

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Charakterisierung des molekularen Wirkmechanismus  
des Varroazids Ameisensäure  
auf Honigbienen und Varroa-Milben**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Antonia Genath**  
Tierärztin aus Hildesheim

Berlin 2020  
Journal-Nr.: 4207







**Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Charakterisierung des molekularen Wirkmechanismus des Varroazids Ameisensäure  
auf Honigbienen und Varroa-Milben**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Antonia Genath  
Tierärztin  
aus Hildesheim**

**Berlin, 2020**

**Journal-Nr.: 4207**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ralf Einspanier  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Bäumer  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dino McMahon

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

apis mellifera, varroa destructor, formic acid, proteins, proteomes, proteomics,  
metabolism, cytochrome c, polymerase chain reaction, gelelectrophoresis,  
mitochondria

Tag der Promotion: 16.06.2020

*Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-057-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Meiner Familie





# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1. Einleitung .....	1
2. Literatur.....	2
2.1. Die Honigbiene .....	2
2.2. Die Bedeutung der Honigbiene.....	3
2.3. Völkerverluste und ihre Ursachen.....	3
2.4. Die Varroa-Milbe .....	3
2.4.1. Epidemiologie .....	3
2.4.2. Morphologie .....	4
2.4.3. Entwicklung .....	4
2.5. Die Varroose .....	5
2.6. Bekämpfungsstrategien der Varroose .....	5
2.7. Die Ameisensäure-Behandlung .....	6
2.8. Studien zur molekularen Wirkungsweise der AS in Honigbienen und Varroa-Milben.....	7
2.9. Die Transkriptom-Analyse .....	7
2.9.1. Next Generation Sequencing .....	8
2.10. Die Proteom-Analyse .....	8
2.10.1. MS-basierte Proteomik .....	8
2.11. Problemstellung und Zielsetzung .....	9
3. Material und Methoden .....	10
3.1. Versuchsorganismen .....	10
3.1.1. Honigbiene Apis mellifera.....	10
3.1.2. Varroa-Milbe Varroa destructor .....	10
3.2. Ameisensäure-Behandlung .....	11
3.3. Reagenzien.....	11
3.4. Verbrauchsmaterial.....	12
3.5. Geräte.....	13
3.6. Software.....	14
3.7. Rezepte .....	15
3.8. Kits.....	15
3.9. Teil 1 - Transkriptom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe zur Aufklärung potentieller Differenzen in der Metabolisierung von Ameisensäure.....	16
3.9.1. Ameisensäure-Behandlung und Probenahme.....	16
3.9.2. RNA-Extraktion .....	16

3.9.3.	Quantitäts- und Qualitätsbestimmung der RNA .....	17
3.9.4.	RNA-Sequenzierung.....	17
3.9.5.	Bioinformatische Auswertung der differenziell exprimierten Gene .....	18
3.9.6.	Primer .....	19
3.9.7.	Agarose-Gelelektrophorese.....	20
3.9.8.	DNA Gel-Extraktion .....	20
3.9.9.	Sequenzierung PCR-Reaktionsprodukte.....	20
3.9.10.	DNase-Verdau .....	21
3.9.11.	cDNA Synthese (Reverse Transkription der Total-RNA) .....	21
3.9.12.	RT-qPCR .....	22
3.9.13.	Auswertung der RT-qPCR .....	22
3.9.14.	Statistische Auswertung der RT-qPCR.....	22
3.10.	Teil 2 - Proteom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Varroa-Milbe.....	24
3.10.1.	Ameisensäure-Behandlung und Probenahme .....	24
3.10.2.	Protein-Isolation .....	24
3.10.3.	Quantifizierung der Proteinmenge mittels Pierce™ 660 nm Protein Assay ..	24
3.10.4.	Proteom-Analyse mittels LC-MS/ MS .....	25
3.10.5.	Bioinformatische Auswertung der Proteom-Analysen.....	25
3.10.6.	Selektion und weiterführende Analyse der Kandidatenproteine .....	26
3.11.	Teil 3 - Etablierung eines Tests zur funktionellen Untersuchung der mitochondrialen Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe .....	27
3.11.1.	Ameisensäure-Behandlung und Probennahme .....	27
3.11.2.	Mitochondrien-Isolierung.....	27
3.11.3.	Bestimmung der Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase .....	28
3.11.4.	Bestimmung der Aktivität der Citrat-Synthase .....	29
3.11.5.	Berechnung der Enzymaktivitäten .....	30
3.11.6.	Statistische Auswertung der Enzymaktivitäten .....	30
4.	Ergebnisse .....	32
4.1.	Teil 1 - Transkriptom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe zur Aufklärung potentieller Differenzen in der Metabolisierung von Ameisensäure.....	32
4.1.1.	Quantität, Qualität und Integrität der RNA.....	32
4.1.2.	RNA-Seq - Differentiell exprimierte Gene nach Ameisensäure-Behandlung ...	33
4.1.2.1.	Honigbiene .....	35
4.1.2.2.	Varroa-Milbe .....	35
4.1.3.	Anreicherungsanalyse von GO annotierten DEGs .....	37
4.1.3.1.	Honigbiene .....	37
4.1.3.2.	Varroa-Milbe.....	37
4.1.4.	Primer für die Validierung durch RT-qPCR .....	38
4.1.5.	Auswahl stabil exprimierter Referenzgene .....	39

4.1.6.	RT-qPCR .....	40
4.1.6.1.	Validierung der RNA-Seq Daten .....	40
4.1.6.2.	Detail-Untersuchung zur CYP4-Subfamilie von <i>A. mellifera</i> .....	42
4.1.6.3.	Vergleich der Regulation der Genexpression zwischen 1TA und FVB .....	44
4.2.	Teil 2 - Proteom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Varroa-Milbe ..	46
4.2.1.	Quantifizierung der Proteinmenge .....	46
4.2.2.	Hauptkomponentenanalyse der gesamten Datenmatrix .....	46
4.2.3.	Differentiell exprimierte Proteine nach Ameisensäure-Behandlung .....	47
4.2.4.	KEGG-Pathway-Analyse .....	49
4.2.5.	Korrelation von Transkriptom und Proteom .....	51
4.3.	Teil 3 - Etablierung eines Tests zur funktionellen Untersuchungen der mitochondrialen Cytochrom C Oxidase-Aktivität bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe.....	53
4.3.1.	Ameisensäure-Behandlung und Probennahme.....	53
4.3.2.	Bestimmung der Enzymaktivitäten .....	53
5.	Diskussion.....	55
5.1.	Teil 1 - Transkriptom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe zur Aufklärung potentieller Differenzen in der Metabolisierung von Ameisensäure.....	55
5.1.1.	Honigbiene .....	55
5.1.2.	Varroa-Milbe .....	57
5.1.3.	Validierung der RNA-Seq Daten durch RT-qPCR.....	58
5.2.	Teil 2 - Proteom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Varroa-Milbe ..	59
5.2.1.	Einfluss der AS-Behandlung auf Energie-Stoffwechsel und oxidativen Stress	59
5.2.2.	Einfluss der AS-Behandlung auf HSP70-Expression .....	60
5.2.3.	Einfluss der AS-Behandlung auf die Proteostase .....	60
5.2.4.	Expression der Detoxifikations-assoziierten Proteine .....	61
5.3.	Vergleich von Transkriptom- und Proteomdaten .....	63
5.4.	Teil 3 - Etablierung eines Tests zur funktionellen Untersuchung der mitochondrialen Enzym-Aktivitäten bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe.....	64
6.	Ausblick.....	65
7.	Zusammenfassung .....	67
8.	Summary.....	69
9.	Literaturverzeichnis.....	71
Anhang	.....	XIII
Publikationen	.....	XL
Vorträge	.....	XL
Poster	.....	XL
Zeitschriftenartikel	.....	XL
Danksagung	.....	XLI
Finanzierungsquellen	.....	XLII

Interessenskonflikte .....	XLII
Selbstständigkeitserklärung .....	XLIII

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Varroa-Milbe. ....	4
Abbildung 2: Proben-Identifikationsnummer Biene .....	10
Abbildung 3: Proben-Identifikationsnummer Milbe.....	11
Abbildung 4: Pipeline zur Auswertung der RNA-Seq-Daten .....	18
Abbildung 5: Gel-ähnliches Bild isolierter Total-RNA im Agilent 2100 Bioanalyzer. ....	32
Abbildung 6: Exemplarische Darstellung eines Elektropherogramms der RNA.....	33
Abbildung 7: PCA-Ergebnisse von 1TA. ....	34
Abbildung 8: PCA-Ergebnisse von FVB.....	34
Abbildung 9: Heatmap-Darstellung der RNA-Seq-Daten. ....	36
Abbildung 10: Signifikant überrepräsentierte GO-Termini von DEGs. ....	38
Abbildung 11: Validierung der Referenzgene für die RT-qPCR Analyse. ....	39
Abbildung 12: Expression der Kandidatengene in der RT-qPCR-Analyse. ....	41
Abbildung 13: Vergleich von RNA-Seq- und RT-qPCR-Validierungsdaten. ....	42
Abbildung 14: Expression der vier CYP4-Subfamilien-Mitglieder bei (A) 1TA und (B) FVB. .	43
Abbildung 15: Vergleich der RT-qPCR-Daten in einer Volcano-Plot-Analyse. ....	44
Abbildung 16: Vergleich der RT-qPCR-Daten zwischen 1TA und FVB. ....	45
Abbildung 17: PCA zu Untersuchung der Varianz in der gesamten Datenmatrix. ....	46
Abbildung 18: Anzahl identifizierter Proteine in den Proben der Kontroll- (rot) und Behandlungsgruppe (blau).....	47
Abbildung 19: Proteinexpressions-Daten in einer Volcano-Plot-Analyse.....	47
Abbildung 20: Anzahl der DEPs nach AS-Behandlung. ....	48
Abbildung 21: Profil der DEPs in Behandlungs- versus unbehandelter Kontroll-Gruppe.....	49
Abbildung 22: Korrelation von Transkriptom und Proteom bei der Varroa-Milbe.....	52
Abbildung 23: Enzymaktivitäten vor und nach AS-Exposition von 1TA, FVB und VM.....	54

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tätigkeiten der Arbeiterinnen. ....	2
Tabelle 2: Reagenzien .....	11
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien .....	12
Tabelle 4: Geräte .....	13
Tabelle 5: Software .....	14
Tabelle 6: Rezepte .....	15
Tabelle 7: Kits .....	15
Tabelle 8: Kriterien zur Primer-Generierung. ....	19
Tabelle 9: Sequenzen der verwendeten Primer in der RT-qPCR Analyse. ....	19
Tabelle 10: Protokoll und Reaktionsansatz des DNase-Verdau. ....	21
Tabelle 11: : Protokoll und Reaktionsansatz der cDNA Synthese .....	21
Tabelle 12: Reaktionsansatz der RT-qPCR. ....	22
Tabelle 13: Reaktionsansatz der COX-Aktivitäts-Messung. ....	28
Tabelle 14: COX-Aktivität - Pipettier-Schema und die Systemeinstellungen des Spektralphotometers. ....	28
Tabelle 15: Reaktionsansatz der CS-Aktivitäts-Messung. ....	29
Tabelle 16: Pipettier-Schema und die Systemeinstellungen des Spektralphotometers. ....	30
Tabelle 17: Anzahl der durch AS auf- und abwärtsregulierten Gene. ....	35
Tabelle 18: Verwendete Primer für die RT-qPCR Analyse. ....	39
Tabelle 19: Durch geNORM ermittelte Expressionsstabilität (M-Wert) der Referenzgene. ...	40
Tabelle 20: Proteingehalte der in der Proteom-Analyse verwendeten Milben-Proben. ....	46
Tabelle 21: KEGG-Pfade bzw. –Untergruppen. ....	50
Tabelle 22: COX-Aktivität pro mg Protein. ....	53
Tabelle 23: CS-Aktivität pro mg Protein. ....	53
Tabelle 24: COX-Aktivität pro CS-Aktivität. ....	53
Tabelle 25: Tabellarische Zusammenfassung der RNA-Qualitätsuntersuchungs-Ergebnisse mittels Qubit und Tape-Station. ....	VIII
Tabelle 26: Differentiell exprimierte Gene der 1TA. ....	XIV
Tabelle 27: Differentiell exprimierte Gene der FVB. ....	XV
Tabelle 28: Differentiell exprimierte Gene der VM. ....	XVII
Tabelle 29: Übersicht aller differentiell exprimierter Milben-Proteine. ....	XXIV
Tabelle 30: Übersicht aller DEPs, denen eine KEGG-Nummer zugewiesen werden konnte, einschließlich ihrer voraussichtlichen Funktion. ....	XXXI

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
€	Euro
§	Paragraph
°C	Grad Celsius
μM	Mikromolar
10-THF	10-Formyltetrahydrofolat
18S	18S rRNA
1TA	1-Tag-alte Arbeiterinnen
20S-2	20S proteasome subunit alpha 2
20S-4	20S proteasome subunit alpha 4
26S-12	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12-like
26S-8	26S proteasome regulatory subunit 8 isoform X1
60SL8	60S ribosomal protein L8-like
60SP0	60S acidic ribosomal protein P0-like
60SP1	60S acidic ribosomal protein P1-like
A	Klassifizierung von <i>A. mellifera</i> : Afrika
<i>A. cerana</i>	<i>Apis cerana</i>
<i>A. mellifera</i>	<i>Apis mellifera</i>
Abs.	Absatz
AChE	Acetylcholinesterase
A-CoA	Acetyl-Coenzym A
AP11	Abhydrolase domain-containing protein 11
Arp1	Actin related protein 1
AS	Ameisensäure
bp	Basenpaar
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BP	Biologische Prozesse
BSA	Bovine Serum Albumin
BUP	"Bottom-Up"-Proteomik
C	Klassifizierung von <i>A. mellifera</i> : Süd- und Osteuropa
CBR1	Carbonyl reductase 1
CC	Zelluläre Komponente
CCD	Colony Collapse Disorder
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propanesulfonat
Clp-P	ATP-dependent Clp protease, protease subunit
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA-SH	CoA mit einer Thiolgruppe
COX	Cytochrom-C-Oxidase
COX4	Cytochrom c oxidase subunit 4
Cq	Cycle threshold
CR	Common reference
CS	Citrat-Synthase

CYP	Cytochrom P450
CYP303A1	Cytochrom P450 303A1
CYP3A56	Cytochrom P450 3A56
CYP4AA1	Cytochrom P450 4AA1-like
CYP4AV1	Cytochrom P450 4AV1
CYP4AZ1	Cytochrom P450 4AZ1
CYP4G11	Cytochrom P450 4G11
CYP6AR1	Cytochrom P450 6AR1
CYP6AS1	Cytochrom P450 6AS1
CYP6AS10	Cytochrom P450 6AS10
CYP6AS19	Cytochrom P450 6AS19
CYP6AS3	Cytochrom P450 6AS3
CYP6AS4	Cytochrom P450 6AS4
CYP9Q3	Cytochrom P450 9Q3
Cyt C	Cytochrom C
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dCq	Delta quantitative cycle
ddCq	Delta delta quantitative cycle
Def-1	Defensin-1
DEG	Differentiell exprimierte Gene
DIB	Deutscher Imkerbund e.V.
DN	Deutsch Normalmaß-Rähmchen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	Doppelsträngige RNA-Moleküle
DTNB	5', 5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
DWV	Deformed Wing Virus
e.V.	Eingetragener Verein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-Tu	Elongation factor Tu
<i>E. lecanii-corni</i>	<i>Exophiala lecanii-corni</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
EU	Europäische Union
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
F-ATPase	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit g
FC	Fold Change
FDH	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase
FMO	Flavinhaltige Monooxygenasen
FMO1	FMO1 Dimethylaniline monooxygenase
FMO2 GS-OX	Flavin-containing monooxygenase FMO GS-OX-like 2
FMO5	FMO5 Dimethylaniline monooxygenase
FMOGS-OX5	Flavin-containing monooxygenase FMO GS-OX5-like
FVB	Frisch verdeckelte Brut



fw	Forward
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GC	Anteil der DNA-Basen Guanin und Cytosin an der Gesamtheit der Basen
GO	Gene Ontology
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HGD	Homogentisat 1,2-Dioxygenase
HSP	Hitzeschockprotein
HSP70	Heat shock 70 kDa Protein
HSP70-1/8	Heat shock 70 kDa protein 1/8
HSP70-2	Heat shock 70 kDa protein cognate 2-like
HSP90	Heat shock protein 90
IF1A	Translation initiation factor 1A
IF3C	Translation initiation factor 3 subunit C
IF4G	Translation initiation factor 4G
IPM	Integrated Pest Management
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
L	Ladder
L (cm)	Weglänge für die Absorption
L15	Large subunit ribosomal protein L15
L19	Large subunit ribosomal protein L19
L20	Large subunit ribosomal protein L20
L39	Large subunit ribosomal protein L39
L8e	Large subunit ribosomal protein L8e
LC	Liquid-Chromatographie
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektometrie/Massenspektometrie
LD05	Kleinste tödliche Dosis
LD50	Mittlere tödliche Dosis
LE	Low Electroendosmosis
LP0	Large subunit ribosomal protein LP0
LP1	Large subunit ribosomal protein LP1
m	Milli
M	Mol
M	Klassifizierung von <i>A. mellifera</i> : West- und Nordeuropa
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
mA	Milliampere
MDH	Malat dehydrogenase
MF	Molekulare Funktion

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-MLV-RT	Murinen Leukämievirus
Mrd.	Milliarden
MRJP-1	Major royal jelly protein 1
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/ MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS1-Spektrum	Normalmassenspektrum
MTHFD1	10-Formyltetrahydrofolat-Synthetase
M-Wert	Stabilitätswert „M“
n	Nano
NADH-DH	NADH dehydrogenase
NADP/ H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDUFB10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex subunit 10
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
O	Klassifizierung von <i>A. mellifera</i> : Ost- und Zentralasien
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hyperoxid-Anion
OD	Optical density
OES	Oxalessigsäure
OH <sup>-</sup>	Hydroxylradikal
PBS	Phosphat-gepufferter Salzlösung, Phosphate Buffered Saline
PCA	Hauptkomponentenanalyse, Principal Component Analysis
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCRF1	Peptide chain release factor subunit 1
PG-P	Pyroglutamyl-peptidase
PKA-C1	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic subunit 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POL1	Peroxidase-like isoform X1
PTM	Posttranslationelle Modifikation
rev	Reverse
RIN	RNA Integritätsnummer
RINe	RIN-Äquivalent
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNA-Seq	Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung

RNF126	E3 ubiquitin-protein ligase RNF126-like
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPKM	Reads per kilobase per million mapped reads
RPL13a	60S ribosomal protein L13a
RPS18	40S ribosomal protein S1
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RSEM	RNAseq by Expectation Maximization
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	Quantitative RT-PCR
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. crassipalpis</i>	<i>Sarcophaga crassipalpis</i>
S5	Small subunit ribosomal protein S5
SAHD	Succinate dehydrogenase
SBS	Sequencing by synthesis
SCS	Succinyl-CoA synthetase beta subunit
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STAR	Spliced Transcripts Alignment to a Reference
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TDP	"Top-Down"-Proteomik
TE	Tris-EDTA
THF	Tetrahydrofolsäure
TNB	2-Nitro-5-Thiobenzoat
U	Internationale Enzymeinheit
U/mg Protein	Enzymeinheit pro mg eingesetztes Protein
UFZ	Helmholtz Insitut für Umweltforschung
UK	Uridine kinase
UV	Ultraviolet
V	Volt
<i>V. destructor</i>	<i>Varroa destructor</i>
v.a.	Vor allem
VM	Varroa-Milbe
W	Watt
z.B.	Zum Beispiel
$\Delta A / \text{min}$	Änderung der Absorption/ Zeit
$\epsilon$	Molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{mM}^{-1} / \text{cm}$ ]
$\mu$	Mikro



# Einleitung

## 1. Einleitung

Seit einigen Jahren werden in der Imkerei periodisch auftretende, teils massive Honigbienen-Völkerverluste beklagt, deren Ursachen in den Medien und der Öffentlichkeit kontrovers diskutiert werden. Ursächlich für dieses Phänomen ist vermutlich eine Kombination aus dem Befall verschiedener Krankheitserreger bei gleichzeitiger Zerstörung des natürlichen Lebensraums durch eine intensiviertere Landwirtschaft mit chronischem Einsatz Insektentoxischer Pestizide. Der mittlerweile ubiquitär vorkommende und schwer zu bekämpfende Bienenparasit *Varroa destructor* und die durch ihn übertragenden Krankheitserreger scheinen hierbei eine dominante Rolle zu spielen.

Aus veterinärmedizinischer Sicht zählt die Honigbiene laut §1, Abs. 2 Nr. 2 des Tierseuchengesetzes zu den Haustieren und wird aufgrund der Honigproduktion zu den Lebensmittel-liefernden Tieren gerechnet; die Varroose ist behandlungspflichtig. Die obligatorische Behandlung der Varroose wird bei Honigbienenvölkern mit synthetischen Akariziden (z.B. Amitraz, Coumaphos oder Fluvalinat) sowie natürlich vorkommenden organischen Säuren (z.B. Ameisensäure, Oxalsäure) und ergänzenden biotechnischen Verfahren (z.B. Ausschneiden der Drohnenbrut oder dem Bannwabenverfahren) durchgeführt. Das momentan bestehende Problem des unzureichenden Behandlungserfolgs einer solchen Varroose-Therapie steht hier im Fokus.

Als von Imkern großflächig und seit Jahrzehnten eingesetztes Varroazid gilt die Ameisensäure (AS), die aufgrund ihrer zahlreichen Vorteile gegenüber synthetischen und anderen alternativen Wirkstoffen als derzeit zuverlässigste Behandlungsmethode angesehen wird (FRIES 1991, IMDORF et al. 2003, AMRINE JR und NOEL 2006). Trotz des intensiven Einsatzes sind die molekularen Wirkungsmechanismen noch nicht vollständig erforscht, obwohl bekannt ist, dass der Behandlungserfolg stark von äußeren sowie inneren Faktoren abhängig ist (CALDERONE 1999, IMDORF et al. 1999, ROSENKRANZ et al. 2010).

Um die Wirkung der Behandlung mit AS besser zu erfassen, sollte eine umfassende molekulare Charakterisierung und Aufklärung der Wirkungsweise der AS auf Bienen und Varroa-Milben in diesem Projekt vorangetrieben werden. In diesem Zusammenhang wurden spezifische Wirkungen und Schädigungen durch AS zeitgleich auf Honigbienen sowie Varroa-Milben mittels vergleichender molekularbiologischer und biochemischer Methoden untersucht. Ziel dieser Studie war es, wissenschaftlich fundierte Informationen zu betroffenen Zielorganen oder Stoffwechselwegen zu erlangen, um eine Aussage darüber zu treffen, warum und unter welchen Konditionen die Varroa-Milbe empfindlicher auf die AS-Behandlung reagiert als die Honigbiene. Durch das bessere Verständnis zur molekularen Wirkung des Medikaments AS könnte der Behandlungs-Erfolg bei der Varroa-Bekämpfung deutlich erhöht und die immer wieder auftretenden negativen Effekte auf die Honigbienen verringert werden.

## 2. Literatur

### 2.1. Die Honigbiene

Honigbienen zählen zur Gattung *Apis* und gehören zur Familie der *Apidae* in der Ordnung der *Hymenoptera* innerhalb der Klasse der *Insecta*. Es sind elf Honigbienenarten anerkannt: *Apis andreniformis*, *Apis binghami*, *Apis breviligula*, *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*, *Apis koschevnikovi*, *Apis laboriosa*, *Apis mellifera*, *Apis nigrocincta* und *Apis nuluensis* (MICHENER 2000).

In dieser Studie wird ausschließlich die westliche Honigbiene, *A. mellifera*, eingesetzt, die ein natürliches Verbreitungsgebiet in Europa, dem Mittleren Osten, Asien und Afrika zeigt. Aufgrund dieses breiten geografischen Vorkommens wurde eine Klassifizierung in vier verschiedene Linien vorgenommen, die auf morphologischen und genetischen Eigenschaften basiert: M (West- und Nordeuropa), C (Süd- und Osteuropa), O (Ost- und Zentralasien) und A (Afrika) (RUTTNER et al. 1978, CORNUET und GARNERY 1991, FRANCK et al. 2000).

*A. mellifera* lebt in großen sozialen Gruppen, den sogenannten "Kolonien". Diese setzen sich aus drei Kasten zusammen, die jeweils eine spezifische Aufgabe besitzen (POHL 2017):

- eine Bienenkönigin (fruchtbares Weibchen; diploid)
- Arbeiterinnen (sterile Weibchen; diploid)
- Drohnen (Männchen; haploid).

Nach Erreichen der Geschlechtsreife sammelt die Bienenkönigin bei dem sogenannten Paarungsflug Spermien von verschiedenen Drohnen, die daraufhin sterben. Sie steuert die Kolonieentwicklung durch Befruchtungskontrolle, indem sie entweder Spermien auf Eier überträgt, sodass aus diesen diploide Weibchen schlüpfen, oder nicht befruchtete Eier produziert, sodass aus diesen haploider Drohnen-Nachwuchs entsteht (CHARLESWORTH 2003, HEIMPEL und DE BOER 2008, POHL 2017). Bis zum Schlupf einer Imago aus dem gelegten Ei vergehen je nach Kaste zwischen 16 - 24 Tage:

- 0 - 3 Tage für das Eistadium
- 4 - 10 Tage für das Larvenstadium
- 11 - 21/ 24 Tage für das Puppenstadium

Die Kasten unterscheiden sich in der Dauer der Entwicklung:

- Königin: ca. 16 Tage
- Arbeiterinnen: ca. 21 Tage
- Drohnen: ca. 24 Tage

Arbeiterinnen sind die Hauptarbeitsgruppe der Kolonie mit ca. 50.000 Individuen während der Haupttracht im Juni, wobei sich das individuelle Aufgabenfeld der Biene von der Altersstufe ableitet (BLACKISTON und SCHWAIBOLD 2016, POHL 2017):

Tabelle 1: Tätigkeiten der Arbeiterinnen.

