame CYP9e2 rev	TCGTCAACACGCTCTTCAAC		Detoxifikation		
cytochrome P450 9e2	ame CYP9e2- 1 fw	CCTGATCAAGAGCATCACGA	Fehlender Ct-Wert	Detoxifikation	XM_392000.6	
	ame CYP9e2- 1 rev	GATCTTGCTCGAGGTGAAGG		Detoxifikation		
cytochrome P450 9e2	ame CYP9e2- 2 fw	GTAGCCATTCACGCGTTCAC		Detoxifikation	XM_006562300.2	
	ame CYP9e2- 2 rev	GTCTCGTCGATCTCCTGCTG		Detoxifikation		
cytochrome P450 6A1	ame CYP6A1 fw	CGAGAATTTACCGAAGACGC		Detoxifikation	XM_397347.5	
	ame CYP6A1 rev	TTAGCGAAGCGTGCACCAAT		Detoxifikation		

Anhang

cytochrome P450 6AS3	ame CYP6AS3 fw	ACAATACCAAAGGGCACAAAGG		Detoxifikation	XM_016915703.1	
	ame CYP6AS3 rev	AAAACGAGCACCGATGCAA		Detoxifikation		
cytochrome P450 9s1	ame CYP9S1 fw	GGACATTCACAGCACTCCGA		Detoxifikation	XM_016915998.1	
	ame CYP9S1 rev	GCTTCCTTGCTCACCAGACT		Detoxifikation		
antennapedia	ame antp fw	GGAGAACAAGTCGAAGGGCA		Entwicklung	NM_001011571.1	
	ame antp rev	CACTCCTCGGGGATCTCTCA		Entwicklung		
dorsal	ame DI fw	CTGAGAAGCATGCTGCAATGT		Entwicklung	NM_001011577.1	
	ame DI rev	CTTGTGGCCTCAACGTTTGT		Entwicklung		
hexamerin 110	ame Hex110 fw	CTGCAAGGAGTGCAACAAGTATT		Entwicklung	EU105212.1	
	ame Hex110 rev	CGTTTGACCACCACTCTGCC		Entwicklung		
hexamerin 70a	ame Hex70a fw	TACGACACGAAAACAGCGGA		Entwicklung	NM_001110764.1	
	ame Hex70a rev	TGCCGCATTGGTGTAGGAAT		Entwicklung		
hexamerin 70 b	ame Hex70b fw	GGGTGACACAGCTGACATGA		Entwicklung	NM_001011600.1	
	ame Hex70b rev	GAGGCCAACATCTTCGGTGA		Entwicklung		

Anhang

hexamerin 70 c	ame Hex70c fw	TTGGATGTCCAGCAGCCAAT		Entwicklung	NM_001098717	
	ame Hex70c rev	GTTCCAATCGAATTCGCGCG		Entwicklung		
juvenile hormone methyltransferase	ame Jhamt fw	CGGGGAATTCGCAGAAGAGA		Entwicklung	NM_001327967.1	
	ame Jhamt rev	CGATAAGCGTTCCTCGTCGT		Entwicklung		
juvenile hormone esterase	ame Jhe fw	CCGGTCTTTTCCAAGGTGGT		Entwicklung	NM_001011563.1	
	ame Jhe rev	TCGAGCTGGACGATACCTGA		Entwicklung		
sex comb reduced	ame scr fw	CGGGGAACCACCTCTTTCTC	Geringe Effizienz	Entwicklung	XM_623900.4	
	ame scr rev	ACGGAATACGCGAAACCAGA		Entwicklung		
ultrabithorax	ame ubx fw	GGATGGCTATAGCAGGAGCG		Entwicklung	NM_001168700.1	
	ame ubx rev	CTTCATCCGCCGATTCTGGA		Entwicklung		
vitellogenin	ame Vg fw	ACGTAATAAATGCCGCCAAG	Fehlender Ct-Wert	Entwicklung	NM_001011578.1	
	ame Vg rev	TGCATGTTGCTCTCCAACTC		Entwicklung		
homeotic protein deformed	ame dfd fw2	GAGAATTGTTGTTGGTGTCTGGG	Geringe Effizienz	Entwicklung	XM_016917153.1	
	ame dfd rev2	AAGCGGTAACGGAACACACG		Entwicklung		
ecdysone-induced protein 75	ame E75 fw	CAATCGGCCCCAGGTCTGTTA		Entwicklung	NM_001080110.1	
	ame E75 rev	AGAATCCCTTGCATCCCTCG		Entwicklung		
ecdysone-induced protein 78C	ame E78c fw	CCGATGATAATACCGGCGAGT		Entwicklung	XM_396527.6	

Anhang

	ame E78c rev	TGGCAAATTCCACCACCTT		Entwicklung		
ecdysone receptor	ame Ecr fw	AAGGCGCAAAAGGAGAAGGA	Fehlender Ct-Wert	Entwicklung	NM_001098215.2	
	ame Ecr rev	GGGCTGATCGGTTTCACGTA		Entwicklung		
nuclear hormone receptor HR3	ame HR3 fw	GCGAAAGAGATCGTGAAACGG	Fehlender Ct-Wert	Entwicklung	XM_016913161	
	ame HR3 rev	TTTCGAGTCTTGTCCTCGAGG		Entwicklung		
hormone receptor-like in 38	ame HR38 fw	GTACCACCCGGTCACCATTG		Entwicklung	XM_006560394	
	ame HR38 rev	AGTTGCCACTTGTTCCAGTGAT		Entwicklung		
nuclear hormone receptor FTZ-F1 beta	ame HR39 fw	CTGTCCTCATGTGCTAGCCG		Entwicklung	XM_396918.6	
	ame HR39 rev	GATTGTGCCTTATGTTTCGTGC		Entwicklung		
hormone receptor 4	ame HR4 fw	ACACGGTAAGCAGTTCGAGG		Entwicklung	XM_016911120.1	
	ame HR4 rev	CAGCTCGTCCAAGTTCCTCA		Entwicklung		
ultraspiracle	ame Usp fw	CGGCACGAGGTAAAAGTGAC	Geringe Effizienz	Entwicklung	NM_001011634	
	ame Usp rev	AGACTTAGCCAAGTGTTGCCA		Entwicklung		
vitellogenin receptor	ame VgR fw2	GTAGCACGACCATTCCAGGT	Fehlender Ct-Wert	Entwicklung	XM_016912481.1	
	ame VgR rev2	GTCCACATTTTCAGGCGTTT		Entwicklung		
14-3-3 protein zeta	p zeta fw	CTGTCGTCTACCACGGCATT		Entwicklung	XM_006566097.3	2D-Analyse
	p zeta rev	TTACCTCCGAAAAGCTAAGTGG				
protein l(2)37Cc	p l(37) fw	CTCGTATTGCGTATGGGTGTC		Entwicklung	XM_006559327.3	2D-Analyse
	p l(37) rev					

Anhang

alpha-2-macroglobulin-like protein 1	ame A2ML1 fw	TCGTTGTAAATCAGCAATTGGTCC		Immunsystem	XM_006565440.2	
	ame A2ML1 rev	GGCATGGTCGTGTTTCCAAC		Immunsystem		
abaecin	ame abaecin fw	CAGCATTCGCGTATGTACCA	Fehlender Ct-Wert	Immunsystem	NM_001011617.1	Evans 2006b
	ame abaecin rev	GACCAGGAAACGTTGGAAAC		Immunsystem		
apisimin	ame apisimin fw	TGAGCAAATCGTTGCTGTC		Immunsystem	NM_001011582.1	
	ame apisimin rev	AACGACATCCACGTTTCGATT		Immunsystem		
CD109 antigen	ame CD109 fw	GCAACGGTTGGCGAAAGATT	Fehlender Ct-Wert	Immunsystem	M_006571765.2	
	ame CD109 rev	AAACTTGTGGCGATCCACCT		Immunsystem		
defensin 1	ame Def1 fw	TGCGCTGCTAACTGTCTCAG		Immunsystem	NM_001011616.2	Evans 2006b
	ame Def1 rev	AATGGCACTTAACCGAAACG		Immunsystem		
defensin 2	ame Def2 fw	GCTGCTACCACTACGACATC	Fehlender Ct-Wert	Immunsystem	NM_001011638.1	Evans 2006b
	ame Def2 rev	CAACTACCGCCTTTACGTCG		Immunsystem		
MyD88-A	ame MyD88 fw	AGCTTTTTGTAAGAGATGGTGAAA		Immunsystem	XM_006560439.2	
	ame MyD88 rev	TGTTCTGATAGTCCTTGTTCTTTCC		Immunsystem		

Anhang

proclotting enzyme	ame Proc. Enz. fw	ACGCAAAGTTTCGTCCAACG		Immunsystem	XM_001121888.4	
	ame Proc. Enz. rev	ATTTCCACACCCGATTCCCC		Immunsystem		
TOLL	ame TOLL fw	TCCTATTGAATCTGCGTACGTT		Immunsystem	XM_016911910.1	
	ame TOLL rev	TGGACATCGAATTTCCGCGT		Immunsystem		
Imd	ame Imd fw	AAACCTGATCCACCGCGAAT		Immunsystem	NM_001163717.1	
	ame Imd rev	AATTAACGCCCGTGACAGGT		Immunsystem		
PGRP-LC	ame PGRP- LC fw	GTGTGAGTGC GTTGGTATGG	Fehlender Ct-Wert	Immunsystem	XM_392452.6	
	ame PGRP- LC rev	ATGCTGACCGCGCTATCTTT		Immunsystem		
Pirk (Poor Imd Response upon knock in)	ame Pirk fw	CTCGTCGAATCGCAGGATCA	Fehlender Ct-Wert	Immunsystem	XM_003251064.3	
	ame Pirk rev	GTTAATCGCGGAGCGGTTTC		Immunsystem		
phenoloxidase subunit A3	ame PPOa3 fw2	CAGTACCACCGCTTACCGAA		Immunsystem	NM_001011627.1	
	ame PPOa3 rev2	TTGGA ACTCTAGCACCTCTG		Immunsystem		
ATG10	ame ATG10 fw	CGTCCAATGCTTTGCCAGAC		Autophagie	XM_006566571.2	

Anhang

	ame ATG10 rev	TCCTCCCATGTGATCGTACCT		Autophagie		
ATG13	ame ATG13 fw	CGTCGAAATGCAACTCGCAA		Autophagie	XM_623779.4	
	ame ATG13 rev	ACGGCGAAAGGAGTTTTCAAAT		Autophagie		
ATG16	ame ATG16 fw	CAATGCTGGAGTGATGTGCG		Autophagie	XM_016914014.1	
	ame ATG16 rev	TTGGGACCGTTGCAGCTTTA		Autophagie		
ATG3	ame ATG3 fw	CTCGCAGATGCAAACAGATTGA	Fehlender Ct-Wert	Autophagie	XM_624690.5	
	ame ATG3 rev	GATGTGTGTCAACCCAACCAC		Autophagie		
ATG4B	ame ATG4B fw	GCCATAAGAGAACTCGACGC		Autophagie	XM_624574.5	
	ame ATG4B rev	ACAACCCCAACCTTTATCGGA		Autophagie		
ATG5	ame ATG5 fw	TGCGAGTTGTCAAAGAGCCA		Autophagie	XM_623453.4	
	ame ATG5 rev	TTGGAACGAGTCGCAGAACG		Autophagie		
ATG6/Beclin-1	ame ATG6 fw	AGCTGAACTTTCACTTCCCATC		Autophagie	XM_392365.4	

Anhang

	ame ATG6 rev	CTGTTTCCCCAGAGTCACCA		Autophagie		
ATG7	ame ATG7 fw	GCAACGACGTAACACAACCG		Autophagie	XM_001122360.4	
	ame ATG7 rev	CCTCAACACCTTCGGGATGT		Autophagie		
ATG9A	ame ATG9A fw	AGGCGCCTCTGTCTTTGTAT		Autophagie	XM_016913672.1	
	ame ATG9A rev	CCCCTTCTCCGAACTTGTCT		Autophagie		
ATG8A/GABARAP	ame GABARAP fw	TCCCGAAAGGGTTCCTGTAA		Autophagie	XM_001120069.4	
	ame GABARAP rev	CATCTTCTGGGCGAAGGTGA		Autophagie		
LC3	ame LC3 fw	TCATTTGCACAAAGGGTTGCAG		Autophagie	XM_006565925.2	
	ame LC3 rev	GCCTGTGTTGGATGTAGCTG		Autophagie		
RagA	ame RagA fw	TGGCAGCACAGTTTCAGAGT		Autophagie	XM_001119898.4	
	ame RagA rev	GCTGCTGATGGAATAGCAGGA		Autophagie		
RagD	ame RagD fw	TGCCCATTTGATGGAGAAAC		Autophagie	XM_006562357.2	
	ame RagD rev	TTTCCACTCCTTCGAAGACCC		Autophagie		

Anhang

Tim10	ame Tim10 fw	TCGCATAATAGCGTGGTCACA		Mitochondrialer Membrantransport	XM_006571277.2	
	ame Tim10 rev	ACCATCCAATCGCTATCTTCGT		Mitochondrialer Membrantransport		
Tim16	ame Tim16 fw	TAGAGCATTCGCACGAGCAT		Mitochondrialer Membrantransport	XM_006563532.2	
	ame Tim16 rev	ATGTTGAGCACCTCGTGTCC		Mitochondrialer Membrantransport		
Tim17	ame Tim17 fw	TCGTGCTCGAGGCATTTTCT		Mitochondrialer Membrantransport	XM_003249450.3	
	ame Tim17 rev	AATACTGCTCCCCCAATGGC		Mitochondrialer Membrantransport		
Tim8	ame Tim8 fw	ATTAAACCACGTGTGTGCCG		Mitochondrialer Membrantransport	XM_001122230	
	ame Tim8 rev	TGTTTCTGTTCTGGCTGTCCA		Mitochondrialer Membrantransport		
Tim9	ame Tim9 fw	TGTTTCGAGATTTTCGTGGCATC		Mitochondrialer Membrantransport	XM_006562881.2	
	ame Tim9 rev	TTGCTTTGACATCTCGTGTAGT		Mitochondrialer Membrantransport		
cytochrome c oxidase subunit 1	ame COX1 fw	ACCTGATATAGCATTCCCCCG		Oxidative Phosphorylierung	P00395	
	ame COX1 rev	TCATCCAGTTCCTGGTCTTGG		Oxidative Phosphorylierung		