Lebenstag	Aufgaben im Bienenvolk
1 - 3	Säuberung der Zellen
4 - 5	Vorbereitung der Pollennahrung und Fütterung der Larven
6 - 13	Entwicklung Futtersaftdrüsen, Versorgung der Larven und der Königin, Entsorgung toter Bienen
14 - 16	Ausscheidung von Wachs, Wabenbau und Verdeckeln der Brut, Erzeugung von Luftzirkulation
18 - 21	Wachbiene am Eingang des Bienenstocks, Wabenbau
ab 21	Sammelflüge (Eintrag von Pollen, Propolis, Wasser und Nektar)

Sommer-Arbeiterbienen leben etwa vier Wochen. Sogenannte Winterbienen, die ab September schlüpfen, leben dagegen aufgrund größerer Energiereserven (im Spezifischen

# Literatur

der Proteinstatus im Fettkörper) und dem geringeren Arbeitsaufwand bis zu sechs Monate (AMDAM und OMHOLT 2002, POHL 2017).

## 2.2. Die Bedeutung der Honigbiene

Die westliche Honigbiene ist ein weltweit kommerziell wichtiger Nutzorganismus und unverzichtbar für die Agrar- und Kulturlandschaft (SOUTHWICK und SOUTHWICK JR 1992). Ein Drittel der weltweiten Nahrungsmittelpflanzen sind bestäubungsabhängig (DELAPLANE und MAYER 2000), von denen etwa 90 % durch die kommerzielle Bestäubungsleistung der Honigbienen gedeckt werden (KLEIN et al. 2006, AIZEN et al. 2008). Somit gelten Honigbienen als die wirtschaftlich wertvollsten Bestäuber. In Deutschland bestäubt die Honigbiene circa 80% der heimischen Nutz- und Wildpflanzen, sodass nach Angaben des Deutschen Imkerbundes e.V. (DIB) der ökonomische Wert ihrer Bestäubungsleistung auf etwa 2 Mrd. € im Jahr geschätzt wird. Der ökonomische Nutzen der Bestäubungsleistung belief sich in 2005 in der Europäischen Union auf etwa 14,2 Mrd. € und weltweit sogar auf 153 Mrd. € (GALLAI et al. 2009). Dabei entfallen auf Obst- und Gemüsekulturen jährlich jeweils 50 Mrd. € und auf Kulturen essbarer Ölfrüchte etwa 39 Mrd. € im Jahr (SOUTHWICK und SOUTHWICK JR 1992, GALLAI et al. 2009). Damit übersteigt der volkswirtschaftliche Nutzen der Bestäubungsleistung den Wert der Honigproduktion um ein Vielfaches, dessen direkter Wert in der EU etwa 140 Mio. € beträgt (MORITZ et al. 2010).

## 2.3. Völkerverluste und ihre Ursachen

Obwohl in Deutschland seit 2012 ein stetiger Anstieg der Imkernden und zugehöriger Honigbienenvölker beobachtet werden kann (DIB, 2019), treten anhaltend überdurchschnittlich hohe Völkerverluste während der Winterruhepause auf. So lagen die Winterverluste sowohl im Winter 2016/ 2017 als auch 2017/ 2018 im Schnitt bei 18 % und im Winter 2018/ 2019 bundesweit zwischen 13,8 und 14,9 % (Online-Erhebung des Fachzentrum Bienen und Imkerei, Mayen). Laut MEIXNER (2010) sind in Europa die Zahlen der imkerlich gemanagten Honigbienen-Völker insgesamt rückläufig. Zudem stiegen in den letzten Jahrzehnten die Verluste der imkerlich betreuten Honigbienen-Völker (POTTS et al. 2010) sowie Wildbienen-Populationen und wild lebender Honigbienen-Völker an (KRAUS und PAGE JR 1995, MORITZ et al. 2007, JAFFE et al. 2010). Große Aufmerksamkeit in der Bienengesundheits-bezogenen Forschung gilt der sogenannten *Colony Collapse Disorder* (CCD) (COX-FOSTER et al. 2007, JOHNSON et al. 2009, MORITZ et al. 2010), ein Begriff, der für bislang unerklärliche, massive Kolonieverluste steht. Es ist davon auszugehen, dass hierbei kein einzelner Faktor, sondern bestimmte virulente Kombinationen von Krankheitserregern (Bakterien, Viren und Parasiten) bei gleichzeitiger chronischer Expositionen gegenüber Pestiziden und eine fortschreitende Zerstörung des natürlichen Lebensraums und Nahrungsangebots durch eine intensiviertere Landwirtschaft (THOMPSON 2003, CHEN und EVANS 2007, STOKSTAD 2007, JOHNSON et al. 2009, LE CONTE et al. 2010) als Ursache dieses Phänomens anzusehen sind.

## 2.4. Die Varroa-Milbe

### 2.4.1. Epidemiologie

Die Varroa-Milbe *Varroa destructor* (Acari: Varroidae; bis 2000: *Varroa jacobsoni* (ANDERSON und TRUEMAN 2000)), erstmals in Java entdeckt, parasitierte ursprünglich die östliche Honigbiene, *Apis cerana*, in Asien. Mitte des 20. Jahrhunderts wurde sie mittels Import auf die westliche Honigbiene, *A. mellifera*, übertragen, wahrscheinlich als Folge der unmittelbaren Nähe der beiden Arten (ROSENKRANZ et al. 2010). Durch das relativ neue Verhältnis von Parasit und Wirt und die fehlende Koevolution, die in der Beziehung von *A. cerana* und der Milbe bereits besteht, ist die westliche Honigbiene gegenüber *V. destructor* deutlich empfindlicher (ROSENKRANZ et al. 2010). *A. cerana* scheint aufgrund intensiver Pflege und Putzverhaltens während des Befalls (BÜCHLER et al. 1992) und einer Neigung des Parasiten, hauptsächlich in der Drohnenbrut zu reproduzieren (KOENIGER et al. 1983), deutlich besser an die Milbe angepasst zu sein.

## Literatur

Ein Anstieg des internationalen Handels mit *A. mellifera* begünstigte eine weltweite Ausbreitung der Milbe (OLDROYD 1999), die erstmals in den späten 1970er Jahren in Westeuropa gemeldet wurde. Die hohe Dichte gemanagter Bienenvölker in menschlicher Obhut sowie die Tendenz zum Schwärmen und Raub untergehender Völker untereinander begünstigen die Übertragung der Milbe zwischen einzelnen Kolonien (SAMMATARO et al. 2000, LE CONTE et al. 2010).

### 2.4.2. Morphologie

Adulte *V. destructor* Weibchen besitzen eine querovale Körperform mit den Maßen von etwa 1,1 – 1,3 mm in der Länge und 1,3 – 1,6 mm in der Breite. Sie besitzen eine braune Färbung. Unter dem nach oben gewölbte Rücken, der von einem Borsten-besetzten Schild vollständig bedeckt wird, ragen acht mit tarsalen Sauglappen versehene Beinorgane hervor (ECKERT et al. 2005). *V. destructor* Männchen sind mit ihrer rundovalen Körperform vergleichsweise klein (Länge von 0,9 mm x Breite von 0,8 mm) (SAMMATARO et al. 2000). Aufgrund der fehlenden Cuticula-Sklerotisierung sind sie weiß gefärbt (Abbildung 1).



Abbildung 1: Die Varroa-Milbe.

Verschiedene Entwicklungsstadien der Varroa-Weibchen und das Varroa-Männchen (untere Reihe rechts) (Bildquelle: Arne Kablau, Institut für Veterinär-Biochemie, FUB).

### 2.4.3. Entwicklung

Als obligater Parasit ist *V. destructor* hochadaptiert an seinen Wirt und mit dem Lebenszyklus der Honigbiene eng verbunden (SAMMATARO et al. 2000, ROSENKRANZ et al. 2010). Die Reproduktion der Milben verläuft synchron mit der Entwicklung der Bienenbrut (IFANTIDIS und ROSENKRANZ 1988, KANBAR und ENGELS 2004). Adulte *V. destructor* Weibchen wandern kurz vor der Verdeckelung in die Brutzellen ein und verstecken sich bis zum Verschluss der Zelle in der Larvennahrung (SAMMATARO et al. 2000, ROSENKRANZ et al. 2010). Rund 60 Stunden nach der Verdeckelung beginnt das Weibchen mit der Eiablage, wobei sich ein haploides Männchen aus dem unbefruchteten ersten Ei entwickelt. Dieses erreicht nach 5 – 6 Tagen die Geschlechtsreife und befruchtet noch in der Brutzelle mehrmals die adulten Weibchen, bevor es stirbt (OLDROYD 1999, SAMMATARO et al. 2000). Im 30-Stunden Takt werden die befruchteten Eier gelegt, aus denen sich diploide Weibchen entwickeln. Die Weibchen verlassen mit der schlüpfenden Jungbiene die Zellen und infizieren ältere Stockbienen, durch die sich die Milben im gesamten Brutzellbereich verteilen und so bereits wenige Tage oder Wochen später erneut Brutzellen befallen können (SAMMATARO et al. 2000). Hierbei sind Drohnenbrutzellen acht- bis zehnfach stärker befallen als Arbeiterinnenzellen. Dies ist durch die höhere Frequenz, mit der Arbeiterinnen



## Literatur

Drohnenbrutzellen aufsuchen und die längere Puppenruhe der Drohnen zu erklären (BOOT et al. 1995).

Die Milbenpopulation im Volk steigt im Jahresverlauf an und weist die höchsten Zahlen im Oktober und November auf. Faktoren, die zur Verlängerung der Brutperiode führen, begünstigen die Vermehrung der Milbe. Im August beginnt das Bienenvolk mit Aufzucht von Winterbienen, sodass ein starker Befall zur Reduktion gesunder Winterbienen mit nachfolgender Schwächung des Volks führt, das ohne eine Reduzierung der Milbenpopulation in wenigen Jahren zugrunde gehen würde (FRIES et al. 2006, ROSENKRANZ et al. 2010).

### 2.5. Die Varroose

Die Gattung *Varroa* umfasst vier Arten, inklusive der Art *V. destructor*, bei der zwischen sechs Haplotypen unterschieden wird, von denen wiederum vier auf *A. mellifera* parasitieren. Von diesen sind der japanisch-thailändische und der koreanische Haplotyp hochpathogen für die westliche Honigbiene (DE GUZMAN und RINDERER 1999). Ein Befall durch *V. destructor* bei *A. mellifera* führt zur sogenannten Varroose, einer Parasitose adulter Bienen und der Bienenbrut. Aufgrund des fehlenden Wirt-Parasit-Gleichgewichts kommt es bei *A. mellifera* zu schwerwiegenden Befalls-Folgen, sodass die Varroose heute weltweit zu einem der größten Probleme in der Honigbienenzucht und -haltung zählt (SAMMATARO et al. 2000). Ohne den mehrmals jährlichen Einsatz von Varroaziden in der Imkerei stirbt eine mit Milben befallene Kolonie in der Regel innerhalb von ein bis drei Jahren (BEETSMA 1994, FRIES et al. 2006, ROSENKRANZ et al. 2010).

Man unterscheidet zwischen direkter Schädigung durch die Milbe selbst und indirekter Schädigung durch die Übertragung mehrerer Krankheitserreger, hauptsächlich von Viren (BALL 1983, BOWEN-WALKER et al. 1999, CHEN et al. 2004, TANTILLO et al. 2015). Nach neueren Berichten ernährt sich die Milbe aus dem Fettgewebe und den enthaltenen Nährstoffen der sich entwickelnden Larve (RAMSEY et al. 2019), was zu einem Gewichtsverlust und Schwächung beim Schlupf führt (DE JONG et al. 1982, DUAY et al. 2003, GAREDEW et al. 2004). Die Parasitierung führt weiterhin zu Verhaltensänderungen der Biene, einschließlich einer verlängerten Futterzeit, einer reduzierten Rückkehr in die Kolonie und einer verkürzten Lebenszeit (ROSENKRANZ et al. 2010, ARONSTEIN et al. 2012). So wird die durchschnittliche Lebensdauer von Arbeiterinnen in Korrelation zum steigenden Grad des Brutbefalls stark parasitierter Kolonien im Spätsommer um bis zu 50 % reduziert (RITTER et al. 1984, KOVAC und CRAILSHEIM 1988). Eine der schwerwiegendsten Beeinträchtigungen der Vitalität von *A. mellifera* durch die Parasitierung ist die Übertragung verschiedener Bienenpathogener Viren. Unter diesen ist das sogenannte *Deformed Wing Virus* (DWV) (BOECKING und GENERSCH 2008), das zur Entwicklung nichtfunktionaler Flügel und eines verkürzten Abdomens während der Ontogenese führt, sodass betroffene Individuen essentielle Aufgaben in der Volksstruktur nicht wahrnehmen können. Auch für *V. destructor* ist DWV infektiös und kann in ihr replizieren, erzeugt hier allerdings keine klinischen Symptome (GISDER et al. 2009). Eine Beeinträchtigung der Immunabwehr von befallenen *A. mellifera* scheint die Vermehrung bestimmter, sowohl Varroa-assoziiertes als auch nicht-assoziiertes Bienenviren zu induzieren und ihre Schädigungen zu verstärken (TENTCHEVA et al. 2004, SHEN et al. 2005, YANG und COX-FOSTER 2007, LE CONTE et al. 2010, DI PRISCO et al. 2011, RICHARDS et al. 2011, DAINAT et al. 2012).

### 2.6. Bekämpfungsstrategien der Varroose

Eine angemessene und rechtzeitige Milbenbekämpfung ist für die Imkerei in Europa und den meisten anderen Regionen der Welt unerlässlich. Zur Bekämpfung der in Deutschland nach dem Tierseuchengesetz behandlungspflichtigen Varroa-Milbe sind eine Vielzahl an Behandlungsmethoden beschrieben:

Die Varroa-Bekämpfung wurde seit der Einschleppung der Milbe nach Europa zunächst schnell und effizient durch synthetische Akarizide mit den Wirkstoffen Amitraz (Apivar), Coumaphos (Perizin), Fluvalinat (Apistan) und Bromopropylat (Folbex) durchgeführt (RADEMACHER 1990, LE CONTE et al. 2010). Jedoch traten bereits 1995 erste Resistenzen gegen Fluvalinat auf, was außerdem eine Kreuzresistenz gegen weitere Wirkstoffe, wie

## Literatur

Flumethrin (Bayvarol) und Amitraz zur Folge hatte (ELZEN et al. 1999, THOMPSON et al. 2002, LE CONTE et al. 2010). In den darauffolgenden Jahren entwickelten sich Resistenzen gegen weitere Substanzen, wie Coumaphos (SPREAFICO et al. 2001). Neben dieser Problematik führen die lipophilen synthetischen Akarizide außerdem zu Rückständen in Bienenprodukten, wie Honig oder Wachs (CHAUZAT und FAUCON 2007, MULLIN et al. 2010).

Mittlerweile haben sich alternative, nicht-synthetische Varroazide zur Kontrolle von *V. destructor* durchgesetzt (IMDORF et al. 2003). Ein Ansatz ist die Verwendung von ätherischen pflanzlichen Ölen zur Bekämpfung von Bienenmilben (GREGORC und PLANINC 2005). Allerdings sind Pflanzenöle komplexe Verbindungen, die unerwünschte Nebenwirkungen auf Bienen haben können (GASHOUT und GUZMÁN-NOVOA 2009, MONDET et al. 2011, BONCRISTIANI et al. 2012) und zur Verunreinigung der Bienenprodukte führen können (LODESANI et al. 1992, BOGDANOV et al. 1998). Standard in der Varroa-Bekämpfung sind zurzeit organische Säuren, die weltweit flächendeckend zum Einsatz kommen. In Deutschland sind die natürlich vorkommenden Ameisensäure, Oxalsäure und Milchsäure als Tierarzneimittel zur Bekämpfung des Parasiten zugelassen (KRAUS und BERG 1994, IMDORF et al. 1999, GREGORC und PLANINC 2002, GREGORC und POKLUKAR 2003, NANETTI et al. 2003, GIRIŞGIN und AYDIN 2010, RADEMACHER et al. 2017) und weisen eine hohe Wirksamkeit gegen *V. destructor* auf. Im Gegensatz zur AS ist die Anwendung von Oxal- und Milchsäure allerdings nur in brutfreien Phasen erfolgversprechend und wird dementsprechend in den Wintermonaten oder zur Behandlung von Ablegern verwendet.

Das integrierte Varroa-Bekämpfungskonzept (IPM, *Integrated Pest Management*) sieht eine Ergänzung der medikamentösen Behandlung durch biotechnische Maßnahmen vor. Dazu zählen unter anderem das Ausschneiden der Drohnenbrut, in denen die Milbe vornehmlich reproduziert (CHARRIÈRE et al. 2012), das Bannwabenverfahren (MAUL et al. 1988) oder das Bestäuben von Kolonien von *A. mellifera* mit Puderzucker zur Induktion des natürlichen Pflegeverhaltens der Bienen (ELLIS et al. 2009). Weitere Möglichkeiten der medikationslosen Behandlung sind die Hyperthermie-Behandlung und die Hochfrequenzschall-Behandlung, nach deren Anwendung allerdings eine erhöhte Larvensterblichkeit beobachtet wurde und die für den flächendeckenden Einsatz in Imkereien mit großen Völkerzahlen bisher eher ungeeignet sind (GORAS et al. 2015, BARRY et al. 2018).

### 2.7. Die Ameisensäure-Behandlung

AS zählt zu den organischen Säuren und wird in geringen Mengen selbst von den Honigbienen produziert (WEHLING et al. 2003). Sie wird in der Imkerei seit mehreren Jahrzehnten flächendeckend eingesetzt.

In Deutschland ist ausschließlich die Verwendung der AS *ad us. vet.* in 60%iger Konzentration zur Behandlung von Bienen zugelassen. Zur Anwendung kommt diese vor oder nach der Einfütterung, wenn die Futterwaben bereits verdeckelt oder noch nicht gefüllt sind. Die Behandlung wird nach der Honigernte im Zeitraum von Anfang August bis Mitte September über etwa 10 – 12 Tage durchgeführt, wenn die Tagesmitteltemperaturen unter 20° Celsius (°C) betragen. Um eine optimale Wirksamkeit auf die Milbe ohne Schädigung der Bienen zu gewährleisten, sollten die Temperaturen von 15° und 25° C während der Behandlungsperiode nicht unter- bzw. überschritten werden (UNDERWOOD und CURRIE 2003). Zur Applikation wird ein zugelassener Applikator verwendet, der auch bei größeren Temperaturschwankungen eine gleichmäßige Verdunstung der AS gewährleistet (SATTA et al. 2005).

Die Verwendung von AS bietet viele Vorteile bei der Varroa-Bekämpfung. Die Flüssigkeit verdampft im Bienenstock und wirkt in der Gasphase, sodass sie als einziger in Deutschland zugelassener Wirkstoff zusätzlich in der versiegelten Brutzelle auf die dort reproduzierenden Milben wirken kann (FRIES 1991). Eine Entwicklung von Resistenzmechanismen gegen die flüchtige organische Säure ist auch nach wiederholter Behandlung unwahrscheinlich, da AS nicht von Stoffwechsellzymen beeinflusst wird, die mit Insektizid Resistenz assoziiert sind (AMRINE JR und NOEL 2006, BEENOW 2015). Durch AS können auch Varroa-Milbenpopulationen, die bekanntlich gegen synthetische Akarizide wie Pyrethroide resistent sind, bekämpft werden. Im Vergleich zu anderen, insbesondere synthetischen Akariziden, birgt

## Literatur

sie zudem ein geringes Rückstandsrisiko in Bienenprodukten, sofern sie zum richtigen Zeitpunkt appliziert wird (IMDORF et al. 2003, OSTERMANN und CURRIE 2004, AMRINE JR und NOEL 2006, BOGDANOV 2006).

Allerdings variiert die Behandlungseffizienz stark je nach Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit, Koloniestärke, Brutpräsenz sowie Art und Position des Verdampfers im Bienenstock (CALDERONE 1999, IMDORF et al. 1999, ROSENKRANZ et al. 2010). Darüber hinaus ist der „Therapeutische Index“, also die Spanne zwischen der tödlichen Dosis für Milben und Schädigung der Honigbienen, relativ eng, was zu einer unbeabsichtigten Schädigung der Bienen führen kann. Dies kann eine Erhöhung der Sterblichkeit der Königinnen, Brut und frisch geschlüpfter Arbeiterinnen beinhalten (BOLLI et al. 1993, ROSENKRANZ et al. 2010, DIETEMANN et al. 2012).

### **2.8. Studien zur molekularen Wirkungsweise der AS in Honigbienen und Varroa-Milben**

Obwohl bereits eine Vielzahl von Studien über die Wirksamkeit von AS unter verschiedenen Imkerei- und Klimabedingungen und ihre Auswirkungen auf Honigbienen durchgeführt wurden (BÜCHLER et al. 1992, BOLLI et al. 1993, CALDERONE 1999, IMDORF et al. 1999, SATTA et al. 2005), ist relativ wenig über ihre genauen molekularen Wirkungsweisen in der Honigbiene und der Milbe bekannt. Es wird angenommen, dass AS *V. destructor* schädigt, indem die mitochondriale Elektronentransportkette durch Bindung der Cytochrom-C-Oxidase gehemmt wird (NICHOLLS 1975, KEYHANI und KEYHANI 1980, LIESIVUORI et al. 1991). Folglich kommt es zu einer Hemmung der (Zell-)Atmung mit Übersäuerung des Körpers (BOLLI et al. 1993).

Bisher beschreiben nur wenige Studien tatsächlich die Wirkung der AS bei der Honigbiene auf molekularem Niveau. Eine Studie untersuchte die Genexpression von Honigbienen, die mit Miteaway (Wirkstoff: AS) behandelt wurden und fand heraus, dass AS die Expression des Entgiftungs-assoziierten PKA-C1-Gens beeinflusst (BONCRISTIANI et al. 2012). In einer neueren Studie wurde festgestellt, dass AS die Hemmung der Expression von CYP9Q3 (assoziiert mit Detoxifikation) und die Heraufregulation von Defensin-1 (assoziiert mit der Immunantwort) induziert, was auf eine teilweise Beeinträchtigung der Entgiftungsmechanismen und die Induktion von Immunantworten der exponierten Bienen hindeutet (GASHOUT et al. 2018). Untersuchungen des Bienenhirns zeigten eine leichte Induktion von Hitzeschockproteinen nach AS-Exposition, die als molekularer Indikator für Stress gelten (GUNES et al. 2017). Weiterhin sollen organische Säuren die Immunabwehr der adulten Arbeiterinnen negativ beeinflussen. Die Studie von STRACHECKA et al. (2012) besagt, dass AS die Proteinkonzentration und die Aktivität des proteolytischen Systems an der Körperoberfläche der Bienen senkt, wodurch die proteolytische Barriere als Schutz gegen Krankheitserreger geschädigt wird. Histopathologische Untersuchungen (GREGORC et al. 2004) ermittelten die Auswirkungen von AS auf Honigbienenlarven. Sie beschrieben, dass verdampfte AS einen deutlichen apoptotischen Zelltod in den peripheren, kutikulären und subkutanen Geweben induzierte, der zum Tod des gesamten Larvenkörpers führte. Derartige Untersuchungen auf molekularem Niveau sind bei der Varroa-Milbe bisher nicht veröffentlicht worden.

### **2.9. Die Transkriptom-Analyse**

Der Terminus Transkriptom wird in Analogie zu dem Begriff Genom genutzt und beschreibt die Gesamtheit der RNA-Moleküle eines Organismus, eines Gewebes oder einer Zelle. Es stellt somit alle aktiven Gene und deren relative Expression zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen dar (GIBSON und MUSE 2002). Während das Genom weitgehend statisch ist, verhält sich das Transkriptom aufgrund sowohl interner (z.B. Zelldifferenzierung oder Entwicklung) als auch externer Faktoren (z.B. Abwehr oder Entgiftung) dynamisch. So dient es laut VELCULESCU et al. (1997) als dynamisches Bindeglied zwischen dem Genom eines Organismus und seinen physikalischen Eigenschaften.

## Literatur

Die Analyse der Genexpression wird als Transkriptomik bezeichnet. Ihr Vorteil gegenüber der Analyse des Genoms liegt in der Reduktion der genetischen Information auf spezifische, funktionell entscheidende Informationen. Durch die Untersuchung des Transkripts können weiterhin Aussagen über die Expressionsstärke und die komplexen Vorgänge in der Genregulation getroffen werden, die über die Möglichkeiten der genomischen Analyse hinausgehen (ARBEITMAN et al. 2002, CHEN und MANLEY 2009).

### **2.9.1. Next Generation Sequencing**

Die Entwicklung des *Next Generation Sequencing* (NGS), auch bekannt als Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologie, zum Beginn des 21. Jahrhunderts hat die Transkriptomik revolutioniert und ermöglicht nun eine holistische Transkriptom-Analyse (METZKER 2010).

RNA-Seq als Anwendung des NGS zählt als Goldstandard der Transkriptom-Analyse und ermöglicht komplette Expressions-Screens. Es erlaubt unter anderem den Nachweis von alternativem Spleißen, Mutationen und posttranskriptionellen Modifikationen (Conesa et al. 2016). Darüber hinaus können durch RNA-Seq-Experimente "De Novo"-Assemblierungen ganzer Transkriptome und differentielle Analysen globaler Expressionsniveaus als molekulare Reaktion auf definierte Bedingungen gewährleistet werden (HOU et al. 2015).

Der allgemeine Arbeitsablauf eines RNA-Seq-Experiments umfasst vier Teile (HOU et al. 2015):

- I. RNA-Isolation aus Zell-, Gewebe- oder ganzen Organismus-Proben
- II. Vorbereitung von Bibliotheken: cDNA-Synthese, Bindung von Adaptoren an die cDNAs
- III. Amplifikation mittels PCR und Sequenzierung von cDNAs
- IV. Bioinformatische Datenanalyse

### **2.10. Die Proteom-Analyse**

Das Proteom wurde 1996 erstmals von Marc Wilkins in Analogie zum Begriff Genom beschrieben (WILKINS et al. 1996). Es ist definiert als Gesamtheit aller Proteine und ihrer Modifikationen in einer Zelle, einem Gewebe oder einem ganzen Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter einer bestimmten Bedingung (TYERS und MANN 2003, DERACINOIS et al. 2013).

Im Gegensatz zum eher statischen Genom ist das Proteom ständigen Veränderungen unterworfen. Diese resultieren aus Faktoren der Proteinbiosynthese und des -abbaus, sowie Einflüssen verschiedener Proteinisoformen, -modifikationen und -interaktionen (LANGLEY et al. 2012). Als Folge aller posttranskriptionellen und -translationellen Modifikationen kann das Proteom also als eine mehrfache Dimension seines zugrundeliegenden Genoms betrachtet werden (JUNGBLUT et al. 2008, LANGLEY et al. 2012).