Anhang

cytochrome c oxidase subunit 11	ame COX11 fw	GGCATTGTTTCGAGCAAAAGTTA		Oxidative Phosphorylierung	XM_006567340.2	
	ame COX11 rev	CCGCTCCAATATAAACGCGA		Oxidative Phosphorylierung		
cytochrome c oxidase subunit 15	ame COX15 fw	TGGGGACGTTTGTAGGTGC		Oxidative Phosphorylierung	XM_394095.6	
	ame COX15 rev	CTGAGGGTTCCACGAAACGA		Oxidative Phosphorylierung		
cytochrome c oxidase subunit 17	ame COX17 fw	TAGAGGCGCTGAAACTGGTG		Oxidative Phosphorylierung	XM_001122739.4	Mao et al. 2017
	ame COX17 rev	TCAGGACAAGCACAACAAGGT		Oxidative Phosphorylierung		
cytochrome c oxidase subunit 2	ame COX2 fw	TGATGCAGTTCCAGGACGAA		Oxidative Phosphorylierung	AY587542.1	
	ame COX2 rev	ACCACAAATTTCTGAACATTGACC		Oxidative Phosphorylierung		
cytochrome c oxidase subunit 3	ame COX3 fw	AGTTACAAATAGACCTTGACCAAT		Oxidative Phosphorylierung	P00414	
	ame COX3 rev	GTATACCTTGAAATGTTCTTTCTCG		Oxidative Phosphorylierung		
cytochrome c oxidase subunit 4	ame COX4 fw	GCTCCAACAGGAGAATGGAGA		Oxidative Phosphorylierung	XM_006572254.2	
	ame COX4 rev	ACGTTCCAGTTGTGCAAGTC		Oxidative Phosphorylierung		

Anhang

cytochrome c oxidase subunit 5a	ame COX5a fw	TCGCATGATGGACCACAAGA		Oxidative Phosphorylierung	XM_392368.6	
	ame COX5a rev	AGGTACAAGATCCATAGCCGC		Oxidative Phosphorylierung		
cytochrome c oxidase subunit 5b	ame COX5b fw	TGTCGACGAACATTCTCTTGC	Fehlender Ct-Wert	Oxidative Phosphorylierung	XM_624984.4	
	ame COX5b rev	CGTTTTTCCAATCCCGTAGCA		Oxidative Phosphorylierung		
cytochrome c oxidase subunit 6A1	ame COX6a fw	TGGACTTGCAATGGCTAATTGT		Oxidative Phosphorylierung	XM_001121817.4	
	ame COX6a rev	TCTCCCCATGGAAAAGGCTTA		Oxidative Phosphorylierung		
cytochrome c oxidase subunit 6B1	ame COX6b fw	GCACGGCTGACTAAGCATCA		Oxidative Phosphorylierung	NM_001172403.1	
	ame COX6b rev	TGGTGCTGTGTTTGGTTTCAA		Oxidative Phosphorylierung		
cytochrome c oxidase subunit 6c	ame COX6c fw	TACCAAAGCCTCAGCTTCGT		Oxidative Phosphorylierung	NM_001172405.1	
	ame COX6c rev	AAATCTTCCAACATGCCAGT		Oxidative Phosphorylierung		
cytochrome c oxidase subunit 7A	ame COX7a fw	GCCGTTTAAAACAATCCACCCA		Oxidative Phosphorylierung	XM_625251.5	
	ame COX7a rev	AATCAGCCTGCCATTCTTGTTG		Oxidative Phosphorylierung		

Anhang

cytochrome c oxidase subunit 7C	ame COX7c fw	AAGCAGACGATTCTTCGCCA		Oxidative Phosphorylierung	XM_001120568.4	
	ame COX7c rev	TGGAAGATTAGCACCAAGGGTA		Oxidative Phosphorylierung		
probable medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	Acyl CoA fw	ATGATCGGAAGCCCAAGCTG		Enzym	XM_392111.7	2D-Analyse
	Acyl CoA rev	ACCGTGGATTTCGGTTAGGGA		Enzym		
26S protease regulatory subunit 10B	Pro reg fw	ACGTGGACCATTGTGTTGCTTTT		Enzym	XM_006571330.3	2D-Analyse
	Pro reg rev	TGGAAAGCTGCTAATGATGCTG		Enzym		
3-ketoacyl-CoA thiolase	CoA thio fw	TTTGAGGCCGTGGATGTTCA		Enzym	XM_391843.6	2D-Analyse
	CoA thio rev	AGGCTGGAAGCGTTTGGATA		Enzym		
retinal dehydrogenase 1	ret de fw	CACCGAGTTCACGGCCTATT		Enzym	XM_392104.6	2D-Analyse
	ret de rev	TATCCTGCTGTCGATCCCCT		Enzym		
ATP synthase subunit beta	ATP syn beta fw	CCTCAGCAACCTGGAATGGT		Enzym	XM_006564829.3	2D-Analyse
	ATP syn beta rev	ACCTGATCCCCAAGGCTAGT		Enzym		
actin related protein 1	ame Arp1 fw	GCCAACACTGTCTTTCTG		Referenz	NM_001185146.1	Cunha et al. 2005
	ame Arp1 rev	AGAATTGACCCACCAATCCA		Referenz		
enolase	ame Enolase fw	GGTGATGAAGGTGGTTTTGC		Referenz	XM_016915936.1	Scharlaken et al. 2008

Anhang

	ame Enolase rev	GATGCAGCAACATCCATACC		Referenz		
GAPDH	ame GAPDH fw	GATGCACCCATGTTTGTGTTG		Referenz	P04406	Scharlaken et al. 2008
	ame GAPDH rev	TTGCAGAAGGTGCATCAAC		Referenz		
60S ribosomal protein L13a	ame RPL13a fw	TGGCCATTACTTGGTCGTT		Referenz	XM_623810.5	Scharlaken et al. 2008
	ame RPL13a rev	GAGCACGGAAATGAAATGGT		Referenz		
40S ribosomal protein S1	ame RPS18 fw	GATTCCCGATTGGTTTTTTG		Referenz	XM_625101.5	Scharlaken et al. 2008
	ame RPS18 rev	CCCAATAATGACGCAAACCT		Referenz		

Anhang

Tabelle 19: Auflistung der Behandlungsgruppen und den dazugehörigen \log_2 *Fold changes* des eingesetzten Genarrays von D6 im Jahr 2018. Signifikante Unterschiede sind fett hervorgehoben

Gen	Fe	DM1	DM2	DM3
<i>a2ml1</i>	-1,10	0,11	-0,39	0,13
<i>ache1</i>	-0,65	0,38	-0,81	0,24
<i>ache2</i>	-1,38	0,22	-1,69	-0,19
<i>antp</i>	-0,20	1,15	-1,05	-0,07
<i>apisimin</i>	-1,04	-0,20	1,15	0,76
<i>arp1</i>	0,32	-0,31	-0,96	0,50
<i>atg10</i>	-0,45	0,01	-0,55	-0,13
<i>atg13</i>	-0,19	-0,70	-0,82	-0,08
<i>atg4b</i>	-0,47	-0,16	-0,85	0,05
<i>atg5</i>	-1,41	-0,60	-1,25	0,46
<i>atg6</i>	-1,64	-0,01	-1,17	0,01
<i>atg7</i>	-0,40	0,14	-0,63	0,33
<i>atg9a</i>	-1,26	-0,05	-0,04	0,73
<i>cox1</i>	-0,55	-0,42	-0,84	-0,32
<i>cox10</i>	-0,09	-0,21	-0,22	-0,02
<i>cox11</i>	-0,11	-0,40	0,40	-0,17
<i>cox15</i>	-0,61	-0,35	-0,99	0,13
<i>cox17</i>	0,38	-0,38	-0,78	-0,21
<i>cox2</i>	-0,29	-0,18	-1,18	-0,01
<i>cox3</i>	-1,01	-0,79	-0,35	-0,53
<i>cox4</i>	-0,17	-0,34	-0,43	-0,10
<i>cox5a</i>	-0,19	-0,36	-0,69	-0,06
<i>cox5b</i>	0,61	-0,34	-0,91	0,03
<i>cox6a</i>	-0,21	-0,35	-0,92	-0,04
<i>cox6b</i>	0,70	-0,57	-1,17	-0,19
<i>cox6c</i>	0,17	-0,54	-0,45	-0,12
<i>cox7a</i>	-0,21	-0,14	-0,63	0,08
<i>cox7c</i>	-0,32	-0,22	0,34	-0,13
<i>cyp314a1</i>	-1,16	0,84	-0,69	1,19
<i>cyp6a1</i>	-0,62	-0,20	-0,56	1,13
<i>cyp6a14</i>	-0,34	-0,17	-0,97	0,00
<i>cyp6as3</i>	-0,53	-0,38	-0,48	0,01
<i>cyp9e2</i>	-0,81	0,17	-0,89	0,26
<i>cyp9e21</i>	-0,96	0,03	0,24	-1,89
<i>cyp9e22</i>	0,57	0,23	-0,35	1,17
<i>cyp9s1</i>	-0,82	0,23	-1,11	0,33

Anhang

<i>defl</i>	-1,35	-1,39	-1,38	-0,29
<i>di</i>	-1,15	0,28	-0,35	-0,22
<i>e75</i>	-1,15	1,28	-1,01	-0,67
<i>e78c</i>	0,17	0,50	-1,14	0,57
<i>enolase</i>	0,49	0,07	-0,34	0,14
<i>gabarap</i>	-1,84	-0,94	-0,14	0,05
<i>gapdh</i>	0,22	0,34	0,26	0,16
<i>hex110</i>	-1,31	-0,47	-0,42	0,27
<i>hex70a</i>	-0,87	0,17	-0,65	0,40
<i>hex70b</i>	0,49	0,14	-0,87	0,12
<i>hex70c</i>	0,52	0,07	-0,71	0,76
<i>hr38</i>	-0,12	0,52	-1,61	0,08
<i>hr39</i>	0,03	0,34	-0,47	0,23
<i>hr4</i>	-0,07	0,00	-1,23	0,47
<i>imd</i>	-0,59	-0,52	-0,66	0,18
<i>jhamt</i>	0,41	-0,25	-0,30	0,93
<i>jhe</i>	-1,36	0,16	-0,42	0,86
<i>mrpl1</i>	-0,03	-0,64	-0,44	-0,08
<i>mrpl18</i>	0,86	-0,34	-0,60	0,19
<i>mrpl47</i>	-0,33	-0,42	-0,77	-0,19
<i>mrpl49</i>	-0,26	-0,23	1,22	0,12
<i>mrps12</i>	0,27	-0,10	-0,36	0,33
<i>mrps15</i>	-0,41	-0,74	-1,02	-0,29
<i>myd88</i>	-0,72	-0,57	-1,06	0,16
<i>ppoa32</i>	-1,15	-0,46	-0,56	0,14
<i>proc.enz</i>	-0,11	-0,15	-1,56	-0,15
<i>raga</i>	-0,62	-0,27	-0,72	0,24
<i>ragd</i>	-0,08	-0,45	-0,90	0,09
<i>rpl13a</i>	-0,67	-0,42	-0,19	0,04
<i>rps18</i>	-0,28	0,32	-0,73	0,30
<i>tim10</i>	-0,07	-0,47	-0,11	-0,42
<i>tim16</i>	0,01	-0,33	-0,24	-0,07
<i>tim17</i>	0,49	-0,30	0,42	-0,09
<i>tim8</i>	0,82	-0,22	-0,33	-0,43
<i>tim9</i>	1,25	-0,45	-0,86	0,25
<i>toll</i>	-1,35	-0,49	-1,32	0,40
<i>ubx</i>	-0,96	0,96	-1,66	-0,03

Anhang

Tabelle 20: Auflistung der Behandlungsgruppen und den dazugehörigen \log_2 *Fold changes* des eingesetzten Genarrays von D8 im Jahr 2018. Die Lösungsmittelkontrolle (CS) ist ebenfalls dargestellt. Die Daten dienen als Grundlage der Clusteranalyse. Signifikante Unterschiede sind fett hervorgehoben

Gen	CS	Fe	DM1	DM2	DM3
<i>mrpl1</i>	0,40	-0,30	0,06	-0,16	0,15
<i>mrpl18</i>	0,54	-0,23	-0,07	0,28	0,07
<i>mrpl47</i>	0,43	-0,39	0,04	-0,20	0,28
<i>mrpl49</i>	0,16	-0,36	-0,07	-0,22	-0,03
<i>mrps12</i>	0,49	-0,34	0,22	0,30	0,16
<i>mrps15</i>	0,43	-0,22	0,27	-0,11	0,32
<i>ache1</i>	-0,08	0,24	0,55	0,43	0,36
<i>ache2</i>	-0,03	0,21	-0,25	-1,51	-0,86
<i>cyp314a1</i>	-0,06	0,14	-0,09	-0,22	-0,15
<i>cyp6a14</i>	-0,15	0,30	-0,89	-0,21	-0,27
<i>cyp9e2</i>	0,51	0,03	0,29	-0,29	-0,14
<i>cyp9e21</i>	-0,17	0,29	-0,29	-0,81	-2,10
<i>cyp9e22</i>	-0,29	0,90	0,01	0,74	-0,43
<i>cyp6a1</i>	0,32	-0,62	0,11	-0,76	-0,22
<i>cyp6as3</i>	0,04	0,86	-0,40	-0,19	-0,26
<i>cyp9s1</i>	-0,27	0,80	0,92	-0,76	-0,07
<i>antp</i>	-0,14	0,26	0,66	0,36	0,37
<i>di</i>	-0,34	0,41	0,01	-0,45	-0,17
<i>hex110</i>	-0,30	0,87	-0,20	-0,40	0,80
<i>hex70a</i>	-0,24	0,88	-0,29	-0,08	-0,34
<i>hex70b</i>	-0,30	0,82	-0,25	0,16	-0,06
<i>hex70c</i>	-0,24	0,95	-0,22	0,82	-0,29
<i>jhamt</i>	0,12	0,90	0,70	0,81	0,43
<i>jhe</i>	-0,18	0,70	-0,34	-0,29	-0,25
<i>ubx</i>	-0,23	-0,04	0,84	0,72	0,88
<i>e75</i>	-0,43	0,70	0,86	0,81	0,97
<i>e78c</i>	-0,49	-0,07	0,65	0,67	0,81
<i>hr38</i>	-0,25	-0,07	-0,04	0,32	0,40
<i>hr39</i>	-0,01	-0,48	0,51	0,30	0,39
<i>hr4</i>	-0,23	-0,42	0,70	0,55	0,79
<i>a2ml1</i>	-0,25	-0,40	0,66	0,33	0,89
<i>apisimin</i>	-0,40	-0,07	-0,64	0,43	-0,84
<i>defl</i>	0,33	-0,06	0,16	-0,25	0,77
<i>myd88</i>	0,33	-0,84	-0,47	-0,79	-0,40
<i>proc.enz</i>	-0,14	-0,22	0,07	-0,34	0,06