Die sogenannte Proteomik, also die Untersuchung des Proteoms (ANDERSON und ANDERSON 1998, CHANDRAMOULI und QIAN 2009), hat in den letzten Jahrzehnten an Bedeutung gewonnen. Sie ermöglicht die Analyse von Protein-Strukturen und -Funktionen und somit die Identifizierung von biologisch relevanten Biomarkern und physiologischen/pathologischen Bio-Mechanismen (LANGLEY et al. 2012).

Da die Häufigkeit der RNA nicht unbedingt mit der Häufigkeit oder Funktion des codierten Proteins korreliert (LANGLEY et al. 2012), sollte sich an die Analyse des Transkriptoms die Beurteilung des Proteoms anschließen.

#### **2.10.1. MS-basierte Proteomik**

Die Flüssigkeitschromatographie (LC) gekoppelt mit einer Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) erlaubt eine gleichzeitige quantitative und qualitative Analyse des Proteoms. Diese Technologie ermöglicht die Untersuchung tausender Peptide sowie deren Modifikationen in komplexen Proteingemischen und gilt als Goldstandard für Proteom-Analysen (AEBERSOLD und MANN 2003).

Es gibt zwei Hauptansätze in der MS-basierten Proteomik, die als "Top-Down"- (TDP) und "Bottom-Up"-Proteomik (BUP) bezeichnet werden. Die TDP analysiert intakte Proteoformen und wird insbesondere zur Analyse komplexer Isoformen und posttranslationalen

## Literatur

Modifikationen (PTMs) oder zur Durchführung von Strukturstudien genutzt (PADULA et al. 2017, FORNELLI et al. 2018).

Die BUP beinhaltet den vorherigen Protein-Verdau zu Peptiden, wodurch die MS-Analyse wesentlich vereinfacht wird (ZHANG et al. 2013). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde dieser BUP-Ansatz der MS-basierten Proteomik gewählt. Der allgemeine Arbeitsablauf ist folgendermaßen: Zunächst werden die zu analysierenden Proteine aus Zelllysaten oder Geweben isoliert. Da die MS hochmolekularer Proteine weniger sensibel ist als die Peptid-MS, werden die Proteine enzymatisch (üblicherweise durch Trypsin) zu Peptiden verdaut (AEBERSOLD und MANN 2003). Anschließend werden die Peptide durch die LC getrennt und in eine Elektrospray-Ionenquelle (Elektrospray-Ionisation; ESI) überführt, wo sie mit Hilfe einer Hochspannung verdampft und ionisiert werden (WILM 2011). Nach dem Verdampfen gelangen die nun mehrfach protonierten Peptide in das Vakuum des Massenspektrometers, wo das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) der Ionen gemessen wird. Zunächst wird ein "Normalmassenspektrum" (MS1-Spektrum) und daraufhin das MS/MS-Spektrum aufgenommen. Diese werden zum Abgleich mit *in silico* verdauten und prozessierten Proteinsequenz-Datenbanken in der weiteren Analyse gespeichert (AEBERSOLD und MANN 2003).

### 2.11. Problemstellung und Zielsetzung

Trotz des jahrzehntelangen und flächendeckenden Einsatzes der AS als Behandlung gegen die Varroose, ist der Wirk- und Schädigungsmechanismus auf molekularer Ebene bei Honigbienen sowie Varroa-Milben weitestgehend unklar. Diese Unkenntnis führt neben dem schmalen therapeutischen Fenster und der meist empirischen ermittelten Wirkungsabhängigkeit von äußeren Faktoren zu unterschiedlichen Therapieerfolgen und teilweise ungewollter Beeinträchtigung und Schädigung der Honigbienen; bei zu geringer AS-Exposition dagegen ist die schädigende Wirkung auf die Varroa-Milbe reduziert.

Das Hauptziel dieses Projekts ist es, die molekularen und biochemischen Mechanismen des Wirkmechanismus der AS in der Honigbiene und der Varroa-Milbe zu charakterisieren. Die Analyse der Expression von Genen und Proteinen mit bekannter, aber auch bisher unbekannter Funktion liefern neue Einblicke in die molekularen Stoffwechsel-Reaktionen auf Exposition mit AS. Nach unserem Kenntnisstand charakterisiert diese Studie erstmals molekularbiologische Effekte auf das globale Transkriptom und Proteom von Wirt und Parasit im Vergleich. Diese Daten können helfen, mögliche Unterschiede in betroffenen Stoffwechselwegen oder Zielstrukturen bei Honigbienen und Varroa-Milben zu identifizieren, damit zukünftige Parasiten-Kontrollstrategien anzupassen und zu optimieren.

Generelles Ziel dieses Forschungsprojekts ist die Charakterisierung der molekularen Wirkungsweise des Varroazids AS auf *V. destructor* und *A. mellifera*. Die folgenden Schwerpunkte wurden bearbeitet:

**Teil 1 - Transkriptom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe zur Aufklärung potentieller Differenzen in der Metabolisierung von Ameisensäure**

**Teil 2 - Proteom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Varroa-Milbe**

**Teil 3 - Etablierung eines Tests zur funktionellen Untersuchung der mitochondrialen Cytochrom C Oxidase-Aktivität bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe**

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Versuchsorganismen

#### 3.1.1. Honigbiene *Apis mellifera*

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Versuchsvölker der westlichen Honigbiene *A. mellifera carnica* verwendet, die am Bienenstand des Instituts für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin (Breitengrad: 52.42898 °N, Längengrad: 13.23762 °E) lokalisiert waren. Bei allen Völkern des Bienenstandes wurden in den vorherigen Jahren regelmäßig Varroose-Behandlungen mit 60%-iger AS gemäß der Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. und eine Betreuung nach bester imkerlicher Praxis durchgeführt. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit wurden alle verwendeten Bienenvölker während der Versuche im selben Beutentyp gehalten: in zweistöckigen Segeberger Classic Bienenstöcken in Deutsch Normalmaß-Rähmchen (DN) zu je elf Rähmchen pro Zarge. Bei allen Völkern des Bienenstandes lag ein natürlicher Befall mit *V. destructor* vor. Um für die molekularbiologischen Untersuchungen gleichaltrige Individuen zu erhalten, wurde die Königin jeweils 21 und 10 Tage vor Beginn der Versuche auf eine leere Brutwabe gesperrt, um entweder 1-Tag-alte Arbeiterinnen (1TA) oder frisch verdeckelte Brut (FVB) zu gewinnen. Während der einzelnen Versuche mussten Individuen gezielt getötet werden. Dies wurde auf schnellste Art und Weise durch Einfrieren bei -80° C umgesetzt. Jedes Tier erhielt eine nach folgendem Muster vergebene individualisierte Identifikationsnummer (Abbildung 2):

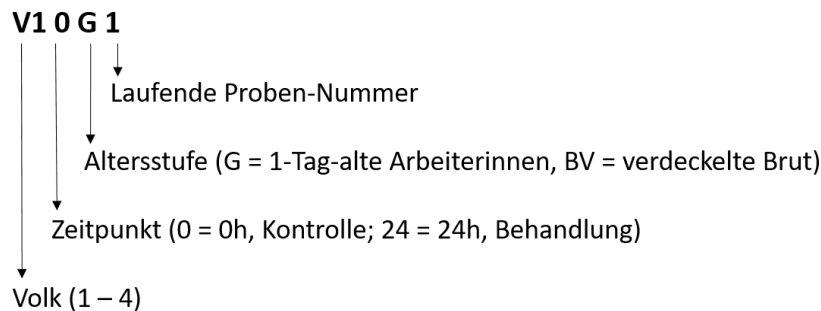


Abbildung 2: Proben-Identifikationsnummer Biene

Durch Zuordnung einer Proben-Identifikationsnummer wurde jede Probe eindeutig identifizierbar und konnte dem entsprechenden Ursprungs-Volk und Zeitpunkt, an dem die Probe gewonnen wurde, zugeordnet werden.

#### 3.1.2. Varroa-Milbe *Varroa destructor*

Adulte weibliche Varroa-Milben (VM) im reproduktiven und phoretischen Stadium wurden aus den oben erwähnten Honigbienenvölkern gesammelt. Dabei wurden die reproduktiven Milben aus den verdeckelten Brutzellen durch Öffnen einzelner Brutzellen mittels Pinsel und Pinzette entnommen. Phoretische Milben wurden direkt von den Körpern adulter Honigbienen und der Windel-Oberfläche, welche unter den Zargen angebracht war, gesammelt, wenn sie noch am Leben waren. Während der einzelnen Versuche mussten Individuen gezielt getötet werden. Dies wurde auf schnellste Art und Weise durch Einfrieren bei -80° C umgesetzt. Die Milben wurden mittels Vergabe einer Identifikationsnummer eindeutig gekennzeichnet (Abbildung 3):

# Material und Methoden

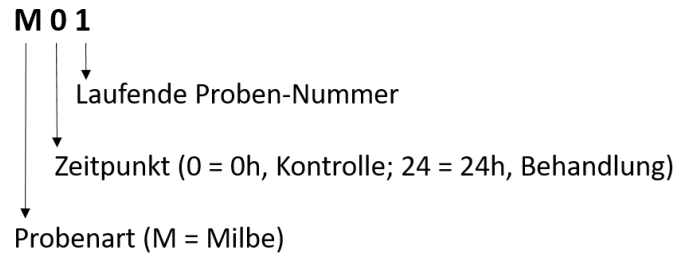


Abbildung 3: Proben-Identifikationsnummer Milbe

## 3.2. Ameisensäure-Behandlung

Für den Feldversuch wurden alle Versuchs-Kolonien mit 200 ml 60%-iger AS *ad us. vet.* (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) mittels eines Nassenheider Verdunsters universal R (Joachim Weiland Werkzeugbau GmbH & Co. KG, Hoppegarten, Deutschland) gemäß den Anwendungshinweisen in der Zeit zwischen August bis September 2018 und 2019 behandelt. Der Applikator besteht aus dem Verdunster universal H und einem vormontierten Rahmen, der ihn sofort einsatzbereit macht und für die Beutenmaße Deutsch Normalmaß, Zander, Dadant und Langstroth abgestimmt ist. Der Nassenheider Verdunster universal R ist ein Langzeitverdunster und dient der kontinuierlichen Verdunstung von AS. Die Säure wird aus dem Tank vom senkrecht stehenden U-Docht am großen Schenkel angesaugt und über den schmalen Schenkel auf ein Vliestuch abgetropft, von wo aus sie schließlich verdunstet. Die Menge der angesaugten Säure sollte dabei über den gesamten Behandlungszeitraum in etwa konstant sein. Durch Anpassung der Dochtgröße kann auf Schwankungen der Umgebungstemperatur reagiert werden. Je nach Umgebungstemperatur ändert sich die effektive Verdunstungsfläche auf dem Vlies, die mit AS gesättigt ist. Bei hoher Umgebungstemperatur kommt es zur schnelleren Verdunstung der AS und somit zu einer kleineren Verdunstungsfläche auf dem Vlies; bei niedrigen Temperaturen und langsamer Verdunstung vergrößert sich die Verdunstungsfläche. Geringe Temperaturschwankungen werden somit bis zu einem gewissen Grad ausgeglichen, sodass die Verdunstungsmenge pro Tag annähernd konstant bleibt. Der 300 ml fassende Tank enthält eine Skala, die eine Befüllung unter gesteigerten Sicherheitsbedingungen und auch die Behandlung großer Völker ohne Wiederbefüllung während der Behandlungsdauer ermöglicht. Zwölf Tage nach Beginn der Behandlung wurden die Verdampfer aus den Völkern entfernt, als keine AS mehr in den Applikatoren vorhanden war.

## 3.3. Reagenzien

Tabelle 2: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
10 x Puffer mit MgCL <sub>2</sub>	Fermentas, Schwerte, DE
1x TAE Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, DE
5x Lane Marker Reducing Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
5x RT Puffer	Carl Roth, Berlin, DE
Acetyl-CoA	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
Ameisensäure	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, DE
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
Biozym Blue S Green	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Chaps	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Coomassie-Brillantblau G-250	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Cytochrom C	Sigma Aldrich, Hamburg, DE

## Material und Methoden

DEPC	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
dNTP Mix, 10 mM	Bioline, Luckenwalde, DE
DTNB	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
DTT	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE
EDTA, 25 mM	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE
Ethanol (100%)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethidiumbromidlösung 1 % 10 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Harnstoff	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, DE
KOH	Carl Roth, Karlsruhe, DE
LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
MgCl <sub>2</sub>	Merck Biosciences GmbH, Darmstadt, Deutschland
Oxalessigsäure	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
Oligonucleotide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
PBS	Carl Roth, Karlsruhe, DE
PMSF	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Proteaseinhibitorcocktail	Merck Biosciences GmbH, Darmstadt, Deutschland
Random Hexamer Primer 0,2 µg/ µl	Fermentas, Schwerte, DE
RNAse Away	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton X	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
TRIzol™	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE

### 3.4. Verbrauchsmaterial

*Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien*

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Einmalhandschuhe Latex	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Einmalhandschuhe Nitril	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Einmalskalpell	Braun, Tuttlingen, DE
Eppendorf Tubes PP 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Homogenisationsröhrchen, Keramik-Bead Tubes	MP Biomedicals, Heidelberg, DE
Mikro-Pistill	DWK Life Science, Mainz, DE
Mikrotiterplatte	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Nassenheider Verdunster universal R	Joachim Weiland Werkzeugbau GmbH & Co. KG, Hoppegarten, DE
Parafilm	SPI Supplies, West Chester, USA
Petrischale	ISG Intermed Service GmbH & Co. KG, Geesthacht, DE
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Trockeneis	Linde Gas Deutschland, Berlin, DE



## Material und Methoden

### 3.5. Geräte

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Geräte-Bezeichnung	Hersteller
Automatisiertes Electrophorese Gerät	Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, DE
Automatisiertes Electrophorese Gerät	Agilent 4200 Tapestation	Agilent Technologies, Waldbronn, DE
Electrophorese Power Supply	EV231	Consort, Turnhout, BE
Electrophoresekammer n	MIDI 1	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Festphasenextraktion	SOLA $\mu$ SPE- Platten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Flüssigchromatographie -System	UltiMate™ 3000 RSLCnano System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gewebehomogenisator	FastPrep FP120	Qbiogene Inc, Illkirch, FR
Gewebehomogenisator	Homogenisator nach Potter-Elvehjem	Howe Scientific Inc.,
Gewebehomogenisator	BeadBlaster 24	Benchmark Scientific, Edison, USA
Kühlschrank	Economic	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, DE
Laborwaage	Analytic AC 210S	Sartorius, Göttingen, DE
Massenspektrometer	Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupol-Orbitrap™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mehrkanalpipette	Research plus, 8-Kanal	Eppendorf, Hamburg, DE
Multipette	Xplorer, Einkanal	Eppendorf, Hamburg, DE
Nanoelektrospray-Ionisierungstechnologie	TriVersa NanoMate®	Advion, Inc., Ithaca, USA
nanoHPLC	UltiMate 3000 RSLCnano	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetten	Verschiedene	Eppendorf, Hamburg, DE
Plattenschüttler	MHL 23	HLC by DITABIS, Pforzheim, DE
Plattenzentrifuge	Plate Fuge	Benchmark Scientific, Edison, USA
Real-Time PCR-System	PikoReal	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE
Sequenzierungs-System	Illumina HiSeq4000 System	Illumina Inc., San Diego, USA
Spektralphotometer	iMark™ Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad Laboratories, Inc., Feldkirchen, DE
Spektrophotometer	DeNovix DS-11	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Sterilbank	UVC/T-AR	Biosan, Riga, Latvia, LVA
Thermocycler	Veriti	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, DE
Tiefkühlschrank – 20 °C	Comfort	Liebherr, Bulle, CHE
Tiefkühlschrank – 80 °C	Igloo	Azbil Telstar, S.L.U., Barcelona, Spanien
Tischzentrifuge	Sprout	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Transiluminator	TXF-20.MC	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, DE
UV-Licht Geldokumentation	E-Box CX5.TS	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, DE

## Material und Methoden

Vortexer	VIBROFIX VF1	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, DE
Wasseraufbereitungsanlage	Purelab Flex	ELGA LabWaters, Celle, DE
Wasserbad	Dri-Block DB 2A	Thermo-DUX GmbH Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim, DE
Zentrifuge	Hereaus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE

### 3.6. Software

Tabelle 5: Software

Software	Anwendung	Hersteller
Agilent Expert-Software	Integritätskontrolle RNA	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
BLAST	Primerspezifität	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
Blast2GO	funktionale Klassifikation DEGs	<a href="https://www.blast2go.com/">https://www.blast2go.com/</a> <a href="https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html">https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html</a>
DEseq2	Analyse DEGs	<a href="http://eggnogeth.embl.de/#/app/home">http://eggnogeth.embl.de/#/app/home</a>
eggNOG	funktionale Klassifikation DEPs	<a href="http://eggnogeth.embl.de/#/app/home">http://eggnogeth.embl.de/#/app/home</a>
Excel	Datenanalyse, Erstellung Grafiken	<a href="https://products.office.com/de-de/excel">https://products.office.com/de-de/excel</a> <a href="http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/">http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/</a>
FastQC	Qualitätskontrolle NGS	<a href="https://products.office.com/de-de/excel">https://products.office.com/de-de/excel</a> <a href="https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/">http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/</a>
geNorm	Auswahl stabiler Referenzgene	<a href="https://genorm.cmgg.be/">https://genorm.cmgg.be/</a> <a href="https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/goseq.html">https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/goseq.html</a>
goseq	GO-Term Enrichment	<a href="https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/goseq.html">https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/goseq.html</a>
InterproScan	funktionale Klassifikation DEGs	<a href="https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/">https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/</a>
kallisto	Quantifizierung	<a href="https://pachterlab.github.io/kallisto/about">https://pachterlab.github.io/kallisto/about</a>
KEGG	funktionale Klassifikation DEPs	<a href="https://www.genome.jp/kegg/">https://www.genome.jp/kegg/</a>
NCBI BlastP	funktionale Klassifikation DEGs	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins</a>
NCBI Entrez Gene	Gensequenzssuche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi</a>
NCBI Primer Design Tool	Primer Generierung	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
Percolator	Peptid-Identifizierung	<a href="https://github.com/percolator">https://github.com/percolator</a>
PikoReal Software	Auswertung der RT-qPCR	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Power Point	Erstellung Grafiken	<a href="https://products.office.com/de-de/powerpoint">https://products.office.com/de-de/powerpoint</a>
Proteome Discoverer 2.2.	Identifizierung Proteine	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
RSEM	Quantifizierung	<a href="https://github.com/deweylab/RSEM">https://github.com/deweylab/RSEM</a>
SEQUEST HT	Datenbank-Suchalgorithmus	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
SPSS	Statistische Auswertung	IBM Corp., Armonk, NY, United States
STAR	Alignment	<a href="https://github.com/alexdobin/STAR">https://github.com/alexdobin/STAR</a>

## Material und Methoden

Word	Textverfassung, Erstellung Grafiken	<a href="https://products.office.com/de-de/word">https://products.office.com/de-de/word</a>
------	--	---

### 3.7. Rezepte

Tabelle 6: Rezepte

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Agarose Gel (1,5 %)	6 g Agarose + 400 mL 1x TAE
Agarose Gel (2 %)	8 g Agarose + 400 mL 1x TAE
DEPC-H <sub>2</sub> O	1 % DEPC in ddH <sub>2</sub> O
Extraktionspuffer	85,5 g Saccharose, 1,011 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 1,585 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 37,2 mg EDTA, pH 7,5 (mit KOH eingestellt)
TAE-Puffer	242 g 1mM Tris in 500 ml H <sub>2</sub> O, 100 ml 0.5 M Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0), 57,1 ml Essigsäure, mit H <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen
TE-Puffer	1 ml 10 mM TRIS, 0,2 ml 1 mM EDTA pH 8,0, mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen

### 3.8. Kits

Tabelle 7: Kits

Kit	Methode	Hersteller
NucleoSpin Gel & PCR CleanUp	RNA-Gelextraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
Pierce™ 660 nm Protein Assay	Protein-Quantifizierung	Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany
Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Set	Protein-Quantifizierung	Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany
Qubit-Assay	RNA Qualitätskontrolle	Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany
Quick-RNA™ Microprep Kit	RNA-Extraktion	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg
RNA 6000 Nano Chip Kit	RNA Qualitätskontrolle	Agilent Technologies, Waldbronn

### 3.9. Teil 1 - Transkriptom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe zur Aufklärung potentieller Differenzen in der Metabolisierung von Ameisensäure

#### 3.9.1. Ameisensäure-Behandlung und Probenahme

Alle Experimente wurden in den Saisons 2018 und 2019 am Institut für Veterinär-Biochemie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin durchgeführt. Vier *A. mellifera carnica* Honigbienenenvölker wurden für diese Studie verwendet und mit AS behandelt, wie unter 3.2. beschrieben. Um gleichaltrige Individuen zu gewinnen, wurde die Königin jeweils 21 und 10 Tage vor Versuchsbeginn auf eine leere Brutwabe gesperrt, um entweder 1TA oder FVB zu erhalten.

1TA und FVB wurden unmittelbar vor Beginn der AS-Behandlung als Kontrolle (0 Stunden) und 24 Stunden später (Behandlung) erneut von den präparierten Brutwaben entnommen. Sie wurden einzeln in 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen gegeben und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Für jede Altersgruppe wurden jeweils 72 Individuen entnommen, eine Hälfte als Kontroll- und die andere Hälfte als Behandlungs-Gruppe. Je Kolonie und Behandlungsgruppe (0 Stunden, Kontrollgruppe; 24 Stunden, Behandlungsgruppe) wurden je drei biologische Replikate, also für beide Altersstufen insgesamt 48 Einzel-Proben, mittels RNA-Seq analysiert. Zur Validierung der RNA-Seq-Daten wurden insgesamt 144 Proben anschließend mit RT-qPCR analysiert.

In den gleichen Zeitabständen wie oben beschrieben, wurden adulte weibliche *V. destructor* Milben (VM) in reproduktiven und phoretischen Stadien aus den zuvor erwähnten Honigbienenenvölkern entnommen. Reproduktive VM in verdeckelten Brutzellen wurden durch Öffnen einzelner Brutzellen mit Pinsel und Pinzette entnommen. Phoretische VM wurden direkt von den Körpern der adulten Honigbienen und der Windeloberfläche gesammelt, wenn sie noch am Leben waren. Sie wurden in Zehnergruppen gepoolt, in 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen gegeben und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Je Jahr und Behandlungsgruppe (0 und 24 Stunden) wurden drei Replikate mit RNA-Seq analysiert. Zur Validierung der RNA-Seq-Daten wurden insgesamt 18 Proben mit RT-qPCR analysiert.

#### 3.9.2. RNA-Extraktion

Vor Beginn der RNA-Extraktion wurden alle Flächen und Arbeits-Utensilien mit RNase Away (Thermo Scientific, Karlsruhe, DE) gereinigt, um eine mögliche Kontamination durch RNasen zu vermeiden.

#### *Honigbienen*

Für die RNA-Extraktion von Honigbienen wurde aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der Gewebe für beide Altersgruppen ein jeweils modifizierter Ansatz gewählt: Aufgrund ihres hohen Fettanteils wurde die FVB einzeln in 1000 µl Trizol® (Thermo Scientific, Karlsruhe, DE) mit einem sogenannten BeadBlaster (Benchmark Scientific, Edison, USA) und 1,4 mm Keramik-Beads in speziellen Homogenisations-Röhrchen (MP Biomedicals, Heidelberg) homogenisiert. Dabei wurden drei Homogenisationszyklen für 20 Sekunden (s) bei 7 M durchgeführt, zwischen denen eine Pause von jeweils 3 Minuten (min) auf Eis eingehalten wurde, um die RNA durch die entstehende Reibungs-Wärme nicht zu schädigen. Anschließend wurden die homogenisierten Proben 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Proben bei 12.000 x g für 10 min bei 4 °C in einer Zentrifuge (Thermo Scientific, Karlsruhe, DE) zentrifugiert und 500 µl des resultierenden Überstandes in ein RNase-freies Röhrchen überführt. Dabei wurde darauf geachtet, die entstandene Fett-Schicht nicht aufzunehmen. Dem Überstand wurden 400 µl Chloroform (Carl Roth, Karlsruhe, DE) hinzugefügt, die Proben anschließend 15 s lang gründlich vermischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie bei 12.000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues RNase-freies Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt. Diese wurde als Ausgangsmaterial für die Total-RNA-

## Material und Methoden

Extraktion mithilfe des Quick-RNA™ *Microprep Kit* (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) verwendet. Dafür wurden dem Überstand das 1,5-fache Volumen Ethanol (100%) (Carl Roth, Karlsruhe, DE) hinzugefügt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Diese Mischung wurde anschließend auf eine Zymo-Spin™ IC Säule in einem Sammelröhrchen überführt und bei 12.000 x g für 30 s zentrifugiert. Nach Verwerfung des Durchflusses wurden 400 µl RNA *Prep Buffer* auf die Säule gegeben und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl RNA *Wash Buffer* auf die Säule gegeben. Anschließend wurde wieder bei 12000 x g für 30 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es wurde erneut mit 400 µl RNA *Wash Buffer* gewaschen und die Säule für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 12.000 x g für 2 min und nach Verwerfung des Durchflusses erneut mit 12.000 x g für 1 min trocken zentrifugiert. Daraufhin wurde die Säule in ein RNase-freies Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt und die RNA mit 15 µl DNase/RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 30 s eluiert. Der zusätzliche Homogenisations-Schritt in Trizol und Chloroform war bei den 1TA nicht erforderlich. Die einzelnen 1TA wurden vor der Homogenisation im Lysis-Puffer in ihre einzelnen Segmente (Kopf, Thorax, Abdomen) zerteilt, um die Homogenisation in den Keramik-*Bead*-Röhrchen zu erleichtern, und anschließend analog zu den Larven-Proben (Quick-RNA™ *Microprep Kit*) weiterverarbeitet.

### *Milben*

Die Total-RNA wurde aus Pools von zehn einzelnen Milben extrahiert, die über alle vier Honigbienen-Kolonien hinweg gesammelt wurden. Die Extraktion wurde mit dem Quick-RNA™ *Microprep Kit* (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt, nachdem die VM mechanisch mit einem Mikro-Pistill (DWK Life Science, Mainz, DE) direkt in 300 µl Lysis-Puffer auf Eis homogenisiert wurden.