Anhang

<i>toll</i>	0,08	0,41	-0,09	-1,42	-0,89
<i>imd</i>	-0,10	-0,20	0,11	-0,44	0,07
<i>ppoa32</i>	0,03	-0,14	0,33	-0,40	-0,04
<i>tim10</i>	0,40	-0,51	-0,12	-0,04	0,16
<i>tim16</i>	0,48	-0,31	0,29	0,01	0,17
<i>tim17</i>	0,42	-0,51	0,16	-0,29	-0,12
<i>tim8</i>	0,43	-0,06	0,77	0,15	0,66
<i>tim9</i>	0,29	-0,89	0,08	-0,09	-0,14
<i>cox1</i>	0,05	-0,54	-0,60	-0,76	-0,07
<i>cox10</i>	0,46	-0,18	0,25	0,21	0,45
<i>cox11</i>	-0,18	0,14	0,08	0,04	0,10
<i>cox15</i>	0,08	-0,47	-0,35	-0,35	-0,15
<i>cox17</i>	0,51	-0,30	0,04	0,34	0,14
<i>cox2</i>	0,25	-0,92	-0,17	-0,28	-0,24
<i>cox3</i>	0,41	-0,81	-0,22	-0,25	-0,03
<i>cox4</i>	0,31	-0,25	0,01	0,05	-0,08
<i>cox5a</i>	0,33	-0,35	-0,30	-0,19	-0,20
<i>cox5b</i>	0,40	-0,25	0,33	0,20	0,12
<i>cox6a</i>	0,37	-0,47	-0,07	0,12	0,14
<i>cox6b</i>	0,01	-0,32	-0,20	-0,42	-0,38
<i>cox6c</i>	0,42	-0,47	-0,09	0,11	-0,03
<i>cox7a</i>	0,25	-0,03	0,35	-0,01	0,16
<i>cox7c</i>	0,32	-0,40	-0,14	-0,14	-0,21
<i>atg10</i>	-0,26	-0,01	0,23	-0,38	-0,10
<i>atg13</i>	0,00	-0,07	0,06	-0,26	0,12
<i>atg4b</i>	0,46	-0,44	0,09	-0,10	0,22
<i>atg5</i>	0,71	-0,38	-0,11	-0,11	-0,05
<i>atg6</i>	-0,22	-0,43	-0,10	-0,34	-0,04
<i>atg7</i>	0,13	-0,16	-0,02	-0,18	0,01
<i>atg9a</i>	-0,42	0,40	0,07	-0,15	0,19
<i>gabarap</i>	0,33	-0,94	-0,06	-0,41	-0,15
<i>raga</i>	0,74	-0,94	-0,22	-0,64	-0,25
<i>ragd</i>	0,49	-0,66	-0,16	-0,37	-0,01
<i>arp1</i>	0,08	-0,07	0,97	0,44	0,61
<i>enolase</i>	0,05	-0,09	-0,16	-0,12	-0,21
<i>gapdh</i>	-0,07	0,28	0,13	0,10	0,14
<i>rpl13a</i>	0,08	-0,12	0,05	0,08	0,11
<i>rps18</i>	-0,37	0,03	-0,48	-0,42	-0,34

Anhang

Tabelle 21: Detaillierte Auflistung der identifizierten Proteine im Jahr 2018. Es sind die *Fold changes* samt Signifikanz angegeben. Zudem ist das theoretische Molekulargewicht (MW) und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) den Ergebnissen auf dem Gel gegenübergestellt. Die Berechnung erfolgte nach Kozłowski (2016)

Spot	Protein	pI (theo)	pI (Gel)	MW(theo)/kDa	MW(Gel)/kDa	DM1	<i>p</i>	DM2	<i>p</i>	DM3	<i>p</i>	Fe	<i>p</i>	Funktion
1	Retinal Dehydrogenase 1	5,5	4,8	53	45-50	1,6	0,0006	1,2	0,51	-1,7	0,007	-1	0,95	Umwandlung von Retinaldehyd zu Retinsäure (Helmer et al. 2015)
2	ATP Synthase Untereinheit	5,13	5,5	55	45-50	1,6	0,003	1,2	0,66	-2,1	0,01	-1,3	0,43	Synthese von ATP (Boyer 1997)
3	3-ketoacyl-CoA Thiolase	7,97	4	42	30-40	-1,08	0,64	-1,32	0,14	-1,68	0,02	-1,42	0,05	Abbau von Fettsäuren (Uchida et al. 1992)
4	Acyl-CoA Dehydrogenase	7,55	8,2	46	30-40	-1,6	0,02	-1,7	0,04	-1	0,85	1,01	0,95	Abbau von Fettsäuren (Ghisla und Thorpe 2004)
5	26S-Proteasom-Untereinheit	6,27	8,3	44	30-40	-1,3	0,44	-1,34	0,25	-1,9	0,001	1,15	0,34	Degradation von Zellbestandteilen (Voges et al. 1999)
6	Protein I(2) 37Cc	6,37	8	29	25-30	-1,2	0,63	-3	0,04	-4,2	0,03	-5,4	0,004	Übergang Larve zur Puppe (Eveleth Jr und Marsh 1986)
7	14-3-3 protein zeta	4,7	3	28	20-25	1,2	0,63	-3	0,04	-4,2	0,03	1,4	0,33	Signalwege während der Entwicklung (Kockel et al. 1997, Le et al. 2016)
8	<i>major royal jelly protein 2</i>	6,47	7	51	25-30	-2,5	0,009	-3,5	0,01	-4,1	0,01	-10,4	0,0008	Nahrungsprotein im Gelée royale (Helbing et al. 2017)

Anhang

Tabelle 22: Differenziell exprimierte Transkripte der RT-qPCR im Jahr 2019

Tag	Zielgen	Behandlung	\log_2 Fold change	$-\log_{10}$ p-Wert	Kategorie
4	<i>cox5b</i>	0,05µg Dimethoat	0,33	1,31	Oxidative Phosphorylierung
4	<i>proc enz</i>	0,05µg Dimethoat	0,37	1,47	Immunsystem
4	<i>cyp9e2-2</i>	0,05µg Dimethoat	0,68	1,60	Detoxifikation
4	<i>cyp9e2-1</i>	0,05µg Dimethoat	1,07	1,43	Detoxifikation
4	<i>hex70b</i>	0,1µg Dimethoat	0,30	2,70	Entwicklung
4	<i>acyl CoA</i>	0,1µg Dimethoat	0,37	1,85	Enzym
4	<i>hr4</i>	0,1µg Dimethoat	0,48	1,49	Entwicklung
4	<i>gapdh</i>	0,2µg Dimethoat	0,16	1,33	Enzym
4	<i>e75</i>	0,2µg Dimethoat	0,38	2,22	Entwicklung
4	<i>hr4</i>	0,2µg Dimethoat	0,52	1,74	Entwicklung
4	<i>cyp9e2-2</i>	0,2µg Dimethoat	0,69	1,64	Detoxifikation
4	<i>enolase</i>	Chlorantranilipol	-0,22	1,39	Enzym
4	<i>atg6</i>	Chlorantranilipol	0,49	1,72	Autophagie
4	<i>hex70b</i>	Chlorantranilipol	1,28	2,10	Entwicklung
4	<i>apisimin</i>	Chlorantranilipol	2,38	1,40	Immunsystem
4	<i>antp</i>	Fenoxycarb	-0,89	1,39	Entwicklung
4	<i>mrps12</i>	Fenoxycarb	-0,60	1,80	Alter
4	<i>cox6c</i>	Fenoxycarb	-0,60	1,42	Oxidative Phosphorylierung
4	<i>pro reg</i>	Fenoxycarb	-0,27	1,82	Enzym
4	<i>def1</i>	Fenoxycarb	1,00	2,00	Immunsystem
4	<i>tim8</i>	Flupyradifuron	0,69	1,34	Mitochondrialer Membrantransport
4	<i>e75</i>	Flupyradifuron	1,00	1,43	Entwicklung
4	<i>hr4</i>	Flupyradifuron	1,24	3,00	Entwicklung
6	<i>hr4</i>	0,05µg Dimethoat	-0,74	1,36	Entwicklung