### **3.9.3. Quantitäts- und Qualitätsbestimmung der RNA**

Die RNA-Konzentration und Qualität aller Proben wurde mit einem Spektrophotometer (DeNovix DS-11; Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) durch Absorption bei 260 nm bestimmt. Dazu wurden 2 µl des Eluats und reiner Elutions-Puffer als Nullwert gemessen. Die Reinheit der RNA wurde durch Ermittlung des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 230 nm sowie 260 nm und 280 nm (OD 260 nm/ OD 230 nm; OD 260 nm/ OD 280 nm) bestimmt. Reine RNA besitzt bei eine OD 260 nm/ OD 230 nm zwischen 2,0 und 2,2 und eine OD 260 nm/ OD 280 nm um 2 (GALLAGHER und DESJARDINS 2006, BECKER et al. 2010). Die Konzentration jeder RNA-Probe wurde anschließend mit RNase-freiem Wasser auf 1.000 ng/ µl eingestellt und die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° C gelagert.

Die RNA-Integrität wurde mithilfe des Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer und RNA 6000 Nano Chip Kits (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) analysiert. Dabei wurde die Total-RNA kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und detektiert. Anhand der resultierenden Elektropherogramme konnte eine potentielle Degradation der Proben beurteilt werden.

### **3.9.4. RNA-Sequenzierung**

Zur globalen Genexpressionsanalyse wurde die RNA-Seq-Methode zur Analyse aller transkribierten Gene unter einer bestimmten Behandlung zu einem bestimmten Zeitpunkt wie folgt eingesetzt:

Die Total-RNA wurde mit einer DNase I Endonuklease (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) in einem Thermocycler im 96 Well-Format (Veriti, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Anschließend wurden von jeder Probe 1500 ng DNase behandelte RNA zur kommerziellen RNA-Total-Sequenzierung an die Firma GENEWIZ Germany GmbH, Leipzig, Deutschland, zur Durchführung der Sequenzierung übersandt. Vor der Weiterverarbeitung wurden die RNA-Integrität und -Konzentration durch eine Agilent 4200 Tapestation (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) und ein Qubit-Assay (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) erneut getestet. Die Analyse durch Agilent 4200 Tapestation stellt eine Erweiterung der Technologie des Agilent

## Material und Methoden

2100 Bioanalyzers dar und gibt die Qualität der RNA in Form eines RIN-Äquivalent (RINe) an (PADMANABAN et al. 2012). RINe wird als Wert zwischen 1 und 10 dargestellt, wobei 10 die hochwertigste RNA-Probe darstellt. Das Qubit Assay Kit in Verbindung mit dem Qubit Fluorometer bieten eine exakte und hochselektive Methode zur Quantifizierung von RNA-Proben. Gängige Verunreinigungen wie Salze, freie Nukleotide, Lösungsmittel, Reinigungsmittel oder Proteine können im Assay gut kompensiert werden. Für die Präparation der Sequenzierungsbibliotheken (Libraries) wurde das NEBNext® Ultra™ II DNA *Library Prep Kit* for Illumina® (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Illumina HiSeq4000 System (Illumina Inc., San Diego, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Illumina SBS-Technologie (*Sequencing by synthesis*) verwendet fluoreszenzmarkierte Nukleosidtriphosphate (dNTPs), die beim Einbau in einen DNA-Strang emittieren und dadurch eine genaue Einzelbasen-Auflösung ermöglichen (ILLUMINA 2010). Bei der *Paired-End* Sequenzierung wird das DNA-Fragment sowohl vom 3'-Ende als auch vom 5'-Ende sequenziert, wodurch eine Erzeugung der doppelten Anzahl von ausgelesenen Sequenzen (*Reads*) und ein genauere Sequenzvergleich ermöglicht werden (ILLUMINA 2016). Die *Reads* wurden uns nach der kommerziellen Sequenzierung als einzelne FASTQ-Datei zur Verfügung gestellt.

### 3.9.5. Bioinformatische Auswertung der differenziell exprimierten Gene

Die Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte nach einem standardisierten Arbeitsablauf, einer sogenannten *Pipeline* für RNA-Seq-Daten (Abbildung 4).

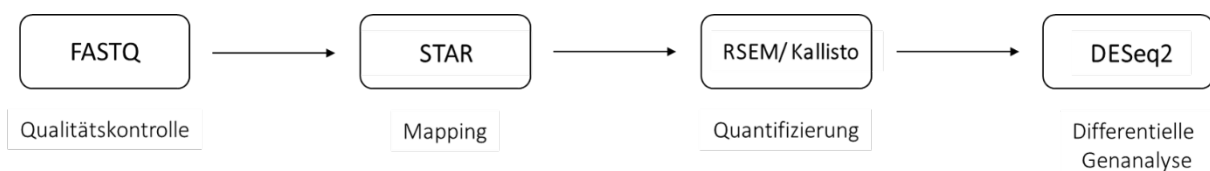


Abbildung 4: Pipeline zur Auswertung der RNA-Seq-Daten

Die Qualität und Integrität der Sequenzierungsergebnisse wurde mit FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) ausgewertet. Zum Erstellen des *Alignments* (Zuordnung der Reads zu dem Referenzgenom) an die neueste Version des Honigbienen- (Amel\_HAV3.1) bzw. Milben-Referenzgenoms (Vdes\_3.0) wurde STAR (*Spliced Transcripts Alignment to a Reference*) verwendet (DOBIN et al. 2013). Die Quantifizierung des *Alignments* erfolgte mit RSEM v1.3.1 (*RNAseq by Expectation Maximization*) (LI und DEWEY 2011) und kallisto v0.45.0 (BRAY et al. 2016). Für die weiterführende Analyse wurden die Quantifizierungsergebnisse durch kallisto betrachtet. Zur Identifizierung unterschiedlich exprimierter Transkripte zwischen der behandelten und unbehandelten Kontrollgruppe wurde das Bioconductor DESeq2-Paket v1.26.0 (LOVE et al. 2014) in der R Umgebung v3.4.1 verwendet. Für signifikant differentiell exprimierte Gene in der Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe wurden die folgenden Grenzwerte definiert:  $\geq 2$ -fache Hoch- bzw. Herunterregulierung bei einem Benjamini Hochberg korrigierten p-Wert von  $\leq 0.05$ . Für eine funktionale Klassifikation der erhaltenen differentiell exprimierten Gene wurden einzelne Proteinsequenzen mit Blast2GO v1.3.3 (CONESA et al. 2005) GO-Termini (*Gene Ontology*; biomedizinische Ontologie, die einzelne Gene und ihre Proteine strukturell übersichtlich in drei Bereiche einteilt: „Zelluläre Komponente“, „Biologischer Prozess“ und „Molekulare Funktion“) zugeordnet. Dazu wurden mit InterproScan v5.17-56.0 (QUEVILLON et al. 2005) Domänen bestimmt und die Gene mit NCBI-BlastP v2.2.27 (MAHRAM und HERBORDT 2010) in der Uniprot KB Datenbank (UniProt Knowledgebase) gesucht. Um die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern, wurde eine systematische Klassifikation der GO-Terminus annotierten Gene anhand ihrer biologischen Funktion durchgeführt. Ein *GO-Term-Enrichment* der differentiell exprimierten Gene wurde mit dem Bioconductor-Paket goseq umgesetzt (CONESA et al. 2005) und konnte somit Hinweise auf überrepräsentierte Funktionen unter den identifizierten Genen liefern. Hierbei wurden die Gene in drei Hauptkategorien „Biologische Prozesse“ (biologische Aktivität des Gens/ Genprodukts), „Zelluläre Komponente“

## Material und Methoden

(Lokalisierung biologischer Aktivität des Genprodukts) und „Molekulare Funktion“ (biochemische Aktivität des Genprodukts) eingeteilt, die durch das *Gene Ontology* Konsortium (<http://geneontology.org>) definiert wurden (ASHBURNER et al. 2000).

### 3.9.6. Primer

Für die spätere Validierung der RNA-Seq-Ergebnisse wurden Sets spezifischer Primer für ausgewählte Gene mit dem *NCBI Primer Design Tool* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) Exon-übergreifend und Target-spezifisch entwickelt. Die in diesem Programm verwendeten Grundeinstellungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Kriterien zur Primer-Generierung.

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

Die Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) synthetisiert und in lyophilisierter (gefriergetrocknet) Form geliefert. Durch Rekonstitution mit einer jeweils spezifischen Menge TE-Puffer wurden Primer-Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 µM hergestellt. Für die Arbeitslösung wurden Aliquots der Stammlösungen mit RNase-freiem Wasser auf 10 µM verdünnt. Um einen Primer Pool mit einer Endkonzentration von 4 µM aus *Forward*- und *Reverse*-Primern jedes Targets herzustellen, wurden jeweils 20 µl der *Forward*- und 20 µl der *Reverse*-Arbeitslösung mit 10 µl RNase freiem Wasser gemischt. Jedes Primerpaar wurde durch den Einsatz seriell verdünnter PCR-Produkte für die Erstellung von Standardkurven auf seine Amplifikationseffizienz getestet. Vor der Verwendung in der RT-qPCR wurde die Qualität aller PCR-Reaktionsprodukte durch Gelelektrophorese und Verifizierung durch Sequenzierung der gereinigten *Amplicons* (Eurofins GATC, Köln, Deutschland) bestätigt. Die ausgewählten Kandidatengene mit den entsprechenden Sequenzen sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Sequenzen der verwendeten Primer in der RT-qPCR Analyse.

Gen-Symbol	Gen-Name	Sequenz fw & rev (5'-3')	Accession Number
CYP6AR1	Cytochrom P450 6AR1	CAGGGTGCTATACGAGAGGTTG ACAAGCACCGATCACGTCAG	XM_623359.6
CYP4AV1	Cytochrom P450 4AV1	GCGGAAAGAAAAGCCGAGTG CACGATACGCTAGTGGCAGT	XM_016912202.2
CYP4AA1	Cytochrom P450 4aa1-like	AGGCGTGGGTATATCTCGTTA GTTTTCGGGCCATTTAGTTGAG	XM_026441577.1
CYP4G11	Cytochrom P450 4G11	TCGAAGCCGGTCAAATGGT CAGTGGTATCGTGTCCCTCA	XM_006559341.2
CYP4AZ1	Cytochrom P450 4AZ1	CTTTTTCCAAGCGTACCACGA TGGCAAATCGTTGTCCAATGC	XM_006564367.2
CYP303A1	Cytochrom P450 303A1	TCCTCCAGGTCCAAAATGGTG GCCGCCTGTTCTTTTGTTCAT	XM_026443771.1
FMO2 GS-OX	Flavin-containing monooxygenase FMO GS-OX-like 2	TATCGTTGGCGTACCGACTG CGTGTCTTTTCTTCGACGCC	XM_016916710.2

## Material und Methoden

FDH	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	TGGGTTTTACTGGGTCTACGC TCCACAAATAGCCGACCAGC	XM_006563788.3
Arp1	Actin related protein 1	GCCAACACTGTCCTTTCTG AGAATTGACCCACCAATCCA	NM_001185146.1
Enolase	Enolase	GGTGATGAAGGTGGTTTTGC GATGCAGCAACATCCATACC	XM_026444626.1
GAPDH	GAPDH	GATGCACCCATGTTTGTTG TTGCAGAAGGTGCATCAAC	XM_393605.7
RPL13a	60S ribosomal protein L13a	TGGCCATTTACTTGGTCGTT GAGCACGGAAATGAAATGGT	XM_623810.5
RPS18	40S ribosomal protein S1	GATCCCGATTGGTTTTTG CCCAATAATGACGCAAACCT	XM_625101.6
FMO5	FMO5 Dimethylaniline monooxygenase	AGGTCTATTTGTCCACCCGC GCTGGGCAAAAATCCTGTGAG	XM_022797929.1
CYP3A56	Cytochrom P450 3A56	TTGCTCGTTTTGGTAGCCCT TTTCCGCGTCTGCTACCATT	XM_022849754.1
SAHD	Succinate dehydrogenase	CAAGGGTGTTACCGCTCTGT ACACGAAAAGTACGCCCGTC	XM_022806549.1
NADH-DH	NADH Dehydrogenase	GCGCGATTTGTTAAAGGCGA ACGCACAGATGGTATGACCC	XM_022804344.1
HSP90	Heat shock protein 90	TTTGTAAACCGACACGAGCTG TGTTGAGCGTGTGAAGAAGC	XM_022791765.1
18S	18S rRNA	TCAATTAAGGGTGTGGGCCG TCACTTCCTGTT CGACAGC	XM_022831401.1

### 3.9.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Reaktionsprodukte wurden mittels Elektrophorese untersucht. Für die Herstellung der Gele (1,5 % und 2 %) wurde LE Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf, DE) verwendet (6 bzw. 8 g Agarose + 400 ml 1x TAE + 40 µl Ethidiumbromid). Für die Gelelektrophorese wurden 12 µl PCR-Reaktionsprodukte mit 2 µl 5x Nukleinsäure-Ladepuffer versetzt und in TAE-Puffer (242 g 1mM Tris in 500 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8.0), 57,1 ml Essigsäure, mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt) in horizontalen Elektrophoresekammern (Carl Roth, Karlsruhe, DE) bei 80 V für eine Stunde aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA wurde Ethidiumbromid (0,5 µg/ ml) (Carl Roth, Karlsruhe, DE) verwendet, die Gele unter einem Transilluminator (TXF-20.MC, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, DE) betrachtet und elektronisch dokumentiert.

### 3.9.8. DNA Gel-Extraktion

Die spezifischen PCR-Produkt-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die Aufreinigung mithilfe des NucleoSpin Gel & PCR CleanUp Kits (Macherey-Nagel, Düren, DE) gemäß Protokoll durchgeführt. Die resultierende DNA wurde in 50 µl Elutionspuffer eluiert und deren Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (DeNovix DS-11, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE) bestimmt.

### 3.9.9. Sequenzierung PCR-Reaktionsprodukte

Die kommerzielle Sequenzierung der PCR-Reaktionsprodukte erfolgte durch die Firma GATC (Köln, DE) mithilfe des Kettenabbruchverfahrens nach SANGER et al. (1977). Hierfür wurden 7,5 µl des PCR-Reaktionsprodukts mit 2,5 µl des spezifischen Primers (10 µM) eingesandt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mittels NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).



## Material und Methoden

### 3.9.10. DNase-Verdau

Um vor der Downstream-Analyse die restliche genomische DNA zu entfernen, wurden 1 µg RNA in einem 96-Well-Thermocycler (Veriti, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit einer DNase I Endonuklease (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) behandelt. Der Reaktionsansatz und die Bedingungen der einzelnen Arbeitsschritte sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Protokoll und Reaktionsansatz des DNase-Verdau.

Reagenz	Volumen Einzelreaktion
RNA	X (1 µg)
10x Puffer + MgCl <sub>2</sub>	1 µl
DNase	1 µl
H <sub>2</sub> O	X
Gesamtvolumen	10 µl

Mischen und herunter zentrifugieren.

37 °C	30 min
50 mM EDTA	1 µl
65 °C	10 min

### 3.9.11. cDNA Synthese (Reverse Transkription der Total-RNA)

Aus der DNase behandelten RNA wurde mittels reverser Transkription durch die Reverse Transkriptase eines Murinen Leukämievirus (M-MLV-RT) (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) die cDNA in einem 96-Well-Thermocycler (Veriti, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) generiert. Der Reaktionsansatz und die Bedingungen der einzelnen Arbeitsschritte sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Kontrollproben, ohne M-MLV-RT Zugabe, wurden unter den gleichen Bedingungen behandelt, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen.

Tabelle 11: Protokoll und Reaktionsansatz der cDNA Synthese

Reagenz	Volumen Einzelreaktion
DNase behandelte RNA	11 µl
Random Hexamer (0,2 µM)	1 µl

Mischen und herunter zentrifugieren.  
Für 5 Minuten bei 70 °C inkubieren.

5x RT Puffer	4 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
H <sub>2</sub> O	1 µl
MMLV-RT	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Mischen und herunter zentrifugieren.

25°C	10 min
------	--------

## Material und Methoden

42°C	60 min
70°C	5 min

### 3.9.12. RT-qPCR

Die Real-Time PCR-Reaktionen zur Quantifizierung der cDNA-Produkte wurden in 96-Well-Platten mit einem PikoReal Real-Time PCR-System (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Für den Reaktionsansatz wurden 1 µl 1:5 verdünnter cDNA aus jeder der zu testenden Proben mit dem Biozym Blue S Green qPCR Mix (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) und 4 µM genspezifischer Primerpools in einem Gesamtvolumen von 10 µl verwendet (Tabelle 12). Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: Der erste Schritt der Amplifikation diente der Denaturierung bei 95 °C für 2 min, gefolgt von 40 Zyklen eines Zwei-Schritt-Protokolls, mit 95 °C für 5 s und 60 °C für 20 s. Diesem Verfahren folgte eine Schmelzkurven-Analyse, um die Qualität und Spezifität jeder RT-qPCR zu bestätigen.

Tabelle 12: Reaktionsansatz der RT-qPCR.

Vorbereitung des Hi-ROX-Mix durch Kombination von 1 ml des 2x-Mix mit 35 µl ROX.

Reagenz	Einzelvolumina
cDNA (1:5 Verdünnung)	1 µl
2x Mix	5 µl
Primer Pool	1 µl
H <sub>2</sub> O	3 µl
Gesamtvolumen	10 µl

9 µl des Mastermixes in jede Vertiefung vorlegen.

1 µl des Primer Pools für jedes Target in die jeweilige Vertiefung geben.

### 3.9.13. Auswertung der RT-qPCR

Die Auswertung der RT-qPCR erfolgte durch die PikoReal Software (Thermo Scientific, Karlsruhe, DE). Als Maß für die Kopienzahl der Transkripte wurde der „*Quantitation Cycle*“ (Cq) bestimmt. Dieser beschreibt den Zyklus der PCR, in dem die Fluoreszenzintensität der Reaktion einen definierten Schwellenwert überschreitet und ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Transkripts.

### 3.9.14. Statistische Auswertung der RT-qPCR

Zur Normalisierung der Expressionsdaten wurde ein Gen-Set, bestehend aus *Arp1*, *Enolase*, *GAPDH*, *RPL13a* und *RPS18* für *A. mellifera* und *SAHD*, *NADH-DH*, *HSP90* und *18S* für *V. destructor*, verwendet. Die jeweils drei am stabilsten exprimierten Referenzgene wurden durch den geNorm-Algorithmus (VANDESOMPELE et al. 2002) bestimmt und für weitere Berechnungen genutzt. Die Verwendung multipler Kontrollgene ist robuster als die Normalisierung über nur ein internes Kontrollgen, das interindividuellen Schwankungen unterliegen kann, und weniger anfällig für Ausreißer.

Die relative Genexpression wurde durch Berechnung der ddCq-Werte (Delta delta Quantitative Cycle) zwischen Kontroll- und Behandlungsproben ermittelt. Hierzu wurden zunächst die dCq-Werte (Delta Quantitative Cycle) der Referenzgruppe (Common Reference, CR) berechnet und hieraus das arithmetische Mittel bestimmt. Dieses wurde daraufhin von den individuellen dCq Werten subtrahiert, um die ddCq Werte jedes Individuums zu errechnen.

## Material und Methoden

$$ddCq = [CqGOI(Probe) - CqRef(Probe)] - [CqGOI(CR) - CqRef(CR)]$$

*Cq* = Quantitation Cycle  
*GOI* = Gene of interest, zu untersuchendes Gen  
*Ref* = Referenzgen  
*CR* = Common Reference, Kalibrator

Zur besseren Darstellbarkeit erfolgte eine Umwandlung der ddCq Werte in *Fold Changes*.

$$Fold\ Change = 2^{-[ddCq]}$$

In SPSS v25 (IBM Corp., Armonk, NY, United States) wurden die normalisierten Expressionswerte zunächst auf Normalverteilung getestet (Kolmogorov-Smirnova-Test). Die statistische Auswertung zur Quantifizierung der mRNAs erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test mit den Signifikanzwerten: \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ . Log2 *Fold Changes* relativ zu den Kontrollen wurden berechnet und mit den RNA-Seq-Ergebnissen verglichen, um die Expressionsergebnisse zu validieren.

### 3.10. Teil 2 - Proteom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Varroa-Milbe

#### 3.10.1. Ameisensäure-Behandlung und Probenahme

Alle Experimente wurden in den Saisons 2018 und 2019 am Institut für Veterinär-Biochemie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin durchgeführt. Vier *A. mellifera* Honigbienenvölker wurden mit AS behandelt, wie unter 3.2. beschrieben.

Adulte weibliche *V. destructor* Milben (VM) in reproduktiven und phoretischen Stadien wurden unmittelbar vor Beginn der AS-Behandlung (0 Stunden) als Kontrolle und 24 Stunden später (Behandlung) erneut aus den zuvor erwähnten Honigbienenvölkern entnommen. Sie wurden in 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen gegeben und bei -80° C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Für die Kontroll- und Behandlungsgruppe (0 und 24 Stunden) wurden je vier Replikate eines Pools aus 40 Individuen, also insgesamt 320 VM gesammelt. Die Pools enthielten jeweils einen Mix der VM, die in den Jahren 2018 und 2019 beprobt wurden.

#### 3.10.2. Protein-Isolation

In Vorbereitung auf die Protein-Isolation aus den VM wurde der bei -20 °C gelagerte Lysepuffer (Harnstoff 9 M (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE), Chaps 2 % (Carl Roth, Karlsruhe, DE)) auf Eis aufgetaut und diesem anschließend 10 mg Dithiothreitol (DTT; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE), 5 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; AppliChem GmbH, Darmstadt, DE) und 1 µl Proteaseinhibitorcocktail (Merck Biosciences GmbH, Darmstadt, DE) pro 1 ml Puffer hinzugefügt.

Jeweils 40 gepoolte VM, gesammelt über beide Saisons, wurden in 500 µl des angesetzten und eisgekühlten Lysepuffers mit einem sogenannten Fastprep (FastPrep FP120, Qbiogene Inc, Illkirch, FR) und 1,4 mm Keramik-Beads in speziellen Homogenisations-Röhrchen (MP Biomedicals, Heidelberg, DE) homogenisiert. Dabei wurden vier Homogenisationszyklen für 15 s bei 6 M durchgeführt, zwischen denen eine Pause von jeweils 1 min auf Eis eingehalten wurde, um die Proben durch die entstehende Reibungs-Wärme nicht zu schädigen. Nach der Homogenisation wurden die Proben für 1 h auf Eis gestellt, wobei nach jeweils 20 min eine gründliche Durchmischung durch einen Vortexer (IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, DE) vorgenommen wurde. Anschließend wurden die Proben bei 16.200 x g für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° C gelagert.

#### 3.10.3. Quantifizierung der Proteinmenge mittels Pierce™ 660 nm Protein Assay

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde spektralphotometrisch im Mikrotiterplatten-Verfahren mit Hilfe des Pierce™ 660 nm Protein Assays (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben bestimmt.

Diese Methode beruht auf der Bindung eines Farbstoff-Metall-Komplexes mit Proteinen in einem sauren Milieu. Durch die Proteinbindung kommt es zu einer Deprotonierung des Farbstoffes mit nachfolgender Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs, das bei 660 nm gemessen werden kann. Die Proteinkonzentrationen der zu testenden Proben werden im Vergleich zu einer Protein-Standardreihe gemessen.

Zunächst wurde eine Standardreihe mit Hilfe des Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard (BSA) Sets (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) in einem Konzentrationsbereich von 50 µg/ ml bis 2,0 mg/ ml hergestellt. Um die maximal mit dem Assay kompatiblen Harnstoff-Konzentrationen (lt. Herstellerangaben 8M) in den Proben nicht zu überschreiten, wurden diese zunächst im Verhältnis von 1:3 mit sterilem Wasser verdünnt. Je 10 µl der verdünnten Proben wurden neben den BSA-Standards in einem Konzentrationsbereich von 50 µg/ ml bis 2,0 mg/ ml und einem Leerwert (0 µg/ ml BSA) in einer 96-Well Mikrotiterplatte (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE) mit 150 µl der Protein Assay Reagenz versetzt. Die Platte wurde auf einem Plattenschüttler (MHL 23, HLC by DITABIS, Pforzheim, DE) bei mittlerer Geschwindigkeit 1 min lang gemischt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

## Material und Methoden

Die Messungen wurden für jede Probe und die BSA-Standards in Duplikaten mit Hilfe des iMark™ Microplate Absorbance Readers (Bio-Rad Laboratories, Inc., Feldkirchen, DE) durchgeführt. Die anhand der Standardreihe ermittelte Proteinkonzentration der Proben wurde in µg/ ml angegeben.

### **3.10.4. Proteom-Analyse mittels LC-MS/ MS**

Die Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie (LC-MS/MS) verbindet die Trennleistung flüssigchromatographischer Verfahren mit der Protein-/Peptid-Identifikation durch MS/ MS.

Von jeder Probe wurden 50 µl Volumen einer Proteinkonzentration zwischen 94,0 und 188,4 µg/ µl an das Helmholtz Institut für Umweltforschung (UFZ) in Leipzig, Deutschland zur Durchführung der LC-MS/MS übersandt.

Für die eindimensionale (1D) Gelelektrophorese wurden von jeder Probe 38 µg Protein mit 5x *Lane Marker Reducing Sample Buffer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemischt und unter Invertieren bei 1400 rpm (*Revolutions Per Minute*, Umdrehungen pro Minute) bei 90 °C für 3 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Natriumdodecylsulfat-Gele (4 % *Stacking Gel* und 12% *Separating Gel*) aufgetragen und die Elektrophorese bei 10 mA durchgeführt. Daraufhin wurden die Proteine mit kolloidalem Coomassie-Brillantblau G-250 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) angefärbt, die Bahnen jeder Probe in einzelnen Gelstücken ausgeschnitten und ein tryptischer In-Gel-Verdau durchgeführt. Schließlich wurden die Proben gemäß Herstellerempfehlung unter Verwendung von SOLAµ SPE-Platten (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) entsalzt und gereinigt und in 15 µL 0,1%iger AS resuspendiert.

Für jeden LC-MS/MS-Lauf wurden 5 µL des Gesamtpeptid-Lysats in die nanoHPLC (UltiMate 3000 RSLCnano, Dionex, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) injiziert. Die Peptide wurden auf einer C18-Reverse-Phase-Fangsäule immobilisiert (µPAC™ *Trapping*-Säule, Pharmafluidics, Gent, Belgien), gefolgt von der Trennung auf einer analytischen C18-Reverse-Phasen-Säule (50 cm µPAC™ Säule, Pharmafluidics, Gent, Belgien). Zur Trennung wurde ein zweistufiger Gradient über 120 min bei einer Flussrate von 300 nL/min und einer Säulentemperatur von 35 °C angewendet. Die massenspektrometrische Analyse der eluierten Peptide wurde mit einem Q Exactive HF-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in Verbindung mit einer TriVersa NanoMate-Quelle (Advion, Inc., Ithaca, USA) im LC-Chip-Kopplungsmodus durchgeführt.

### **3.10.5. Bioinformatische Auswertung der Proteom-Analysen**

Die bioinformatische Auswertung erfolgte im Anschluss an die LC-MS/ MS durch Kooperationspartner im UFZ in Leipzig. Die funktionale Annotation beruht auf der Ähnlichkeitssuche von Protein-Reads gegen annotierte Sequenzen in derzeit verfügbaren Protein-Datenbanken. Die MS-Datenverarbeitung wurde mithilfe des Proteome Discoverers (v.2.2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit der Suchmaschine Sequest HT gegen alle gelisteten "Varroa destructor"-Proteine der NCBI-RefSeq-Datenbank durchgeführt (Stand 25.09.2019; auf keine Redundanz gefiltert, 20.089 Protein-Einträge). Die Falscherkennungsrate (*False Discovery Rate*, FDR) wurden mithilfe des Algorithmus Percolator bestimmt (KÄLL et al. 2007). Proteine galten als identifiziert, wenn mindestens ein spezifisches Peptid identifiziert wurde und die Gesamtprotein FDR bei  $\leq 0,05$  lag. Die Proteine wurden auf der Grundlage der Intensitäten der drei wichtigsten identifizierten Peptide quantifiziert. Die Daten wurden log<sub>2</sub>-transformiert und median normalisiert. Die statistische Analyse der log<sub>2</sub>-transformierten Daten wurde in R (v3.5.0) durchgeführt. Um signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle zu ermitteln, wurde der Student's t-Test für Analyten durchgeführt, die in mindestens drei von vier biologischen Replikaten über alle Behandlungen quantifiziert wurden. Die erhaltenen p-Werte wurden mittels Benjamini-Hochberg-Verfahren korrigiert.

## Material und Methoden

### **3.10.6. Selektion und weiterführende Analyse der Kandidatenproteine**

Für alle identifizierten Proteine zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe wurden die *Fold Changes* berechnet. Für die quantitative Analyse wurden nur differenzielle Kandidatenproteine mit einem *Fold Change* von mindestens 1,5 oder größer sowie einem p-Wert von 0,05 oder kleiner verwendet, die in mindestens drei von vier Proben über alle Behandlungen gefunden werden konnten.

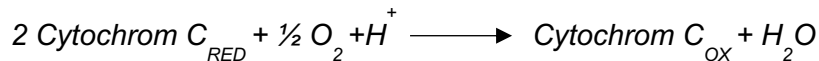
Eine Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*; PCA) wurde durchgeführt, um Unterschiede der allgemeinen Verteilungsmuster Protein-Expressionsprofile der verschiedenen Behandlungsgruppen zu beschreiben.

Aufgrund vielfältiger globaler Proteom-Daten werden zur Vereinfachung der Dateninterpretation Programme verwendet, die durch Abgleich mit bekannten Signalwegen übersichtliche Zusammenhänge darstellen können. Durch Zuordnung der experimentell erstellten Proteinlisten zu funktionellen Informationen aus öffentlichen Datenbanken, wie *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), können biologische Funktionen und Interaktions-Netzwerke erstellt und somit die biologische Relevanz der Kandidatenproteine für die jeweilige Fragestellung ermittelt werden. KEGG sammelt und kuratiert Daten über biologische Stoffwechselwege und Funktionen und stellt sie in manuell gezeichneten Teilnetzen übersichtlich dar (KANEHISA und GOTO 2000). In diesem Fall wurden die signifikant regulierten Proteinsequenzen mittels eggNOG v. 5.0 (Computational Biology Group - EMBL, Heidelberg, Deutschland) mit der oben genannten NCBI-RefSeq-Datenbank verglichen, um eine funktionelle Annotation der differentiellen Proteine und eine Auswertung ihrer Anreicherung in spezifischen Stoffwechselwegen zu ermöglichen.

Um aus den Ergebnissen funktionelle Rückschlüsse ziehen zu können, wurden sämtliche Daten der Proteom-Analyse mit bereits existierenden, aktuellen Informationen aus der Literatur ergänzt.

### 3.11. Teil 3 - Etablierung eines Tests zur funktionellen Untersuchung der mitochondrialen Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe

Die Cytochrom-C-Oxidase (COX) stellt den letzten Enzym-Komplex in der respiratorischen Elektronentransportkette (Atmungskette) in den Mitochondrien dar. Sie katalysiert den Transfer der Elektronen vom reduzierten Cytochrom C (Cyt C) auf molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) und die Generierung von Wasser ( $H_2O$ ) (BRUNORI und WILSON 1995). Dabei trägt sie zur Etablierung des mitochondrialen Membranpotentials (Protonengradienten) bei, das zu ATP-Synthese genutzt wird (HATEFI 1985).



AS soll durch Bindung der COX die mitochondriale Elektronentransportkette hemmen (NICHOLLS 1975, KEYHANI und KEYHANI 1980, LIESIVUORI et al. 1991) und damit zur Hemmung der (Zell-) Atmung mit Übersäuerung der Zellen führen (BOLLI et al. 1993). Eine Hemmung der COX wurde in der Honigbiene und Varroa-Milbe durch bisherige Studien nicht nachgewiesen und sollte deshalb in dieser Arbeit untersucht werden.

#### 3.11.1. Ameisensäure-Behandlung und Probennahme

Die Experimente wurden in der Saison 2018 am Institut für Veterinär-Biochemie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin durchgeführt. *A. mellifera* Honigbienenenvölker wurden mit AS behandelt, wie unter 3.2. beschrieben.

Je drei Pools aus jeweils fünf 1TA und FVB aus drei Kolonien sowie drei Pools aus je 100 VM wurden als Kontrolle unmittelbar vor Beginn der AS-Behandlung (0 h) sowie 24 Stunden später (24 h) aus dem Volk entnommen. Die 1TA wurden in den Gruppen in Sammelkäfige gegeben, während die FVB und VM in 2 µl Eppendorf-Gefäßen gesammelt wurden. Die Proben wurden direkt im Anschluss für die Mitochondrien-Isolierung vorbereitet.

#### 3.11.2. Mitochondrien-Isolierung

Um die Aktivität des mitochondrialen Enzyms zu messen, wurde ein Mitochondrien-Extrakt aus den oben genannten Proben hergestellt. Die 1TA wurden vor der weiteren Verarbeitung durch Kühlung bei  $-20^\circ C$  für drei Minuten immobilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) wurden in eisgekühlten Petrischalen mittels Schere und Pinzette die Thoraxe präpariert und zur Mitochondrien-Extraktion verwendet. Die FVB und VM wurden nach zweimaliger Waschung mit PBS *in toto* zur Extraktion genutzt.

Die Probengruppen (je fünf Thoraxe der 1TA, fünf FVB *in toto* bzw. 100 VM *in toto*) wurden in eisgekühlte, gläserne Homogenisatoren nach Potter-Elvehjem (Howe Scientific Inc.) überführt und mit 500 µl Extraktionspuffer (EP), bestehend aus 85,5 g Saccharose (Carl Roth, Karlsruhe, DE), 1,011 g  $MgCl_2$  (Merck Biosciences GmbH, Darmstadt, Deutschland) x 6  $H_2O$ , 1,585 g  $KH_2PO_4$  (Carl Roth, Karlsruhe, DE) und 37,2 mg EDTA (Thermo Scientific, Karlsruhe, DE) versetzt. Dieser besaß einen pH von 7,5, der mit KOH eingestellt wurde. Die Gewebe wurden mit 50 Hüben auf Eis homogenisiert und der Überstand in ein 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt. Vor Durchführung der Versuche wurde die Anzahl der Hübe, die für eine optimale Zelllyse bei gleichzeitig minimaler Schädigung der Mitochondrien geeignet ist, empirisch bestimmt. Daraufhin wurden die Proben bei 900 x g für 5 min bei  $4^\circ C$  in einer Zentrifuge (Thermo Scientific, Karlsruhe, DE) zentrifugiert und der resultierenden Überstandes in ein 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt, während das entstandene Pellet, das die Zelltrümmer enthielt, verworfen wurde. Der Überstand wurde erneut bei 9.600 x g für 10 min bei  $4^\circ C$  zentrifugiert, der Überstand verworfen, das resultierende Pellet in 200 µl EP resuspendiert und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. Der Gesamtproteingehalt der

## Material und Methoden

Proben wurde spektralphotometrisch mittels Pierce™ 660 nm Protein Assay wie unter 3.10.3 beschrieben durchgeführt.

### 3.11.3. Bestimmung der Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase

Dieser kolorimetrische Assay basiert auf der Beobachtung der Absorptionsverringerng bei 550 nm durch die Oxidation von reduziertem Cyt C, die von der COX katalysiert wird. Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte im iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., Feldkirchen, DE) in einer 96-Well-Platte (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE) bei 25° C in Doppelbestimmungen. Das UV/Vis-Spektrophotometer und der Einsatz von Multipetten/ Mehrkanalpipetten (Eppendorf, Hamburg, DE) ermöglichten das gleichzeitige Messen von bis zu 16 Proben.

Die Mitochondrienextrakte wurden auf einen Proteingehalt von 0,625 µg/ µl verdünnt und 8 µl dieser Verdünnung für den Assay eingesetzt. Vor der eigentlichen Messung erfolgte eine Kontrollmessung des Cyt C, um die anschließende, vollständige Reduktion des Cyt C durch Ascorbinsäure zu bestätigen und somit die nachfolgende Reaktion vorzubereiten.

Tabelle 13: Reaktionsansatz der COX-Aktivitäts-Messung.

Reagenz	Volumen der Einzelreaktion
Cytochrom C	200 µl
Ascorbinsäure	8 µl
Mitochondrienextrakt	X (5 µg)
Extraktionspuffer	X
Gesamtvolumen	216 µl

Zunächst wurden in den Vertiefungen der 96-Well-Platte (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE) 200 µl Cyt C-Lösung mit Hilfe einer Multipette vorgelegt und die Startextinktion abgelesen. Nach Zugabe von 8 µl Ascorbinsäure mittels einer Mehrkanalpipette wurde die Extinktion im Zwei-Minuten-Abstand abgelesen, bis nach acht Minuten ein konstanter Wert erreicht wurde. Nach Zugabe von 8 µl Mitochondrienextrakt durch eine Mehrkanalpipette wurden die Extinktionswerte 25 Mal alle 10 s gemessen. Nach Zugabe jedes Reagenz wurde der Reaktionsansatz durch eine im Spektralphotometer integrierte Funktion gemischt. Das Pipettier-Schema und die Systemeinstellungen des Spektralphotometers sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: COX-Aktivität - Pipettier-Schema und die Systemeinstellungen des Spektralphotometers.

Stufe	Reagenz	Volumen der Einzelreaktion	Systemeinstellungen
1	Cytochrom C	200 µl	Reads: 1 Intervall: 1 min Mix-Time: 10 s
2	Ascorbinsäure	8 µl	Reads: 1 Intervall: 1 min Mix-Time: 10 s
3	-	-	Reads: 4 Intervall: 2 min Mix-Time: -
4	Mitochondrienextrakt	8 µl	Reads: 1 Intervall: 1 min Mix-Time: 10 s

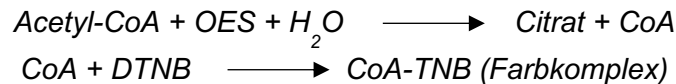


Reads: 25  
Intervall: 10 s  
Mix-Time: -

5

### 3.11.4. Bestimmung der Aktivität der Citrat-Synthase

Die Citrat-Synthase (CS) katalysiert den ersten Schritt des Citrat-Zyklus, in dem aus Acetyl-Coenzym A (A-CoA) und Oxalessigsäure (OES) Citrat und CoA mit einer Thiolgruppe (CoA-SH) entstehen. Der kolorimetrischer Assay basiert auf der Reaktion zwischen 5', 5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) und CoA-SH zur Bildung von 2-Nitro-5-Thiobenzoat (TNB), einem photometrisch bei 412 nm detektierbaren Farbkomplex.



Die Absorptions-Intensität ist proportional zur Aktivität der CS. Dieses Enzym ist ein Marker der mitochondrialen Matrix und wird zur Beurteilung der oxidativen Kapazität der Mitochondrien sowie der Integrität der Mitochondrien verwendet. Ihre Aktivität korreliert mit dem Mitochondriengehalt der Probe, sodass sie zur Normalisierung anderer Enzymaktivitäten in unterschiedlichen Proben genutzt werden kann.

Die Bestimmung der CS-Enzymaktivität erfolgte im iMark™ Microplate Absorbance Reader in einer 96-Well-Platte bei ca. 25° C in Doppelmessungen. Die Mitochondrienextrakte wurden auf einen Proteingehalt von 0,5 µg/ µl verdünnt und 4 µl dieser Verdünnung für den Assay eingesetzt.

*Tabelle 15: Reaktionsansatz der CS-Aktivitäts-Messung.*

Reagenz	Volumen der Einzelreaktion
Tris	200 µl
Triton X	4 µl
DTNB	2 µl
Mitochondrienextrakt	X (2 µg)
Extraktionspuffer	X
A-CoA	4 µl
OES	2 µl
Gesamtvolumen	216 µl

In den Vertiefungen der 96-Well-Platte wurde ein Mix aus 200 µl Tris, 4 µl Triton X, 2 µl DTNB und 4 µl Mitochondrienextrakt vorgelegt und die Startextinktion zweimal im Ein-Minuten-Abstand abgelesen. Nach Zugabe von 4 µl A-CoA mittels einer Multipette wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion daraufhin fünf Mal im Abstand von einer Minute abgelesen.

Nach Zugabe von 2 µl OES durch eine Mehrkanalpipette wurden die Extinktionswerte in einem 10 s Intervall durch insgesamt 25 Messungen abgelesen. Nach Zugabe jedes Reagenz wurde der Reaktionsansatz durch eine im Spektralphotometer integrierte Funktion gemischt. Das Pipettier-Schema und die Systemeinstellungen des Spektralphotometers sind Tabelle 16 zu entnehmen.

## Material und Methoden

Tabelle 16: Pipettier-Schema und die Systemeinstellungen des Spektralphotometers.

Stufe	Reagenz	Volumen der Einzelreaktion	Systemeinstellungen
1	Tris	200 µl	Reads: 2 Intervall: 1 min Mix-Time: 10 s
	Triton X	4 µl	
	DTNB	2 µl	
	Mitochondrienextrakt	4 µl	
2	A-CoA	4 µl	Reads: 1 Intervall: 5 min Mix-Time: 10 s
3	-	-	Reads: 4 Intervall: 1 min Mix-Time: -
4	OES	2 µl	Reads: 1 Intervall: 1 min Mix-Time: 10 s
5	-	-	Reads: 25 Intervall: 10 s Mix-Time: -

### 3.11.5. Berechnung der Enzymaktivitäten

Für die Berechnung der Enzymaktivitäten wurde der anfänglich lineare Bereich der Absorptionsänderung nach Zugabe des Mitochondrienextrakts (bei der COX-Aktivitätsmessung) bzw. der OES (bei der CS-Aktivitätsmessung) betrachtet und die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit zur Proteinmenge durch folgende Formel bestimmt:

$$U / \text{mg Protein} = \frac{\Delta A / \text{min}}{\epsilon \times L(\text{cm}) \times \text{mg Protein}}$$

U/mg Protein	Enzymeinheit pro mg eingesetztes Protein
$\Delta A / \text{min}$	Änderung der Absorption/ Zeit
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient [mM <sup>-1</sup> /cm] CS: $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ = Extinktionskoeffizient von TNB bei 412 nm COX: $\epsilon = 19,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ = Extinktionskoeffizient der reduzierten Cyt C-Lösung bei 550 nm
L (cm)	Weglänge für die Absorption Für ein Testvolumen von 100-200 µl in 96-Well-Platten ist die Weglänge ca. 0,5 cm

Die internationale Enzymeinheit (U) beschreibt den Umsatz von 1 µM Substrat pro Minute. Die COX-Aktivität wurde auf die Aktivität der CS normalisiert, die als Standardmessung des mitochondrialen Gehalts der Zellen gilt.

### 3.11.6. Statistische Auswertung der Enzymaktivitäten

In SPSS v25 (IBM Corp., Armonk, NY, United States) wurden die Werte der entsprechenden Enzymaktivitäten zunächst auf Normalverteilung getestet (Kolmogorov-Smirnova-Test). Die

## Material und Methoden

statistische Auswertung der Aktivitätsunterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe erfolgte im Falle einer Normalverteilung mit den t-Test bzw. mit dem Mann-Whitney U-Test, wenn eine Normalverteilung nicht gegeben war. Die Signifikanzwerte waren: \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Teil 1 - Transkriptom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe zur Aufklärung potentieller Differenzen in der Metabolisierung von Ameisensäure

#### 4.1.1. Quantität, Qualität und Integrität der RNA

Die Extraktion unter Verwendung des Quick-RNA™ Microprep Kits erbrachte gute durchschnittliche Gesamt-RNA-Ausbeuten von 2275,20 ng/ µl bei den 1TA, 2192,06 ng/ µl bei der FVB und 622,6 ng/µl in der Gruppe der VM. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 230 nm lag im Mittel bei 2,2; das der Absorptionen bei 260 und 280 nm bei 2,1 und damit in dem Bereich, der eine gute RNA-Qualität anzeigt (GALLAGHER und DESJARDINS 2006, BECKER et al. 2010). Die für die RNA-Seq Untersuchungen bestimmten Proben wurden auf ihre Integrität anschließend mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer und RNA 6000 Nano Chips untersucht, der durch den weitgehend automatisierten Prozessablauf reproduzierbare und genaue Daten liefert. Das elektrophoretische rRNA-Profil von Insekten unterscheidet sich deutlich von dem bei Säugetieren routinemäßig auftretenden Mustern (zwei starke Banden bei 18S sowie 28S im Verhältnis der Bandenintensität von 1:2), da die 28S rRNA der meisten Insekten aus zwei separaten Fragmenten besteht, die miteinander lose durch Wasserstoffbrücken verbunden sind. Durch die Vorbehandlung (Denaturierung) und die Elektrophorese werden die Wasserstoffbrücken gelöst und zwei ähnlich große Fragmente freigesetzt, die beide eng mit der 18S rRNA migrieren (WINNEBECK et al. 2010). Deshalb wurde zur Beurteilung der Ergebnisse nicht die üblicherweise betrachtete *RNA Integrity Number* (RIN) verwendet, sondern das Elektropherogramm optisch beurteilt. In den Elektropherogrammen konnten bei keinem der RNA-Extrakte Zeichen bedeutender Degradation beobachtet werden. Das Elektropherogramm einer typischen RNA-Probe ist in Abbildung 5 exemplarisch für jede der Probengruppen dargestellt.

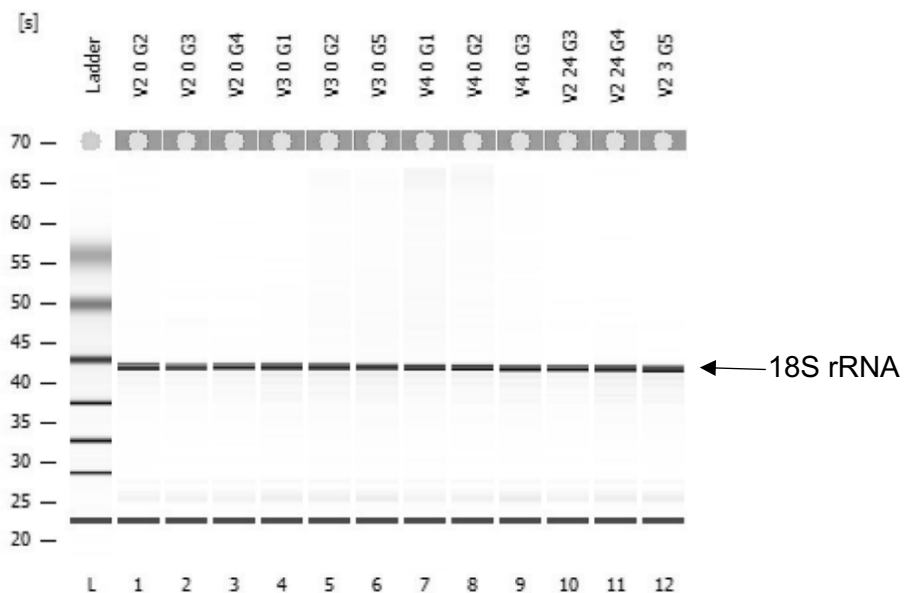


Abbildung 5: Gel-ähnliches Bild isolierter Total-RNA im Agilent 2100 Bioanalyzer. Die erste Spur (L) enthält 1 µl des RNA-Molekulargewichtsstandards aus dem RNA Nano 6000 Kit. In den Spuren 1-12 wurde 1 µl Total-RNA mit einer Konzentration von 500 ng/µl aufgetragen. In diesem exemplarischen Beispiel handelt es sich um Total-RNA der Honigbiene.

## Ergebnisse

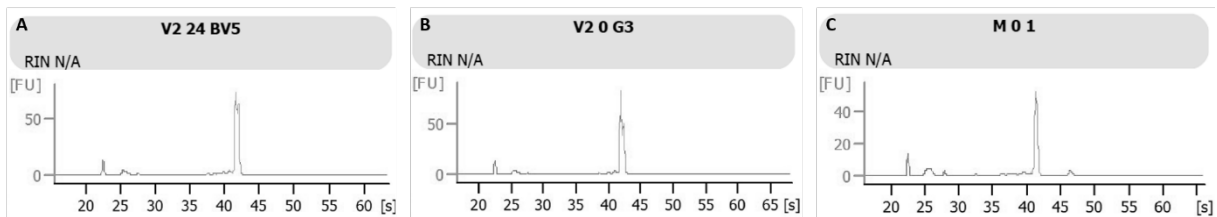


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung eines Elektropherogramms der RNA. Dargestellt sind (A) FVB, (B) 1TA und (C) VM.

Im beauftragten Sequenzierungszentrum wurden die zur RNA-Seq Analyse bestimmten Proben vor der *Library Preparation* erneut durch eine Agilent 4200 Tapestation (Agilent Technologies, Waldbronn, DE) und ein Qubit-Assay (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany) auf RNA-Integrität und -Konzentration getestet. Als Ergebnis der Analyse der RNA-Integrität wird ein RIN-Äquivalent (RINe) angegeben. Die Werte der RINe lagen zwischen 6,7 und 10; somit bestätigte sich, dass Menge und Qualität der RNA-Proben ausreichend gut waren, um die *Library Preparation* sowie die spätere RT-qPCR zur Validierung durchzuführen. Eine tabellarische Zusammenfassung der RNA-Qualitätsuntersuchungs-Ergebnisse findet sich im Anhang (Tabelle 25).

### 4.1.2. RNA-Seq - Differentiell exprimierte Gene nach Ameisensäure-Behandlung

Insgesamt wurden 54 RNA-Proben von 24 1TA, 24 FVB und 6 Pools von zehn VM auf einer Illumina Hi-Seq4000-Flusszelle sequenziert. Die RNA-Expressionsprofile von behandelten und unbehandelten Proben wurden nach 24 h AS-Exposition ausgewertet. Insgesamt konnten die Messwerte 14.380 Genen der Honigbiene und 31.345 Genen der Varroa-Milbe zugeordnet werden. Einige Proben der Honigbienen wiesen einen hohen Befall durch den Varroa-assoziierten *Deformed Wing Virus* (DWV) auf, was durch ein geringes *Alignment* der Sequenzen auf das Honigbienen-genom angezeigt und durch eine Überprüfung der Homologie in öffentlichen Datenbanken bestätigt wurde. Der Befall durch das DWV führte zu starken Auswirkungen auf die Genexpressionsprofile der Honigbienen, wie eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) der RNA-Seq-Daten zeigte (Abbildung 7). Um eine Verzerrung der Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses der AS auf die Genexpression zu vermeiden, wurden diese Proben von der weiteren vergleichenden Analyse ausgeschlossen (1TA = zehn Proben; FVB = drei Proben). Die Genexpressionsprofile der FVB aus einer Kolonie (Kolonie-Nr. 3) unterschieden sich signifikant von denen der anderen Kolonien, was auf den Einfluss unbekannter externer Effektoren hinweist (Abbildung 8). Individuen dieser Kolonie (Nr. 3) wurden von der weiteren Expressions-Analyse ausgeschlossen.

# Ergebnisse



Abbildung 7: PCA-Ergebnisse von 1TA.

Die Individuen waren hoch (rot) oder mäßig (blau) infiziert oder frei von einer Infektion mit *V. destructor*. Sie waren der FA-Behandlung 0 h (Kontrollgruppe, Kreis) oder 24 h (Behandlungsgruppe, Dreieck) lang ausgesetzt.



Abbildung 8: PCA-Ergebnisse von FVB.

## Ergebnisse

Die Individuen waren hoch (rot) oder mäßig (blau) infiziert oder frei von einer Infektion mit *V. destructor*. Sie waren der FA-Behandlung 0 h (Kontrollgruppe, Kreis) oder 24 h (Behandlungsgruppe, Dreieck) lang ausgesetzt.

### 4.1.2.1. Honigbiene

Die statistische Analyse ergab 35 differentiell exprimierte Gene (DEG) bei 1TA: 11 induziert, während 24 in AS-behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten Kontrollproben reprimiert wurden. Zu den induzierten Genen gehörten die entgiftungsabhängige CYP450-Monooxygenase *CYP6AR1* und die cytosolische 10-Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase (*FDH*), während reprimierte Gene unter anderem mit Chitin-Stoffwechselprozessen und -Bindung (*Mucin-3A-like*) sowie Entwicklungsprozessen (*CYP303A1*) assoziiert waren (Abbildung 9A). In FVB wurden bei der Behandlung 75 DEGs identifiziert. Von diesen zeigten 61 eine induzierte mittlere Expression nach der AS-Behandlung. Die hierarchische Cluster-Analyse ergab einen klaren Satz von 40 Genen, die durch die AS-Behandlung induziert wurden. Die übrigen Gene zeigten eine hohe Variation und weisen auf Unterschiede zwischen den Bienenvölkern hin. Zu den regulierten Genen gehörten hochregulierte Strukturbestandteile der Cuticula (*Cuticular-Protein 17*, *Cuticular-Protein 28*, *Cuticle-Protein 7*, *Chitotriosidase-1-like*, *Cell-Division-Protein ZipA*). Zu den Genen mit höherer Variation zwischen den Kolonien gehörte *CYP4AA1*, ein entgiftungsassoziiertes Enzym (Abbildung 9B). Eine Zusammenfassung aller Gene, die im paarweisen Vergleich differentiell exprimiert wurden, sind in den Tabellen 26 und 27 (Anhang) dargestellt.