Anhang

6	<i>atg6</i>	0,05µg Dimethoat	-0,69	1,70	Autophagie
6	<i>mrpl47</i>	0,05µg Dimethoat	-0,36	1,96	Alter
6	<i>gapdh</i>	0,05µg Dimethoat	0,40	1,34	Enzym
6	<i>hr38</i>	0,1µg Dimethoat	-1,60	3,00	Entwicklung
6	<i>cyp9e2-1</i>	0,1µg Dimethoat	-1,18	1,59	Detoxifikation
6	<i>toll</i>	0,1µg Dimethoat	-1,06	1,57	Immunsystem
6	<i>cox6c</i>	0,1µg Dimethoat	-1,00	2,05	Oxidative Phosphorylierung
6	<i>hex70b</i>	0,1µg Dimethoat	-0,86	1,85	Entwicklung
6	<i>atg6</i>	0,1µg Dimethoat	-0,81	2,00	Autophagie
6	<i>cox5b</i>	0,1µg Dimethoat	-0,79	1,34	Oxidative Phosphorylierung
6	<i>ache1</i>	0,1µg Dimethoat	-0,69	1,96	Oxidative Phosphorylierung
6	<i>pro reg</i>	0,1µg Dimethoat	-0,30	1,32	Enzym
6	<i>gabarap</i>	0,1µg Dimethoat	0,49	1,64	Autophagie
6	<i>def1</i>	0,1µg Dimethoat	2,32	1,92	Immunsystem
6	<i>enolase</i>	0,2µg Dimethoat	-0,14	1,30	Enzym
6	<i>cyp9e2-1</i>	0,2µg Dimethoat	0,73	2,52	Detoxifikation
6	<i>gabarap</i>	0,2µg Dimethoat	0,77	3,00	Autophagie
6	<i>p l(2)</i>	0,2µg Dimethoat	0,83	3,00	Entwicklung
6	<i>toll</i>	0,2µg Dimethoat	1,55	2,40	Immunsystem
6	<i>ATP syn beta</i>	Chlorantranilipol	0,34	1,92	Enzym
6	<i>tim16</i>	Chlorantranilipol	0,41	1,38	Mitochondrialer Membrantransport
6	<i>tim17</i>	Chlorantranilipol	0,45	1,74	Mitochondrialer Membrantransport
6	<i>mrpl47</i>	Chlorantranilipol	0,68	1,49	Alter
6	<i>mrps12</i>	Chlorantranilipol	0,83	2,52	Alter
6	<i>proc enz</i>	Chlorantranilipol	1,06	2,15	Immunsystem
6	<i>hr4</i>	Chlorantranilipol	3,43	4,00	Entwicklung
6	<i>e75</i>	Fenoxycarb	-1,18	2,10	Entwicklung

Anhang

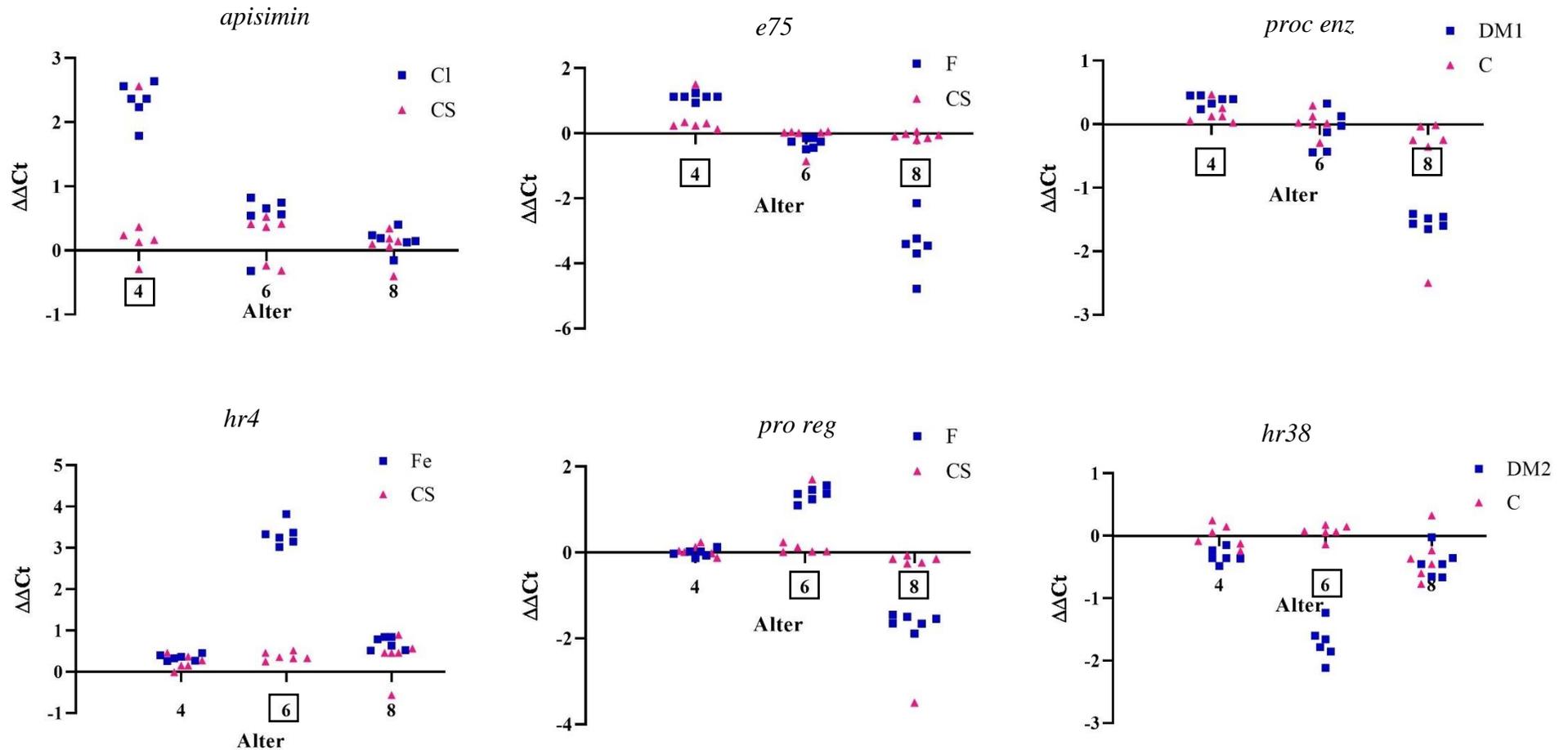
6	<i>acyl CoA</i>	Fenoxycarb	-0,71	2,52	Enzym
6	<i>cox6c</i>	Fenoxycarb	-0,60	1,43	Oxidative Phosphorylierung
6	<i>gabapap</i>	Fenoxycarb	-0,58	1,38	Autophagie
6	<i>mrps12</i>	Fenoxycarb	-0,40	1,48	Alter
6	<i>tim8</i>	Fenoxycarb	1,62	1,44	Mitochondrialer Membrantransport
6	<i>ATP syn beta</i>	Flupyradifuron	0,39	2,22	Enzym
6	<i>tim17</i>	Flupyradifuron	0,77	4,00	Mitochondrialer Membrantransport
6	<i>pro reg</i>	Flupyradifuron	1,29	1,66	Enzym
6	<i>hr4</i>	Flupyradifuron	3,27	4,00	Entwicklung
8	<i>proc enz</i>	0,05µg Dimethoat	-1,74	1,96	Immunsystem
8	<i>ATP syn beta</i>	0,05µg Dimethoat	-0,84	1,62	Enzym
8	<i>antp</i>	0,05µg Dimethoat	1,64	2,15	Entwicklung
8	<i>ache2</i>	0,1 Dimethoat	1,58	1,40	Detoxifikation
8	<i>ATP syn beta</i>	0,1µg Dimethoat	-0,94	1,92	Enzym
8	<i>tim8</i>	0,2 Dimethoat	-0,60	1,64	Mitochondrialer Membrantransport
8	<i>enolase</i>	0,2µg Dimethoat	-0,69	2,15	Enzym
8	<i>def1</i>	Chlorantranilipol	-4,59	1,47	Immunsystem
8	<i>e75</i>	Chlorantranilipol	-1,74	4,00	Entwicklung
8	<i>atg6</i>	Chlorantranilipol	-1,32	2,40	Autophagie
8	<i>gabapap</i>	Chlorantranilipol	-1,00	2,52	Enzym
8	<i>pro reg</i>	Chlorantranilipol	-1,00	4,00	Enzym
8	<i>p zeta</i>	Chlorantranilipol	-0,67	1,57	Entwicklung
8	<i>tim16</i>	Chlorantranilipol	-0,40	1,72	Mitochondrialer Membrantransport
8	<i>atg6</i>	Fenoxycarb	0,86	1,30	Autophagie
8	<i>mrpl47</i>	Fenoxycarb	0,88	1,64	Alter
8	<i>arpl</i>	Fenoxycarb	1,03	1,89	Autophagie
8	<i>cox6c</i>	Fenoxycarb	1,06	1,70	Oxidative Phosphorylierung