### 4.1.2.2. Varroa-Milbe

Bei den VM führte die AS-Behandlung zu 183 Genveränderungen, 99 Gene wurden induziert und 84 reprimiert. Zu diesen zählten die induzierten Gene *FMO5-Dimethylanilin-Monooxygenase* und *CYP3A56* sowie die reprimierten Gene, die mit der Regulation der Zellatmung (*KAPC1-dependent protein kinase catalytic subunit 1*) und der oxidativen Phosphorylierung (*ATP synthase subunit mitochondrial*, *Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2*) in Zusammenhang stehen (Abbildung 9C). Eine Zusammenfassung aller Gene, die im paarweisen Vergleich differentiell exprimiert wurden, ist in der Tabelle 28 (Anhang) dargestellt.

Tabelle 17: Anzahl der durch AS auf- und abwärtsregulierten Gene.

Probengruppe	Induziert	Reprimiert	Gesamt
1TA	11	24	35
FVB	61	14	75
VM	99	84	183

# Ergebnisse

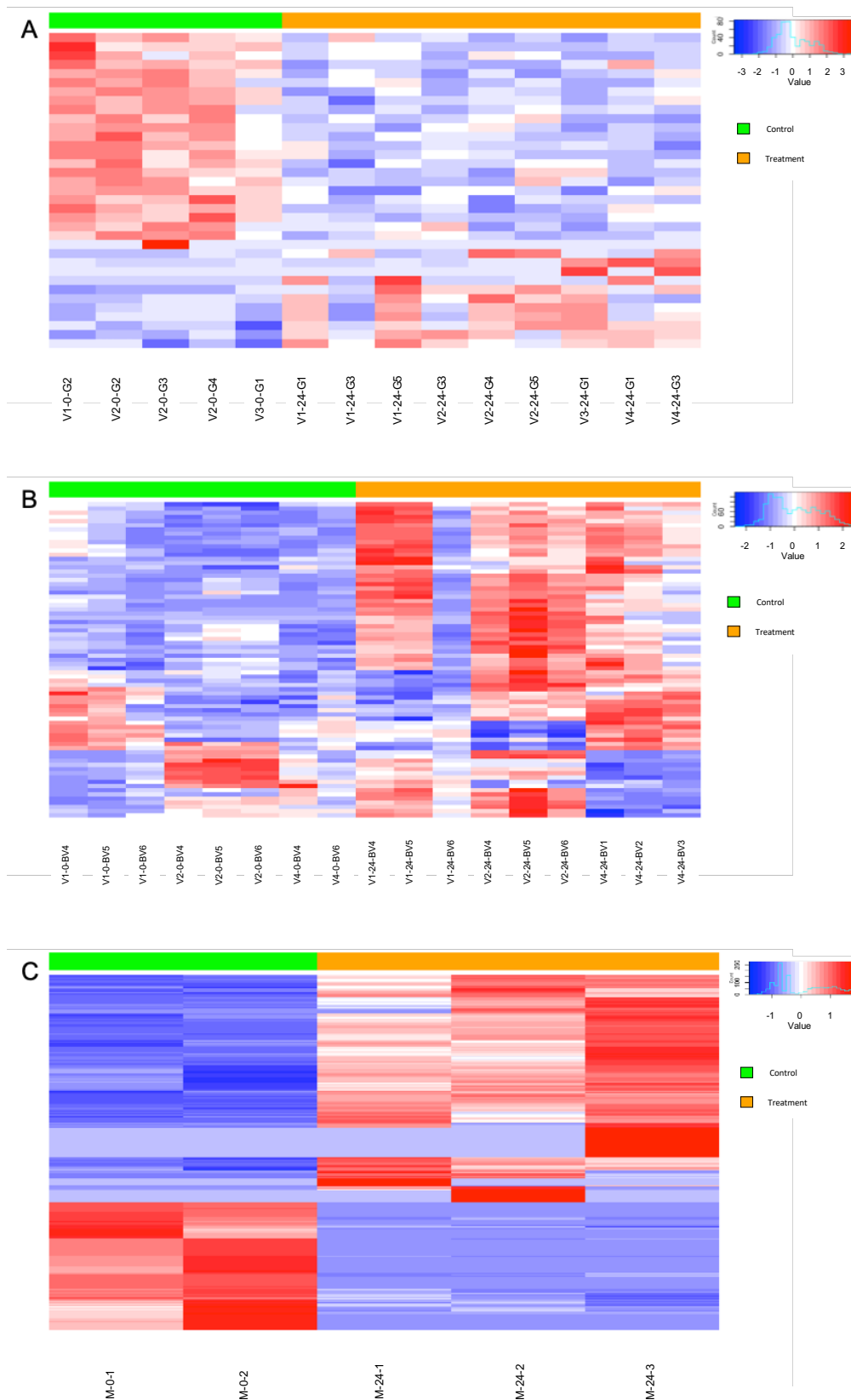


Abbildung 9: Heatmap-Darstellung der RNA-Seq-Daten. Berücksichtigt sind RNA-Seq-Daten von unterschiedlich exprimierten Genen zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe, mit einem Fold Change von  $\geq 2$  und einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  in (A) 1TA, (B) FVB und (C) VM. Rot steht für Aufregulierung und Blau für Abregulierung der jeweiligen mRNA.



## Ergebnisse

### **4.1.3. Anreicherungsanalyse von GO annotierten DEGs**

Um die biologische Bedeutung zu bestimmen, wurde eine Anreicherungsanalyse von GO annotierten, DEGs durchgeführt. Signifikant ( $p \leq 0,01$ ) angereicherte GO-Termini wurden in die Kategorien "biologische Prozesse" (BP), "molekulare Funktionen" (MF) und "zelluläre Komponenten" (CC) unterteilt.

#### **4.1.3.1. Honigbiene**

In der Gruppe der 1TA konnten 32 % der unterschiedlich exprimierten Gene nach AS-Exposition GO-Termini zugeordnet werden. Diese setzten sich zusammen aus sieben überrepräsentierten BP, acht MF und zwei CC. Zu den top-angereicherten GO-Termini gehörten „10-Formyltetrahydrofolate catabolic process“ und „Chitin metabolic process“ in BP, „Formyltetrahydrofolate dehydrogenase activity“ und „Hydroxymethyl-, formyl- and related transferase activity“ in MF sowie „Proteasome complex“ und „Anaphase-promoting complex“ in CC (Abbildung 10A). 34,21 % der unterschiedlich exprimierten Gene konnten in der Gruppe der FVB GO-Termini zugeordnet werden, wobei zwei BP, fünf MF und eine CC signifikant überrepräsentiert waren. Zu den top-angereicherten GO-Termini gehörten der „Chitin catabolic process“ und die „Motile cilium assembly“ in BP sowie der „Structural constituent of cuticle“ und „Chitin binding“ in MF und „Extracellular region“ in CC (Abbildung 10B).

#### **4.1.3.2. Varroa-Milbe**

Von unterschiedlich exprimierten Genen in der Gruppe der VM konnten 36,06 % GO-Termini zugeordnet werden. Die AS-Exposition führte hier zu einer signifikanten Überrepräsentation von 75 BP, 26 MF und 13 CC. Zu den am häufigsten angereicherten GO-Termini zählten „Isoleucine catabolic process“ und „Valine catabolic process“ in BP und „Branched-chain amino acid transaminase activity“ und „Kinase binding“ in MF sowie „Nuclear speck“ und „Cytosol“ in CC (Abbildung 10C).

## Ergebnisse

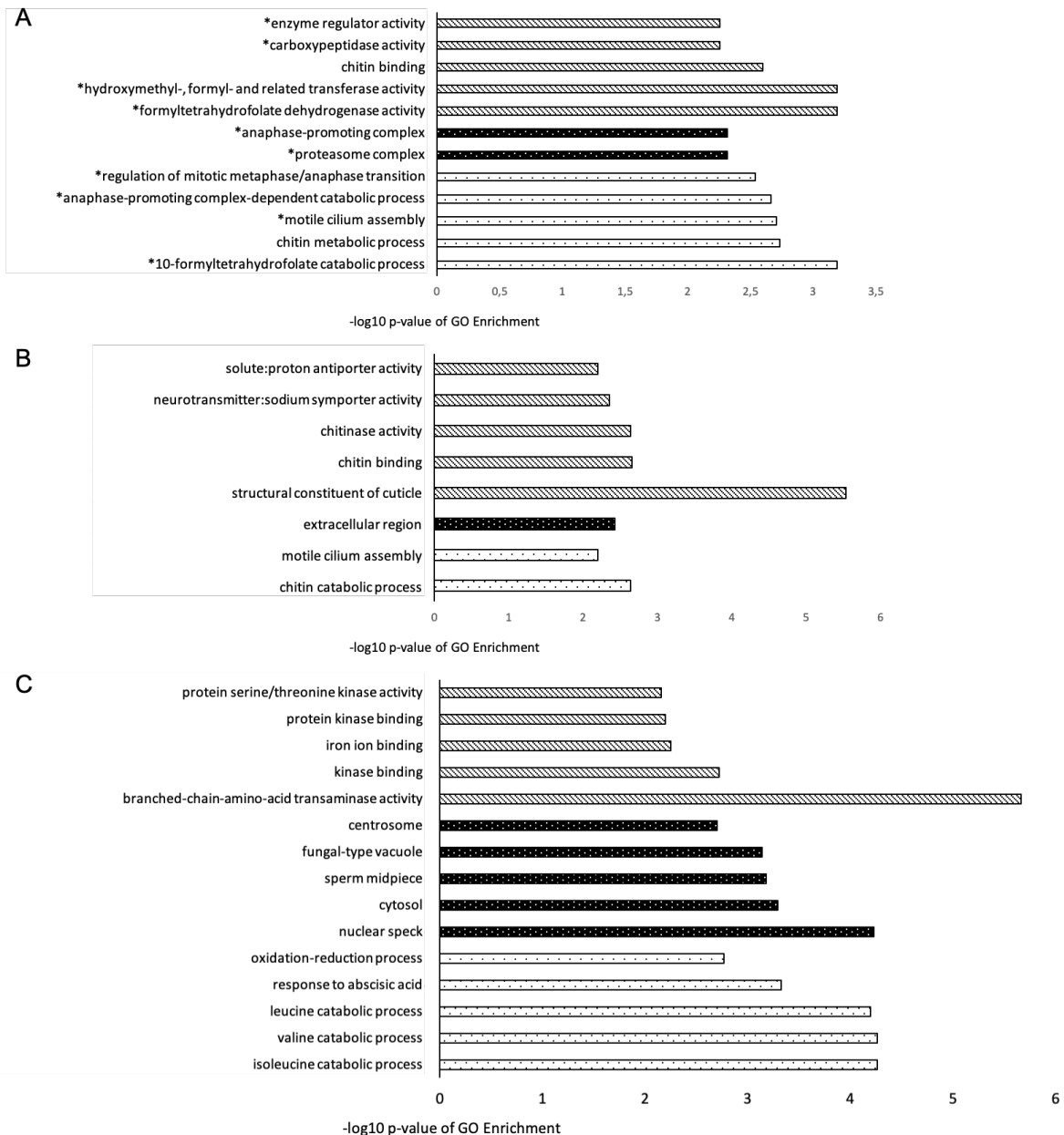


Abbildung 10: Signifikant überrepräsentierte GO-Termini von DEGs.

Die Top-Fünf bzw. alle (wenn insgesamt weniger als fünf Termini in der Kategorie akkumulierten) GO-Termini von *A. mellifera* (A) 1TA und (B) FVB und *V. destructor* (C) VM nach AS-Exposition. „Molekulare Funktionen“ sind gestreift dargestellt, „Zelluläre Komponenten“ schwarz gepunktet und „Biologische Prozesse“ weiß gepunktet. GO-Termini, die mit Sternen markiert sind, zeigen an, dass in dieser Kategorie nur ein Gen akkumuliert ist.

### 4.1.4. Primer für die Validierung durch RT-qPCR

Per Agarose-Gelelektrophorese konnte je PCR-Reaktionsprodukt eine DNA-Bande mit der Target-spezifischen Größe nachgewiesen werden (Tabelle 18), was auf das Vorhandensein eines spezifischen, bei der PCR entstandenen Produkts hinwies. Die Amplifikations-Effizienz der verwendeten Primerpaare lag jeweils zwischen 90 und 100% bei einer Schmelztemperatur von 60°C. Die Sequenzierung der PCR-Reaktionsprodukte konnte die Spezifität mit einer Sequenz Homologie (Query Cover) zwischen 92 und 100 % verifizieren.

## Ergebnisse

Tabelle 18: Verwendete Primer für die RT-qPCR Analyse.

Nachgewiesene PCR-Reaktionsprodukt-Längen in Honigbienen und Varroa-Milben in der Gelelektrophorese und errechnete Effizienzen der Reaktionen.

Gen-Symbol	Produktlänge (bp)	Effizienz (%)	Query Cover (%)
CYP6AR1	249	94,9	100
CYP4AV1	194	94,45	95
CYP4AA1	106	95,73	99
CYP4G11	130	96,74	95
CYP4AZ1	250	92,31	95
CYP303A1	250	96,61	95
FDH	211	97,19	99
Arp1	155	96,45	99
Enolase	125	95,48	100
GAPDH	202	95,01	100
RPL13a	191	90,29	99
RPS18	149	91,78	95
FMO5 (VM)	216	92,55	100
CYP3A56 (VM)	229	93,3	100
SAHD (VM)	106	93,51	94
NADH-DH (VM)	91	94,41	99
HSP90 (VM)	117	95,26	100
18S (VM)	100	95,34	98

### 4.1.5. Auswahl stabil exprimierter Referenzgene

Nach der geNORM-Analyse wurden für die Normalisierung der Daten in allen folgenden RT-qPCR-Berechnungen die drei am stabilsten exprimierten Referenzgene verwendet: *GAPDH*, *RPL13a* sowie *RPS18* bei den Honigbienen und *SAHD*, *NADH-DH* sowie *18S* bei den Milben (Abbildung 11).

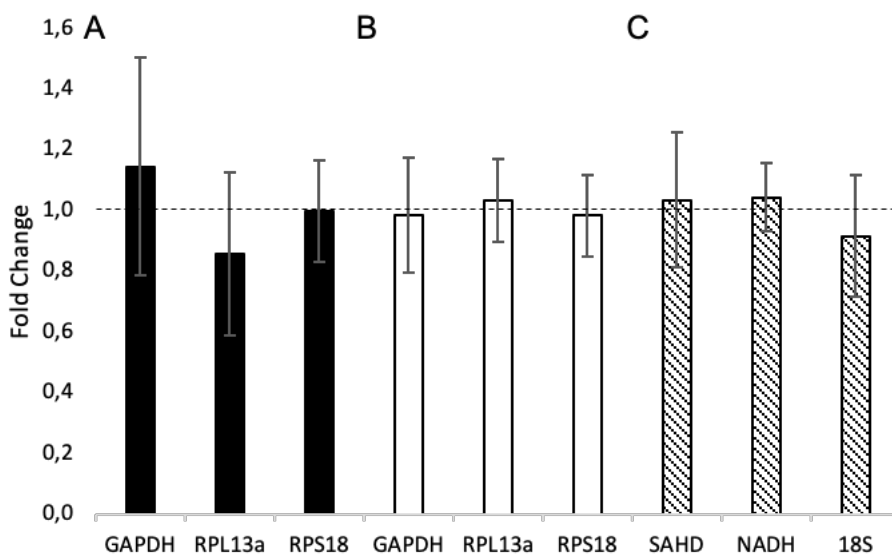


Abbildung 11: Validierung der Referenzgene für die RT-qPCR Analyse.

Gezeigt sind die Daten von (A) 1TA (schwarz), (B) FVB (weiß) und (C) VM (gestreift). Die Werte werden als Fold Change angegeben. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert der

## Ergebnisse

biologischen Replikate mit Fehlerbalken, die die Standardabweichung ( $\pm SD$ ) anzeigen ( $nA = 60$ ,  $nB = 65$ ,  $nC = 17$ ).

Tabelle 19: Durch geNORM ermittelte Expressionsstabilität (M-Wert) der Referenzgene.

Probengruppe	Referenzgen	M < 1,5
1TA	GAPDH	0,81
	RPL13a	0,63
	RPS18	0,53
FVB	GAPDH	0,43
	RPL13a	0,35
	RPS18	0,36
VM	SAHD	0,47
	NADH-DH	0,37
	18S	0,48

### 4.1.6. RT-qPCR

#### 4.1.6.1. Validierung der RNA-Seq Daten

Zur Validierung der RNA-Seq-Daten wurde eine RT-qPCR mit vier ausgewählten Genen für die Honigbiene und zwei ausgewählten Genen für die Varroa-Milbe durchgeführt, die in der RNA-Seq Analyse zuvor eine signifikant regulierte Expression zeigten (Abbildung 12). Eine signifikante Induktion ( $Fold\ Change \geq 2$ ,  $p \leq 0,05$ ) des entgiftungsassoziierten Gens *CYP6AR1* ( $FC = 3,2$ ,  $U = 238$ ,  $Z = -3,083$ ,  $p = 0,002$ ) wurde bei 1TA beobachtet. Für einige Kandidatengene beobachteten wir signifikante Tendenzen (weniger als  $Fold\ Change 2$ ) der Regulation. In der Gruppe der 1TA waren das induzierte *FDH* ( $FC = 1,4$ ,  $U = 313$ ,  $Z = -1,969$ ,  $p = 0,05$ ) und reprimierte *CYP303A1* ( $FC = 0,8$ ,  $U = 303$ ,  $Z = -2,117$ ,  $p = 0,03$ ) und in der Gruppe der FVB das herunterregulierte Gen *CYP4AA1* ( $FC = 0,7$ ,  $U = 351$ ,  $Z = -2,323$ ,  $p = 0,02$ ) betroffen.

Bei VM wurden die entgiftungsrelevanten Gene *FMO5* ( $FC = 2,25$ ,  $U = 3$ ,  $Z = -3,311$ ,  $p = 0,001$ ) und *CYP3A56* ( $FC = 2,38$ ,  $U = 3$ ,  $Z = -3,311$ ,  $p = 0,001$ ) signifikant induziert.

## Ergebnisse

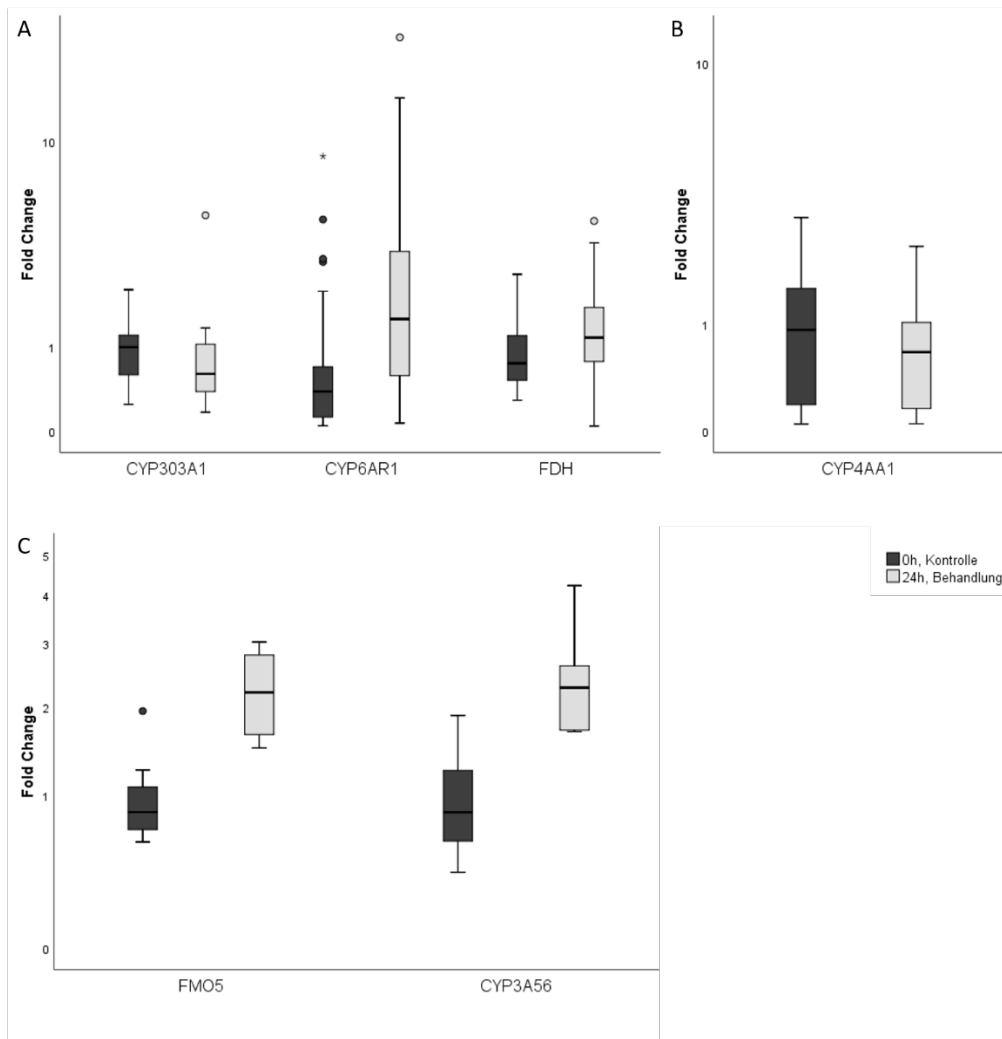


Abbildung 12: Expression der Kandidatengene in der RT-qPCR-Analyse.

Gezeigt sind die Daten von (A) 1TA, (B) FVB und (C) VM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; Mann-Whitney-U-Test. ( $n_A = 60$ ,  $n_B = 65$ ,  $n_C = 18$ ).

Die Ergebnisse der beiden Methoden korrelierten in den meisten Fällen, so lag die Anzahl der Gene mit gleichem Expressionsmuster (5) deutlich höher als die der Gene mit unterschiedlichem Expressionsmuster (1). Als Maß der Korrelation wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Dieser lag bei  $R^2 = 0,6495$  (Abbildung 13).

## Ergebnisse

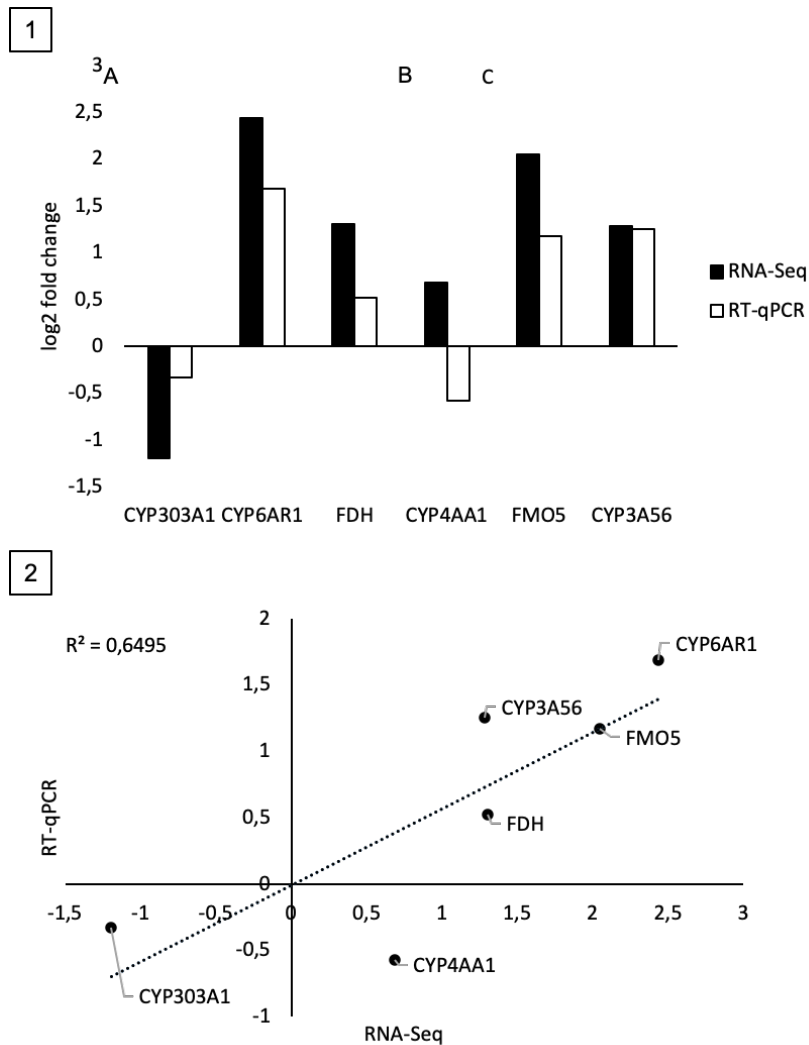


Abbildung 13: Vergleich von RNA-Seq- und RT-qPCR-Validierungsdaten.

(1) Log 2 Fold Change. Die quantitative Messung der Genexpression wurde mit RT-qPCR im Vergleich zu RNA-Seq für sechs Gene bestimmt: (A) 1TA, (B) FVB und (C) VM. (2) Korrelationsanalyse zwischen RNA-Seq und RT-qPCR log 2 Fold Change.

### 4.1.6.2. Detail-Untersuchung zur CYP4-Subfamilie von *A. mellifera*

Die Kandidatengen-Untersuchung bei der Honigbiene wurde aufgrund der interessanten Befunde durch drei zusätzlich ausgewählte Transkripte aus der CYP4-Unterfamilie (*CYP4G11*, *CYP4AV1*, *CYP4AZ1*) ergänzt. Während der phylogenetischen Entwicklung der Honigbienen hat eine massive Reduktion der Isoenzym-Anzahl in der CYP4-Unterfamilie stattgefunden (insgesamt besitzt die Honigbiene nur vier Enzyme dieser Unterfamilie im Vergleich zu 32 CYP4 in *Drosophila melanogaster*; Claudianos, Ranson et al. 2006); ihre spezielle Regulation und Funktionsaufklärung erscheinen deshalb besonders interessant. In der FVB wurde eine signifikante Reduktion der Expression von *CYP4G11* (FC = 0,5, U = 170, Z = -4,698, p < 0,001) nach 24 h Behandlung festgestellt. Für einige Kandidatengene dieser Unterfamilie konnten signifikante Tendenzen (weniger als *Fold Change* 2) der Regulation beobachtet werden: das reprimierte *CYP4AV1* (FC = 0,6, U = 212, Z = -3,07, p < 0,001) bei den 1TA und sowie die reprimierten Gene *CYP4AA1* (FC = 0,7, U = 351, Z = -2,323, p = 0,02) und *CYP4AZ1* (FC = 0,7, U = 376, Z = -1,994, p = 0,05) bei der FVB (Abbildung 14).