Anhang

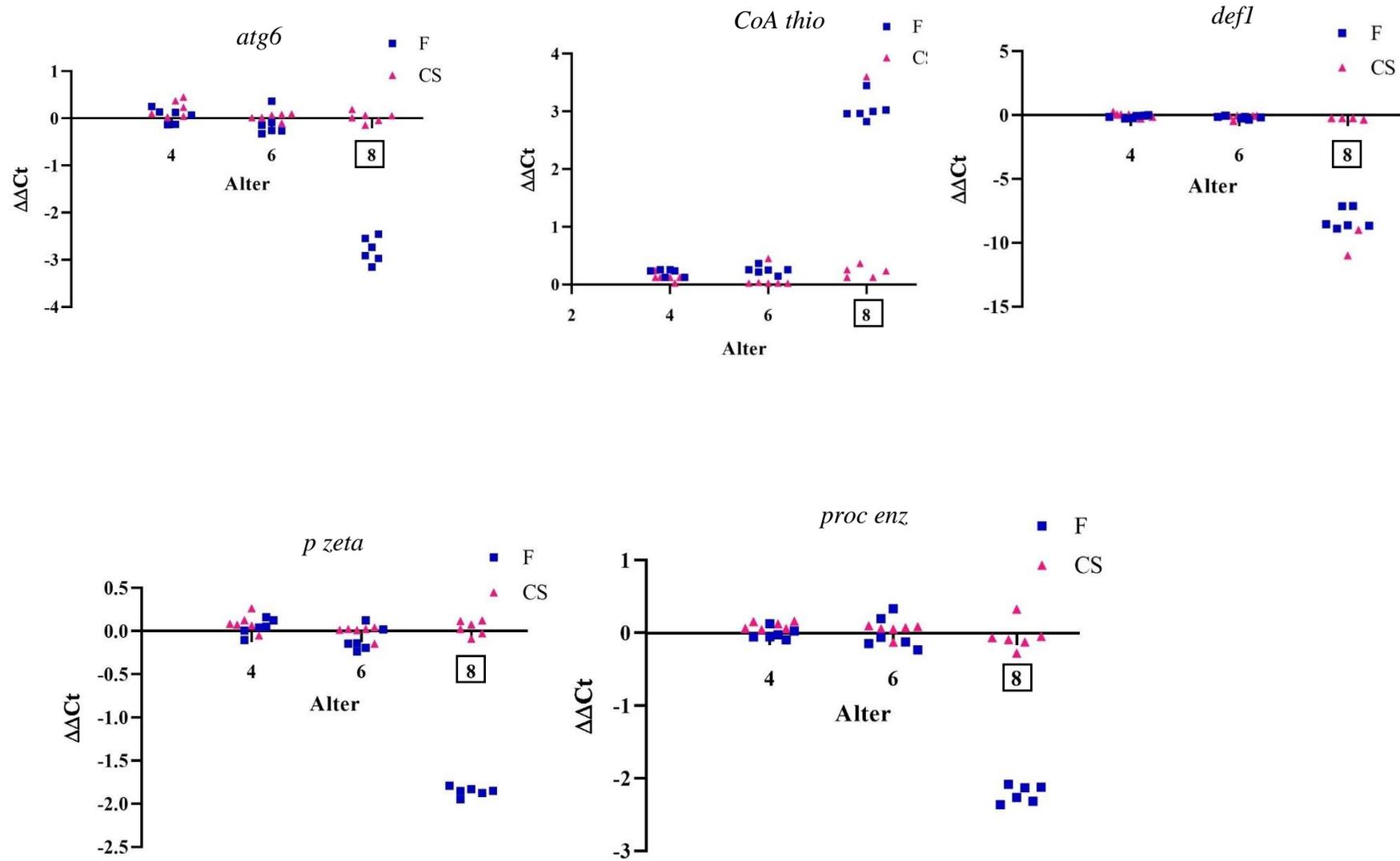
8	<i>def1</i>	Flupyradifuron	-7,97	1,48	Immunsystem
8	<i>e75</i>	Flupyradifuron	-3,06	4,00	Entwicklung
8	<i>atg6</i>	Flupyradifuron	-2,94	4,00	Autophagie
8	<i>proc enz</i>	Flupyradifuron	-2,18	2,52	Immunsystem
8	<i>gabarap</i>	Flupyradifuron	-1,89	4,00	Entwicklung
8	<i>p zeta</i>	Flupyradifuron	-1,89	3,00	Enzym
8	<i>pro reg</i>	Flupyradifuron	-1,64	4,00	Enzym
8	<i>cox6c</i>	Flupyradifuron	-1,36	2,70	Detoxifikation
8	<i>cox5b</i>	Flupyradifuron	-1,36	2,00	Detoxifikation
8	<i>mrps12</i>	Flupyradifuron	-1,29	1,55	Alter
8	<i>mrpl47</i>	Flupyradifuron	-1,25	2,40	Alter
8	<i>tim17</i>	Flupyradifuron	-1,25	2,22	Mitochondrialer Membrantransport
8	<i>rpl13a</i>	Flupyradifuron	-1,15	2,30	Alter
8	<i>tim8</i>	Flupyradifuron	-1,03	4,00	Mitochondrialer Membrantransport
8	<i>tim16</i>	Flupyradifuron	-0,89	4,00	Mitochondrialer Membrantransport
8	<i>acyl coa</i>	Flupyradifuron	1,08	1,54	Enzym
8	<i>coa thio</i>	Flupyradifuron	3,12	1,68	Enzym

Anhang

Abbildung 18: Streudiagramme der Transkriptanalyse 2019. Dargestellt sind die $\Delta\Delta C_t$ -Werte in Abhängigkeit vom Probenalter der signifikant regulierten Transkripte mit einer \log_2 Fold change von mindestens $\pm 1,5$. Das entsprechende Gen findet sich oberhalb der Diagramme. Die dargestellten Probengruppen sind der Legende zu entnehmen. Tage mit signifikanten Unterschieden sind markiert.



Anhang



Anhang

Tabelle 23: Auflistung der identifizierten Proteine im Jahr 2019. Die Berechnung des Molekulargewichts und des pI erfolgte analog zu 2018

Spot	Protein	pI (theo)	pI (Gel)	MW(theo)/kDa	MW(Gel)/kDa	DM1	<i>p</i>	DM2	<i>p</i>	DM3	<i>p</i>	Fe	<i>p</i>	Funktion
1	Retinal Dehydrogenase 1	s. 2018	s. 2018	s. 2018	s. 2018	1,01	0,97	-1,65	0,24	-2,05	0,13	1,06	0,66	s. 2018
2	ATP Synthase Untereinheit	s. 2018	s. 2018	s. 2018	s. 2018	1,05	0,86	-1,17	0,58	-1,39	0,26	1,43	0,001	s. 2018
3	3-Ketoacyl-CoA Thiolase	s. 2018	s. 2018	s. 2018	s. 2018	-1	0,94	1,1	0,87	-2,53	0,04	-1,39	0,12	s. 2018
4	Acyl-CoA Dehydrogenase	s. 2018	s. 2018	s. 2018	s. 2018	1,1	0,55	-1,19	0,22	-1,27	0,03	-1,16	0,34	s. 2018
5	26S Proteasome Untereinheit	s. 2018	s. 2018	s. 2018	s. 2018	-1,09	0,6	-1,32	0,23	-1,04	0,8	1,08	0,71	s. 2018
6	Protein 1(2) 37Cc	s. 2018	s. 2018	s. 2018	s. 2018	1,17	0,25	-1,19	0,13	-1,41	0,0005	-2,03	0,002	s. 2018
7	14-3-3 protein zeta	s. 2018	s. 2018	s. 2018	s. 2018	1,16	0,33	-1,14	0,38	-1,17	0,35	-1,21	0,44	s. 2018
8	<i>major royal jelly protein 2</i>	s. 2018	s. 2018	s. 2018	s. 2018	1,43	0,49	1,5	0,32	-1,04	0,91	-2,7	0,019	s. 2018
9	Enolase	6,14	7,5	47	45-50	-1,24	0,12	1,27	0,0025	1,8	0,0005	1,22	0,49	Glykolyse-Enzym (Kang et al. 2008)
10	Glutathion-S-Transferase	7,53	4,8	50	15-20	-1,1	0,29	-1,85	0,0009	-2,04	0,0006	-1,17	0,55	Detoxifikations-Enzym (Fukami 1980)

Anhang

Tabelle 24: Auflistung aller identifizierten Proteine samt *Fold changes* und Signifikanzniveaus der Behandlungsgruppen aus dem gemeinsamen Vergleich von 2018 und 2019. Die Daten von Flupyradifuron sind ebenfalls dargestellt

Protein	<i>Fold changes</i> und Signifikanzniveaus im Vergleich zur Kontrolle									
	DM1	<i>p</i>	DM2	<i>p</i>	DM3	<i>p</i>	Fe	<i>p</i>	F	<i>p</i>
Retinal Dehydrogenase 1	1,17	0,31	1,09	0,61	-1,6	0,02	1,16	0,43	1,78	0,0002
ATP Synthase beta	1,12	0,54	1,13	0,57	-1,74	0,07	1,28	0,28	1,59	0,23
3-Ketoacyl-CoA Thiolase	-1,08	0,64	-1,32	0,14	-1,68	0,02	-1,42	0,2	-15,96	0,009
Acyl-CoA Dehydrogenase	-1,09	0,38	-1,17	0,22	-1,01	0,87	1,05	0,74	-1,3	0,3
26S Proteasom Untereinheit 10B	-1,14	0,31	-1,11	0,29	-1,01	0,83	1,28	0,15	1,09	0,19
Protein I(2) 37Cc	1,05	0,77	-1,39	0,18	-2,1	0,12	-1,34	0,1	-1,77	0,07
14-3-3 Protein zeta	1,16	0,33	-1,14	0,38	-1,17	0,35	-1,21	0,44	-1,6	0,01
Enolase	-1,09	0,61	1,26	0,27	1,47	0,15	1,23	0,34	-1,47	0,08
<i>major royal jelly protein 2</i>	1,02	0,93	-1,6	0,1	-2,11	0,02	-4,1	0,0002	-30,99	0,0007
Glutathion-S-Transferase	-1,13	0,12	-1,22	0,26	-1,57	0,0005	-1,02	0,86	1,17	0,37

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Einspanier für die Möglichkeit, auch im Zuge meiner Dissertation mit Honigbienen arbeiten zu können. Zudem danke ich ihm für die konstruktiven Gespräche und Anmerkungen sowie für die Begutachtung der Arbeit.

Ich danke Herrn Professor Dr. Dino McMahon für die Zweitbegutachtung der Arbeit und die hilfreichen Kommentare.

Mein weiterer Dank gilt PD Dr. Soroush Sharbati, der ebenfalls als Arbeitsgruppenleiter stets für Fragen und Anregungen zur Verfügung stand und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Benedikt Polaczek, der nicht nur die Bienenvölker versorgt, sondern auch stets sein Wissen über Honigbienen mitgeteilt hat.

Außerdem gilt mein Dank Frau Barbara Kutz-Lohroff, Frau Petra Schulze, Frau Sandra Gerstenberger und Herrn Christoph Holder für die Unterstützung bei den durchgeführten Versuchen, die Hilfe bei der Einarbeitung und die Hilfsbereitschaft im Labor.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Jakob Eckert und Herrn Dr. Jens Pistorius vom Julius Kühn-Institut Braunschweig für die Durchführung der Larvenversuche, die Begutachtung der Veröffentlichungen und die geduldige Beantwortung von Fragen.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Deutschen Berufs- und Erwerbsimkerbund. Insbesondere danke ich meinen Bundesbrüdern der Landsmannschaft Alemannia Makaria Würzburg, den zahlreichen Verbandsbrüdern in Berlin, Freunden und Bekannten für Korrekturvorschläge und die Möglichkeit, die Gedanken auch mal abseits der Arbeit schweifen zu lassen.

Schließlich möchte ich meiner Familie für die stetige Unterstützung während dieser Arbeit und während der Zeit meines Studiums danken.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Ort, Datum

Unterschrift