# Ergebnisse

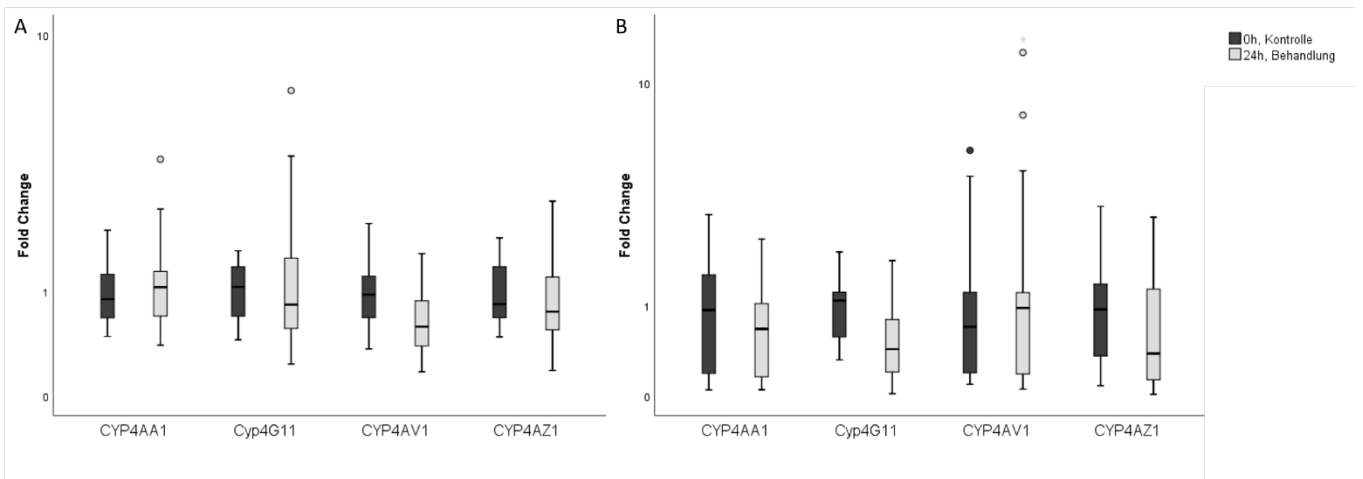


Abbildung 14: Expression der vier CYP4-Subfamilien-Mitglieder bei (A) 1TA und (B) FVB.  
\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; Mann-Whitney-U-Test. (nA= 60, nB = 65)

## Ergebnisse

### 4.1.6.3. Vergleich der Regulation der Genexpression zwischen 1TA und FVB

Um die Entgiftungsmechanismen und die unterschiedliche Empfindlichkeit der 1TA und FVB gegenüber der AS zu vergleichen, wurden alle sieben DEGs (*CYP6AR1*, *CYP4AV1*, *CYP4AA1*, *CYP4G11*, *CYP4AZ1*, *CYP303A1* und *FDH*) in der RT-qPCR Analyse in beiden Altersgruppen gleichermaßen untersucht (Abbildung 15 und 16).

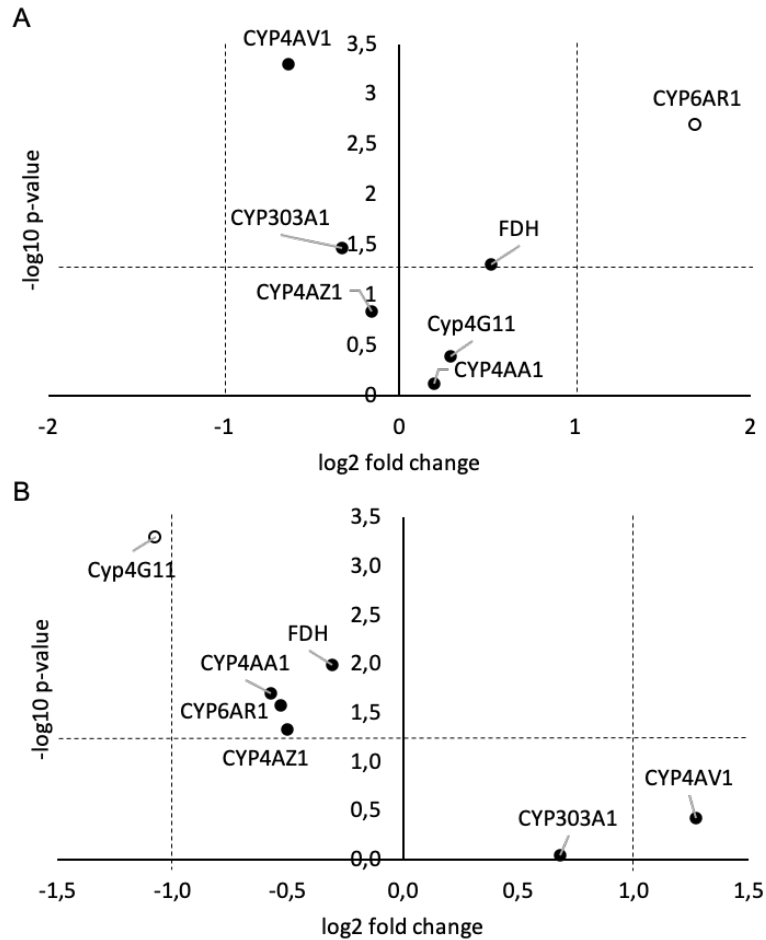


Abbildung 15: Vergleich der RT-qPCR-Daten in einer Volcano-Plot-Analyse.

Gezeigt sind die Daten sieben spezifischer Transkripte in (A) 1TA und (B) FVB. Die Expression von unterschiedlich exprimierten Genen zwischen der unbehandelten Kontrolle und der 24h AS behandelten Gruppe wird auf der x-Achse ( $\log_2$ -Skala) und die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) auf der y-Achse ( $-\log_{10}$ -Skala) aufgezeichnet. Die gestrichelten Linien zeigen einen Fold Change über oder unter einer zweifachen Auf- oder Abregulierung (Werte rechts und links der vertikalen Linien) und statistische Signifikanz (Werte oberhalb der horizontalen Linie).



## Ergebnisse

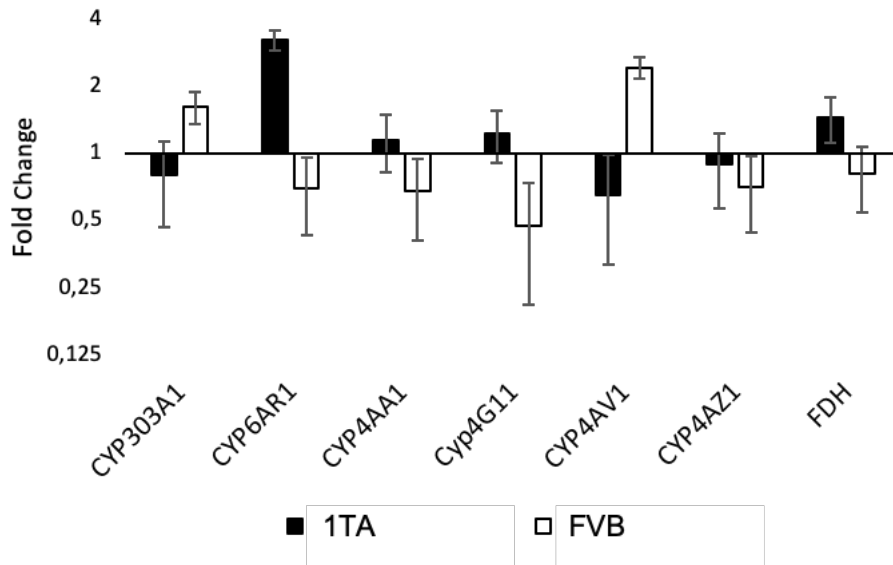


Abbildung 16: Vergleich der RT-qPCR-Daten zwischen 1TA und FVB. Die Balkenhöhen zeigen den Mittelwert der Fold Changes aller biologischen Replikate (1TA n = 60, FVB n = 65)  $\pm$  SEM der 24h AS behandelten Gruppe.

# Ergebnisse

## 4.2. Teil 2 - Proteom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Varroa-Milbe

### 4.2.1. Quantifizierung der Proteinmenge

Die Protein-Isolation der Milben-Proben ergab gute durchschnittliche Ausbeuten von 3,25 µg/µl in der Kontrollgruppe und 2,16 µg/µl in der Behandlungsgruppe.

Tabelle 20: Proteingehalte der in der Proteom-Analyse verwendeten Milben-Proben.

Probe	Zeitpunkt (h)	Konzentration (µg/µl)
M 0 1	0	3,77
M 0 2	0	3,07
M 0 3	0	2,83
M 0 4	0	3,33
M 24 1	24	2,36
M 24 2	24	2,23
M 24 3	24	1,88
M 24 4	24	2,17

### 4.2.2. Hauptkomponentenanalyse der gesamten Datenmatrix

Eine Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*; PCA) wurde durchgeführt, um Unterschiede der allgemeinen Verteilungsmuster der Protein-Expressionsprofile der insgesamt acht beprobten Milben-Pools aus den verschiedenen Proben Gruppen (M 0 1 – M 24 4) zu beschreiben (Abbildung 17). Die PCA beschreibt deutlich die Veränderungen der Proteinexpression zu den verschiedenen Zeitpunkten der AS-Exposition und trennt die Proben der Kontrolle und Behandlung in spezifische Gruppen. Durch die erste Hauptkomponente konnten 45 % und durch die zweite Hauptkomponente 19 % der Varianz zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe beschrieben werden.

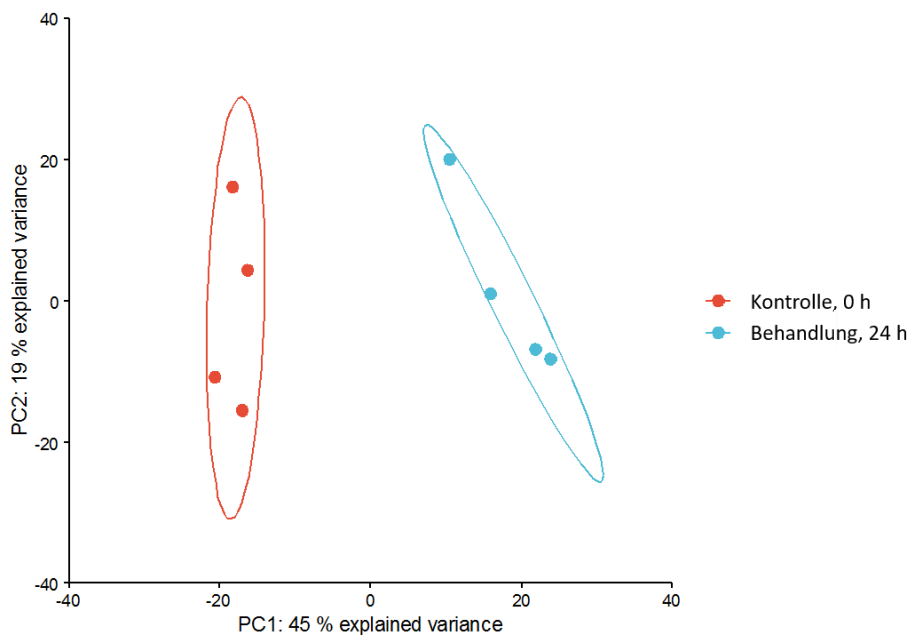


Abbildung 17: PCA zu Untersuchung der Varianz in der gesamten Datenmatrix.

## Ergebnisse

In Rot dargestellt sind die Replikate der Kontrollgruppe (M 0), in Blau die der Behandlungsgruppe (M 24).

### 4.2.3. Differentiell exprimierte Proteine nach Ameisensäure-Behandlung

Insgesamt konnten durch die LC-MS/MS-Analyse 2637 Milben-Proteine identifiziert und durchschnittlich 2272 Milben-Proteine relativ quantifiziert werden.

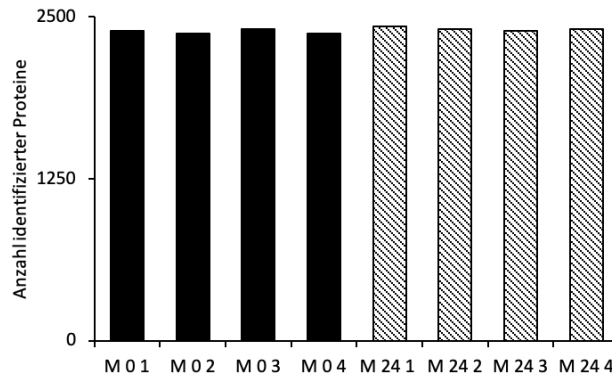


Abbildung 18: Anzahl identifizierter Proteine in den Proben der Kontroll- (schwarz) und Behandlungsgruppe (getreift).

Ein Vergleich der globalen Protein-Expression zwischen der behandelten Gruppe und unbehandelten Kontrollkohorte ergab 205 differentiell exprimierte Proteine (DEP), die den gewählten Kriterien von  $Fold\ Change \geq 1,5$  und  $p\text{-Wert} \leq 0,05$  entsprachen. Zu diesen zählten 91 hoch-abundante und 114 niedrig-abundante Proteine in der AS-behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

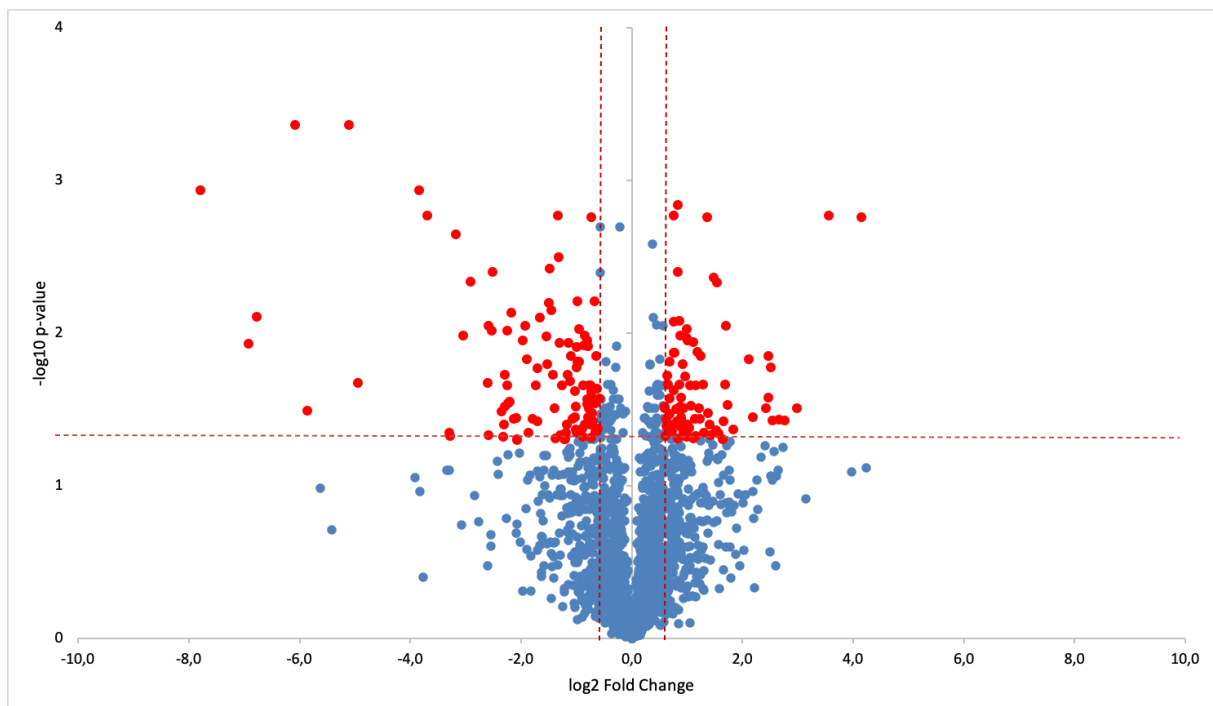


Abbildung 19: Proteinexpressions-Daten in einer Volcano-Plot-Analyse.

Die Expression von DEPs zwischen der unbehandelten Kontrolle und der 24h AS behandelten Gruppe wird auf der x-Achse ( $\log_2$ -Skala) und die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) auf der y-Achse ( $-\log_{10}$ -Skala) aufgezeichnet. Die gestrichelten Linien zeigen einen Fold Change über oder unter einer 1,5-fachen Auf- oder Abregulierung (Werte rechts und links der vertikalen Linien) und statistische Signifikanz (Werte oberhalb der horizontalen Linie).

## Ergebnisse

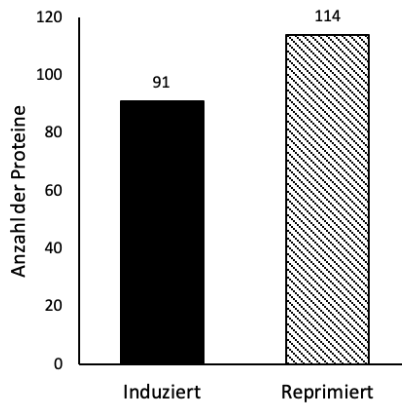


Abbildung 20: Anzahl der DEPs nach AS-Behandlung.

Zu den regulierten Proteinen gehörten unter anderem Proteine, die mit der Proteostase assoziiert sind. Dazu gehören mit dem Ribosom assoziierte Proteine, die in überwiegend reduzierter Konzentration vorlagen (*Large Subunit Ribosomal Protein LP39* (log<sub>2</sub> Fold Change: - 2,23; p: 0,03), *60S Acidic Ribosomal Protein P0-like* (log<sub>2</sub> Fold Change: -1,49; p: 0,01)), ebenso wie Translationsfaktoren (*Translation Initiation Factor 1A* (log<sub>2</sub> Fold Change: - 1,52; p: 0,02), *Translation Initiation Factor 4G* (log<sub>2</sub> Fold Change: -0,99; p: 0,05)). Dahingegen fand überwiegend eine Induktion der Proteinkonzentration von am Protein-Abbau beteiligter Faktoren statt (*20S Proteasome Subunit Alpha 4* (log<sub>2</sub> Fold Change: 0,87; p: 0,01), *E3 Ubiquitin-Protein Ligase RNF126-like* (log<sub>2</sub> Fold Change: 1,46; p: 0,05)). Darüber hinaus kam es in den überwiegenden Fällen zu einer signifikanten Konzentrations-Abnahme von mit der Zellatmung assoziierter Proteine (*Cytochrom C Oxidase Subunit 4* (log<sub>2</sub> Fold Change: -1,15; p: 0,02), *Succinyl-CoA Synthetase Beta Subunit* (log<sub>2</sub> Fold Change: -0,80; p: 0,03)). Zu den Proteinen mit induzierter Konzentration zählten unter anderem die Detoxifikations-assoziierten Enzyme *Homogentisat-1,2-Dioxygenase* (log<sub>2</sub> Fold Change: 0,87; p: 0,03), *Carbonyl Reduktase 1* (log<sub>2</sub> Fold Change: 0,77; p: 0,04) und *Flavin-abhängige Monooxygenase FMO GS-OX5-like* (log<sub>2</sub> Fold Change: 2,42; p: 0,03). Eine Auswahl der DEPs ist in Abbildung 21 gemäß ihrer Beteiligung in verschiedenen Kategorien dargestellt. Eine Übersicht aller differenziell exprimierter Milben-Proteine befindet sich im Anhang (Tabelle 29).

## Ergebnisse

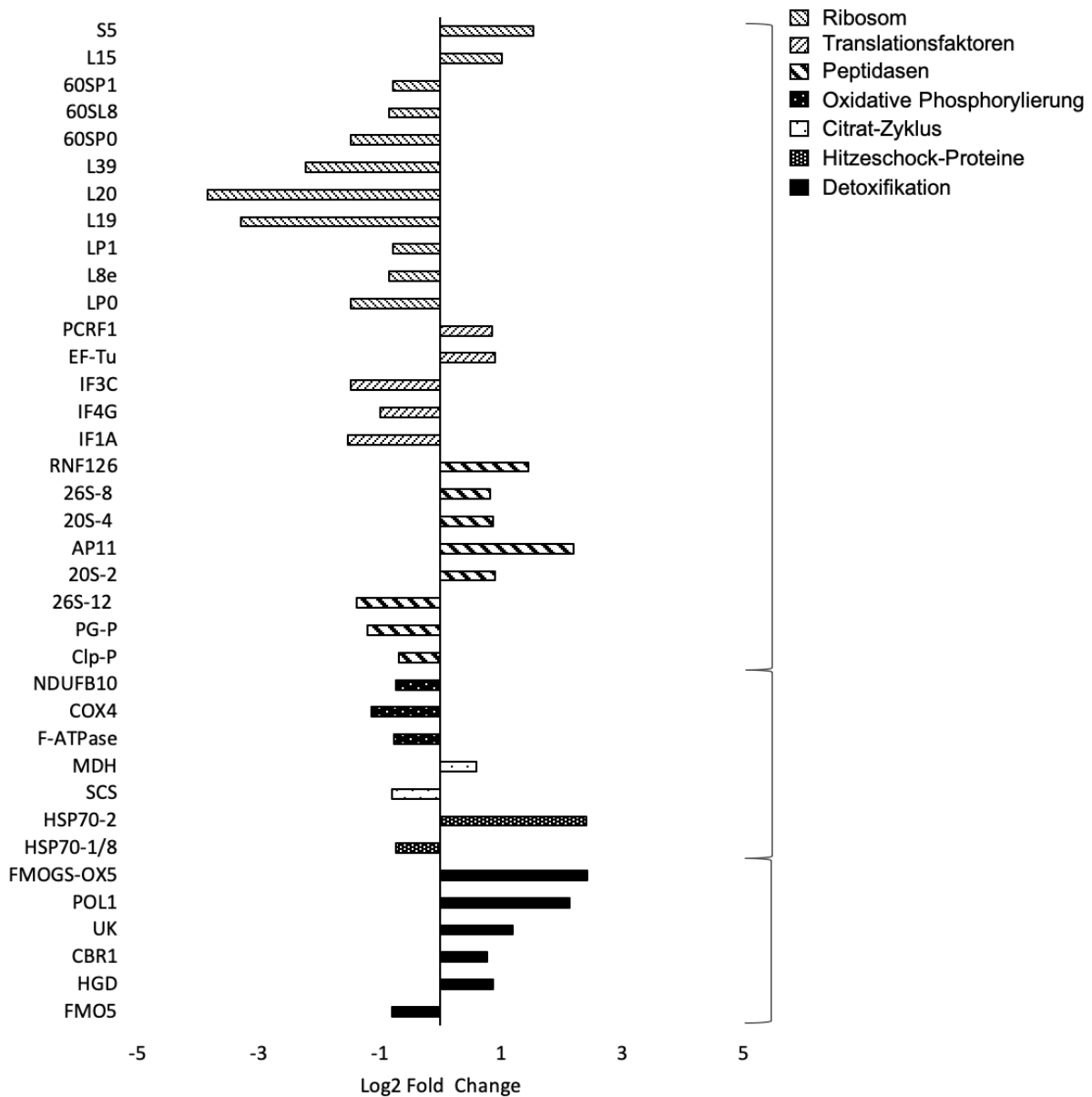


Abbildung 21: Profil der DEPs in Behandlungs- versus unbehandelter Kontroll-Gruppe. Gezeigt wird eine Auswahl der Kandidatenproteine, die mindestens 1,5-fach und signifikant ( $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ) reguliert wurden. Eine Gruppierung wurde nach Beteiligung an der Proteostase (gestreift), der Zellatmung bzw. oxidativem Stress (gepunktet) und Detoxifikation (schwarz) vorgenommen.

#### 4.2.4. KEGG-Pathway-Analyse

Die differentiell exprimierten Proteine wurden mit KEGG-Annotationen (in Bezug auf Arthropoden-Systeme) charakterisiert, um die potentiellen Stoffwechselsysteme zu untersuchen, an denen sie beteiligt sind. Insgesamt konnten 101 Kandidatenproteinen eine KEGG-Nummer zugeordnet werden, was einem Anteil von 49,72 % entspricht. Tabelle 21 zeigt die KEGG-Pfade bzw. -Untergruppen, in denen mindestens zwei Kandidatenproteine kumuliert sind. Insgesamt konnte eine Beteiligung der differentiell exprimierten Proteine an 58 Pfaden gezeigt werden. Eine Übersicht aller Kandidatenproteine, denen eine KEGG-Nummer zugeordnet werden konnte, befindet sich im Anhang (Tabelle 30).

## Ergebnisse

*Tabelle 21: KEGG-Pfade bzw. -Untergruppen.*

*Dargestellt sind die Kategorien, in denen mindestens zwei Kandidatenproteine kumuliert waren.*

KEGG Pfad/ Untergruppe	Acc. Nummer	Beschreibung
03010 Ribosom	XP_022647013.1	large subunit ribosomal protein LP1 (↓)
	XP_022646833.1	large subunit ribosomal protein L8e (↓)
	XP_022646731.1	large subunit ribosomal protein LP0 (↓)
	XP_022655300.1	large subunit ribosomal protein L19 (↓)
	XP_022657123.1	large subunit ribosomal protein L15 (↑)
	XP_022666258.1	large subunit ribosomal protein L20 (↓)
	XP_022668708.1	small subunit ribosomal protein S5 (↑)
04131 Membrantransport	XP_022667770.1	adaptin ear-binding coat-associated protein ½ (↓)
	XP_022668845.1	low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (↓)
	XP_022661869.1	endophilin-A (↓)
	XP_022653082.1	actin related protein 2/3 complex, subunit 2 (↓)
	XP_022655171.1	coatamer subunit epsilon (↓)
	XP_022656533.1	stonin-1/2 (↓)
	XP_022656732.1	F-BAR domain only protein (↓)
03040 Splicosom	XP_022667854.1	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (↑)
	XP_022672923.1	splicing factor U2AF 65 kDa subunit (↑)
	XP_022647212.1	calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (↓)
	XP_022660835.1	peptidyl-prolyl isomerase H (cyclophilin H) (↑)
	XP_022671297.1	splicing factor 3A subunit 2 (↓)
03012 Translationsfaktoren	XP_022656771.1	elongation factor Tu (↓)
	XP_022657429.1	translation initiation factor 4G (↓)
	XP_022670350.1	peptide chain release factor subunit 1 (↑)
	XP_022652849.1	translation initiation factor 1A (↓)
	XP_022668871.1	translation initiation factor 3 subunit C (↓)
01009 Proteinphosphatase und assoziierte Proteine	XP_022658062.1	low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase (↓)
	XP_022643827.1	heat shock 70kDa protein 1/8 (↓)
	XP_022662509.1	immunoglobulin-binding protein 1 (↑)
	XP_022668453.1	meiosis arrest female protein 1 (↑)
	XP_022671280.1	protein phosphatase 1H (↓)
01002 Peptidasen	XP_022672122.1	20S proteasome subunit alpha 4 (↑)
	XP_022646811.1	20S proteasome subunit alpha 2 (↑)
	XP_022650620.1	ATP-dependent Clp protease, protease ubunit (↓)
	XP_022664109.1	pyroglutamyl-peptidase (↓)
	XP_022666956.1	abhydrolase domain-containing protein 11 (↑)
	XP_022649728.1	homogentisate 1,2-dioxygenase (↑)
	XP_022662805.1	carbonyl reductase 1 (↑)

## Ergebnisse

09111 Bioabbau und Stoffwechsel der Xenobiotika	XP_022653664.1	dimethylaniline monooxygenase (N-oxide forming) (↓)
	XP_022668567.1	uridine kinase (↑)
01001 Proteinkinasen	XP_022650038.1	nuclear receptor-binding protein (↑)
	XP_022659550.1	mitogen-activated protein kinase kinase 1 (↑)
	XP_022665584.1	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3 (↑)
00230 Purin Metabolismus	XP_022646767.1	5'-nucleotidase (↑)
	XP_022653817.1	adenylate kinase (↓)
	XP_022671354.1	adenosine kinase (↓)
00190 Oxidative Phosphorylierung	XP_022670962.1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex subunit 10 (↓)
	XP_022653165.1	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit g (↓)
	XP_022655493.1	Cytochrom c oxidase subunit 4 (↓)
00562 Inositolphosphat Metabolismus	XP_022652546.1	multiple inositol-polyphosphate phosphatase / 2,3-bisphosphoglycerate 3-phosphatase (↓)
	XP_022665344.1	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 (↑)
00536 Glykosaminoglykan-bindende Proteine	XP_022666911.1	complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial (↓)
	XP_022653730.1	cell division cycle protein 37 (↓)
00270 Cystein- und Methionin-Stoffwechsel	XP_022649886.1	malate dehydrogenase (↑)
	XP_022663326.1	glutathione synthase (↓)
00020 Citrat-Zyklus	XP_022650517.1	succinyl-CoA synthetase beta subunit (↓)
	XP_022649886.1	malate dehydrogenase (↓)
02000 Transporter	XP_022643827.1	heat shock 70kDa protein 1/8 (↓)
	XP_022653517.1	solute carrier family 25 (mitochondrial dicarboxylate transporter), member 10 (↓)
04147 Exosom	XP_022656771.1	elongation factor Tu (↓)
	XP_022654170.1	Dimethylargininase (↓)

### 4.2.5. Korrelation von Transkriptom und Proteom

Um die Beziehung zwischen den Veränderungen auf Transkriptom- und Proteom-Ebene als Folge der AS-Behandlung besser zu verstehen, wurden die Daten beider Methoden verglichen und analysiert. Die Anzahl der DEGs und DEPs der Milbe war vergleichbar (183 DEGs und 205 DEPs), allerdings konnten nur wenige Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen beobachtet werden. Insgesamt stimmten nur 27 aberrant exprimierte Gene mit den Proteindaten überein. Die Anzahl der korrelierten DEGs und DEPs mit unterschiedlichem Expressionsmuster lag dabei höher als die der DEGs und DEPs mit gleichem Expressionsmuster. Um das Ausmaß, in dem die Protein- und mRNA-Daten übereinstimmen zu bestimmen, wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Der Korrelationskoeffizient zwischen dem Expressionsniveau der korrelierten DEGs und DEPs lag bei  $R^2 = 0,308$ , wobei der Korrelationskoeffizient von DEGs und DEPs mit ähnlichem Expressionstrend höher war ( $R^2 = 0,519$ ) als der von DEGs und DEPs mit entgegengesetztem Expressionsmuster ( $R^2 = -0,858$ ). Dieses Ergebnis zeigte eine geringe Korrelation zwischen Transkriptom- und Proteom-Analyse.

## Ergebnisse

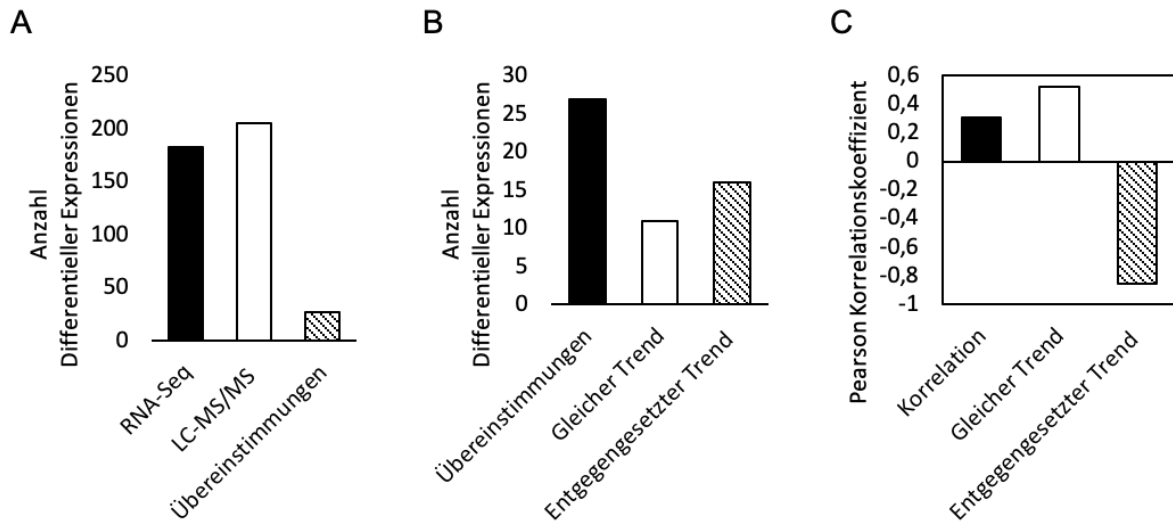


Abbildung 22: Korrelation von Transkriptom und Proteom bei der Varroa-Milbe. A) Anzahl der DEGs (rot) und DEPs (blau) und ihrer Übereinstimmungen in beiden Methoden (grün). B) Anzahl übereinstimmender DEGs und DEPs mit gleichem bzw. entgegengesetztem Trend. C) Korrelationskoeffizienten zwischen den Expressionsniveaus der korrelierten DEGs und DEPs



## Ergebnisse

### 4.3. Teil 3 - Etablierung eines Tests zur funktionellen Untersuchungen der mitochondrialen Cytochrom C Oxidase-Aktivität bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe

#### 4.3.1. Ameisensäure-Behandlung und Probennahme

Die Durchführung der AS-Behandlung für diesen Versuch erfolgte relativ spät im Jahr (Anfang September 2018), was die Probennahme erschwerte, da teilweise nicht ausreichend 1TA bzw. FVB im Volk vorhanden waren. Nach 24h AS-Exposition konnten somit nicht die volle Anzahl an Individuen aus allen Völkern entnommen werden, sodass die Stichprobenanzahl in diesem Experimentalansatz teilweise variiert (vgl. Abbildung 23).

#### 4.3.2. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Es konnten erfolgreich beide enzymatische Testverfahren für COX und CS für Honigbiene und Varroa-Milbe etabliert und adaptiert werden. Die Bestimmung der COX- und CS-Enzymaktivitäten erfolgte in den unter 3.11.1. beschriebenen Individuen.

Die COX-Aktivität pro mg Protein war in allen untersuchten Probengruppen nach AS-Exposition im Vergleich zu 0 h-Kontrolle nicht signifikant reduziert (1TA:  $p = 0,223$ ; FVB:  $p = 0,51$ ; VM:  $p = 0,157$ ; Abbildung 23A), wobei die Reduktion bei der VM am stärksten war (um 30 %), gefolgt von 1TA (18,75 %) und FVB (9,09 %).

Die CS-Aktivität war im Vergleich zur 0 h-Kontrollgruppe bei 1TA und VM ebenfalls nicht signifikant reduziert (1TA:  $p = 0,347$ ; VM:  $p = 0,759$ ), während die Aktivitätsreduktion bei FVB sehr deutlich (98 %) und signifikant war ( $p = 0,004$ ; Abbildung 23B).

Die COX-Aktivität pro CS-Aktivität war dementsprechend bei allen Probengruppen in der 24 h AS-behandelten Gruppe im Vergleich zur 0 h-Kontrolle erhöht, allerdings nicht signifikant (1TA:  $p = 0,933$ ; FVB:  $p = 0,776$ ; VM:  $p = 0,7$ ) und teilweise durch hohe Standardabweichungen gekennzeichnet (Abbildung 23C). Alle Ergebnisse der Enzymaktivitäts-Untersuchungen sind in den Tabellen 22 bis 24 als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

Tabelle 22: COX-Aktivität pro mg Protein.

	0h	24h	Änderung (%)	p
1TA	1,63 ± 0,33	1,29 ± 0,50	18,75	0,22
FVB	1,12 ± 0,35	1,00 ± 0,24	9,09	0,51
VM	1,02 ± 0,17	0,74 ± 0,16	30	0,16

Tabelle 23: CS-Aktivität pro mg Protein.

	0h	24h	Änderung (%)	p
1TA	1,36 ± 0,86	0,77 ± 0,93	42,86	0,35
FVB	0,46 ± 0,29	0,01 ± 0,04	98	0,004
VM	0,09 ± 0,04	0,06 ± 0,13	33,33	0,76

Tabelle 24: COX-Aktivität pro CS-Aktivität.

	0h	24h	Änderung (%)	p
1TA	1,20 ± 1,10	1,66 ± 35,21	141,67	0,93
FVB	2,46 ± 31,70	141,94 ± 30,84	5.676	0,78
VM	11,55 ± 12,75	13,14 ± 45,78	113,91	0,70

# Ergebnisse

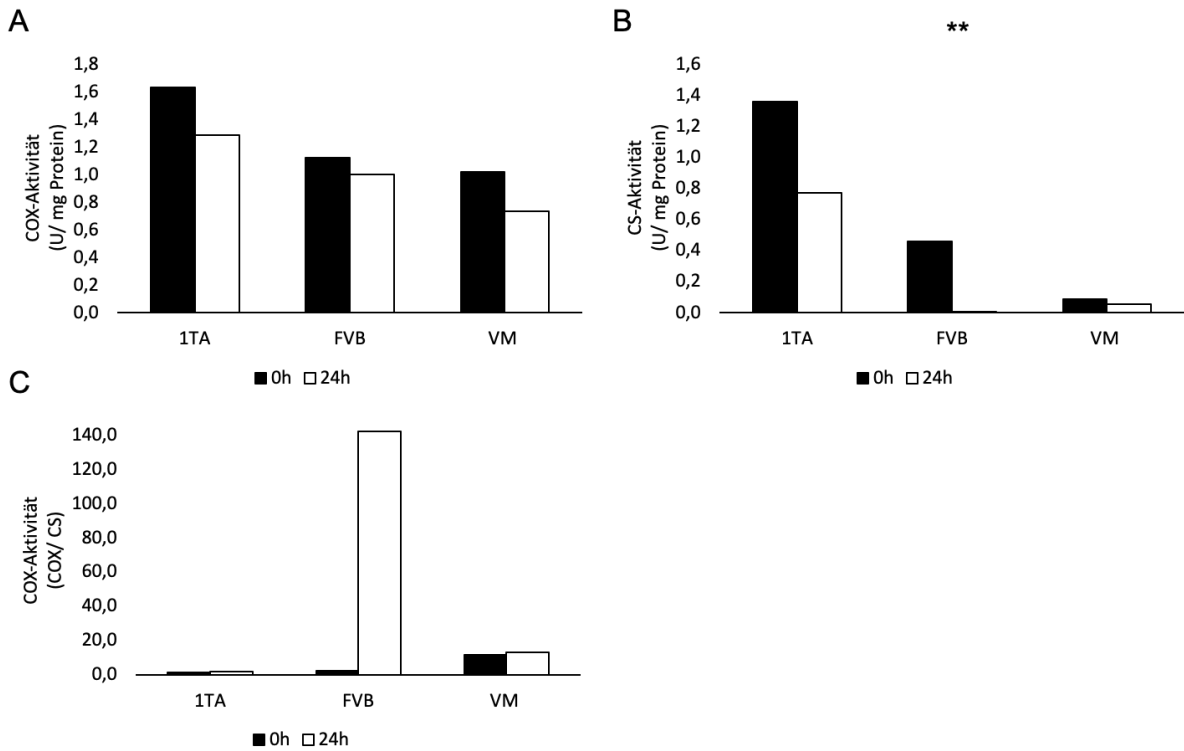


Abbildung 23: Enzymaktivitäten vor und nach AS-Exposition von 1TA, FVB und VM. (A) COX-Aktivität pro mg Protein, (B) CS-Aktivität pro mg Protein, (C) COX-Aktivität pro CS-Aktivität. Die 0 h-Kontrollgruppe ist in Rot, die 24 h-Behandlungsgruppe in Blau dargestellt. (1TA n = 12, FVB n = 15, VM n = 6).

## 5. Diskussion

### 5.1. Teil 1 - Transkriptom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe zur Aufklärung potentieller Differenzen in der Metabolisierung von Ameisensäure

Bisher wurden die molekularen Effekte von AS und ihre Wirkung auf die Genexpression in Honigbienen nur in wenigen Studien untersucht, z.B. durch gezielte Kandidaten-Genexpressionsanalysen auf mRNA-Niveau (BONCRISTIANI et al. 2012, GASHOUT et al. 2018). Nach unserem Kenntnisstand ist die hier vorgestellte ganzheitliche RNA-Sequenzierungsstudie die erste umfassende transkriptionelle Analyse, die die Auswirkungen von AS auf Varroa-Milben und Honigbienen im Vergleich untersucht.

#### 5.1.1. Honigbiene

Vergleichende Untersuchungen zwischen den verschiedenen Altersgruppen unter Verwendung derselben Kandidatengene (Abbildung 15 und 16) wurden durchgeführt, um die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber AS zu untersuchen, die in der Literatur bereits beschrieben wurde (FRIES 1991, BOLLI et al. 1993, OSTERMANN und CURRIE 2004). Teilweise konnte eine sehr gegensätzliche Regulation als Reaktion auf die AS-Behandlung beobachtet werden. In den 1TA wurde nach AS-Exposition in den meisten Fällen eine Induktion der Detoxifikations-assoziierten Gene beobachtet, während es in der FVB in der Regel zu einer Repression dieser Gene kam (mit Ausnahme der Induktion von *CYP4AV1* und *CYP303A1*). Eine Hemmung der Expression Detoxifikations-assoziiierter Enzyme durch AS-Exposition kann zur Verstärkung der schädlichen Auswirkungen anderer chemischer Rückstände und Umweltgifte führen. Verbunden mit der generell geringeren Expression der CYP-Enzyme in jüngeren Lebensstadien der Biene (SHI et al. 2013, ZHANG et al. 2018), kann dies die erhöhte Empfindlichkeit der Bienenbrut gegenüber der AS-Exposition erklären. Unsere Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die 1TA nach AS-Exposition weniger empfindlich reagieren als die FVB, weil sie die Fähigkeit der Induktion potenziell AS-spezifischer Entgiftungsenzyme (*CYP6AR1*, *CYP4AA1*, *CYP4G11*, *FDH*) besitzen und die Entgiftungskapazität dadurch prinzipieller stärker ausgeprägt sein könnte.

Die Ergebnisse der RNA-Seq-Untersuchungen zeigen Veränderungen in der Genexpression für Gene verschiedener P450-Unterfamilien, die durch die AS-Behandlung induziert werden. Die RT-qPCR-Daten bestätigen eine signifikante Induktion der Expression von *CYP6AR1* (umbenannt in *CYP6AS19*, <https://drnelson.uthsc.edu/biblioB.html>) bei 1TA. Verschiedene Mitglieder dieser Insekten-spezifischen CYP6-Familie werden mit der Insektizid-Verstoffwechslung und der Resistenzentwicklung bei einer Reihe von Diptera- und Lepidopteranarten in Verbindung gebracht (BERENBAUM 2002, FEYEREISEN 2012). Es ist bekannt, dass Mitglieder der CYP6AS-Unterfamilie (*CYP6AS1*, *CYP6AS3*, *CYP6AS4*, *CYP6AS10*) durch Bienenprodukte wie Honig, Pollen und Propolis und zum Teil durch Akarizide, wie Coumaphos und Fluvalinat, induziert werden können (MAO et al. 2009, JOHNSON et al. 2012, SCHMEHL et al. 2014). Die Genexpression weiterer Mitglieder der CYP6AS-Familie wird durch das Varroazid Thymol oder das Pestizid Imidacloprid verstärkt (BONCRISTIANI et al. 2012, DERECKA et al. 2013). CAMERON et al. (2013) zeigten in ihrer Studie zur Untersuchung der unterschiedlichen Genexpression in der Entwicklung zwischen Königinnen- und Arbeiterinnenlarve, dass in Arbeiterinnen im Larvenstadium 4 die Expression einiger P450-Gene hochreguliert wurde. Zu ihnen zählte unter anderem *CYP6AR1*. Eine Veränderung der Genexpression von *CYP6AR1* im Zusammenhang mit AS-Exposition geht aus der bisher veröffentlichten Literatur nicht hervor. Unsere Ergebnisse liefern daher erstmals neue Erkenntnisse für eine mögliche Rolle einer *CYP6AR1*-Enzymaktivität bei der AS-Entgiftung von Honigbienen. In weiteren Studien muss zukünftig überprüft werden, ob AS tatsächlich ein direktes oder indirektes Substrat für *CYP6AR1* ist. Unsere Ergebnisse zeigten darüber hinaus eine Veränderung der CYP4-Genexpression bei 1TA und FVB. Honigbienen besitzen eine stark reduzierte Ausstattung dieser Enzyme; so sind bisher nur vier Mitglieder der CYP4-Familie bekannt (CLAUDIANOS et al. 2006, BERENBAUM und JOHNSON 2015), was als Verlust der Reaktionsfähigkeit auf Umwelteinflüsse gedeutet wird (CLAUDIANOS et

## Diskussion

al. 2006). Bisher sind die Funktionen der einzelnen CYP4-Gene in der Honigbiene nicht umfangreich charakterisiert: Einige CYP4-Gene scheinen eine wichtige Rolle in der Metabolisierung von Xenobiotika zu spielen (FEYEREISEN 2012), andere sind mit dem Hygieneverhalten assoziiert (LE CONTE et al. 2011). Weiterhin wird vermutet, dass die CYP4-Familie an der chemischen Kommunikation und dem Pestizidstoffwechsel bei mehreren Insekten beteiligt ist (CLAUDIANOS et al. 2006). In dieser Arbeit konnte durch die RT-qPCR-Analyse eine signifikante Herunterregulierung des *CYP4G11*-Gens in FVB nachgewiesen werden. Die meisten Insekten haben zwei oder mehr CYP4G-Gene, im Genom der Apis-Arten und in anderen eusozialen Bienen ist *CYP4G11* allerdings als einziges Mitglied dieser Unterfamilie beschrieben. *CYP4G11* ist mit der Verstoffwechslung pheromonaler und phytochemischer Verbindungen in den Antennen assoziiert (CALLA et al. 2018). Eine weitere Studie ergab, dass *CYP4G11* wahrscheinlich eher an der Chemoperzeption von chemischen Umweltsignalen beteiligt ist, als an der Entgiftung, da es stark in den Antennen- und Beinorganen von Sammelbienen vorkommt, aber in jungen Honigbienen niedrig ist (MAO et al. 2015). Andere Studien gehen allerdings von einer bedeutenden Rolle *CYP4G11s* bei der Reaktion auf oxidativen Stress und der Gewährleistung von Schutz vor oxidativen Schäden aus (SHI et al. 2013). Weiterhin zeigen RT-qPCR-Daten eine geringfügige, aber signifikante Expressionshemmung des *CYP4AV1*-Gens bei 1TA. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde *CYP4AV1* in der FVB mit einem *Fold Change* von  $\geq 2$  hochreguliert, jedoch ohne statistische Signifikanz. *CYP4AV1* ist ein Paralog der bekannten CYP4-Gene, die für Enzyme kodieren, die mit dem Lipidstoffwechsel in Verbindung gebracht werden (FEYEREISEN 2005). Die Hemmung der Expression von P450-Enzymen durch AS-Exposition wurde bereits in der Literatur beschrieben (GASHOUT et al. 2018). Hier wurde sie auf eine mögliche negative Rückkopplung zugunsten einer gesteigerten Expression anderer Cytochrom P450-Monooxygenasen, die zur AS-Entgiftung beitragen könnten, zurückgeführt. Eine Hemmung der CYP450-Expression durch AS-Exposition könnte eine Verstärkung der schädlichen Auswirkungen anderer chemischer Rückstände und Umweltgifte bedeuten und somit die Schwächung von Abwehrreaktionen in der Honigbiene erklären. Diese Annahme, verbunden mit der generell geringeren Expression der CYP-Enzyme in Larven gegenüber dem Adultstadium der Biene, kann ein Erklärungsansatz für die bekannte höhere Empfindlichkeit der Bienenbrut gegenüber der AS-Exposition darstellen.

In den meisten Säugetierarten ist der Folat-abhängige Ein-Kohlenstoff-Pool ( $C_1$ ) der wichtigste metabolische Abbauweg von AS, der mit der Reaktion von AS mit Tetrahydrofolsäure (THF) zu 10-Formyltetrahydrofolat (10-THF) beginnt. Dieser initiale Schritt wird katalysiert durch die 10-Formyltetrahydrofolat-Synthetase (MTHFD1). Es folgt die NADP<sup>+</sup>-abhängige Umwandlung von 10-THF in  $CO_2$  und THF, katalysiert durch eine cytosolische 10-Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase (FDH) (JOHLIN et al. 1989, NEYMEYER und TEPHLY 1994, ANGUERA et al. 2006). Die RT-qPCR-Validierung bestätigte die Induktion von FDH in 1TA mit einer signifikanten Tendenz (also einem *Fold Change* von weniger als 2) der Heraufregulation. In der FVB wurde im Gegensatz dazu jedoch eine statistisch signifikante Herunterregulierung dieses Gens beobachtet. Auch hier könnte die Hemmung der Genexpression dieses Enzyms ein Grund für die erhöhte Empfindlichkeit der Brut gegenüber AS darstellen. Aus einer früheren Proteom-Untersuchung von Honigbienen ging hervor, dass es nach einem Befall durch *Varroa*-Muttermilben zu einer Induktion von FDH in der Hämolymphe kam (SŁOWIŃSKA et al. 2019). Folge-Studien sollten daher untersuchen, ob diese transkriptionellen Veränderungen entweder durch eine Veränderung der Enzymaktivität durch AS ausgelöst wurden oder eine Reaktion auf die Infektion mit *Varroa*-Milben darstellen.

Keines der übrigen getesteten Gene zeigte eine statistisch signifikante Veränderung in der RT-qPCR-Validierung, die unsere Kriterien einer  $> 2$ -fachen Veränderung des *Fold Changes* erfüllte. Die Aktivität der entgiftenden Enzyme kann jedoch durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Zum einen geschieht dies durch Induktion, die mit einer Erhöhung der Transkription (und anschließend der Translation) verbunden ist (HOLLENBERG 2002). Dies ist mit einer messbaren Veränderung der zellulären mRNA-Konzentration verbunden. Es handelt sich jedoch um einen relativ langsamen Prozess, der zum gewählten Zeitpunkt nach 24 h AS-Exposition möglicherweise noch nicht nachweisbar ist. Andererseits beeinflussen Aktivatoren, welche die Enzymwirkung durch einen Aktivierungs- oder

## Diskussion

Stimulationsmechanismus verstärken, die Enzymaktivität (HOLLENBERG 2002). Im Gegensatz zur Induktion beeinflussen sie jedoch nicht die zelluläre Konzentration des Enzyms und sind daher auf mRNA- oder Proteinebene nicht nachweisbar. Das bedeutet, dass eine mögliche Entgiftungsleistung durch aktivierte Enzyme deutlich höher sein kann, als wir durch Messung der Transkript-Niveaus nachweisen konnten.

In bisher veröffentlichten Studien zur molekularen Wirkungsweise der AS bei Honigbienen wurden Expressionsänderungen auf mRNA-Ebene beschrieben, die durch unsere bisherigen Versuche nicht nachvollzogen werden konnten. So wurde eine Induktion von *PKA-C1* (BONCRISTIANI et al. 2012) sowie *AChE* und *Def-1* (GASHOUT et al. 2018) nach AS-Exposition beschrieben, während keine signifikanten Veränderungen in unseren aktuellen RNA-Seq-Daten gefunden wurden. Darüber hinaus wird angenommen, dass AS zur Hemmung der *MRJP-1*- und *CYP9Q3*-Expression führt (GASHOUT et al. 2018). Auch diese Beobachtung konnte durch unsere Experimente nicht bestätigt werden. Ein Grund für die abweichenden Ergebnisse können Unterschiede im experimentellen sowie methodischen Ansatz sein: Teilweise wurden in den oben genannten Studien adulte Bienen verwendet, während wir jüngere Bienenstadien (1TA, FVB) verwendeten, deren Enzymausstattung sich altersbedingt von den älteren Lebensstadien unterscheidet (SMIRLE und ROBINSON 1989). Ebenfalls unterschieden sich die Versuchsbedingungen unserer Experimente von den oben genannten Studien. BONCRISTIANI et al. (2012) führten zwar ebenfalls Feldversuche durch, allerdings wurden die Versuchsvölker mit sogenannten *Mite Away Strips*, die AS als Wirkstoff enthalten, behandelt und die Individuen erst 30 Tage nach Beginn der Behandlung beprobt. GASHOUT et al. (2018) führten ihre Versuche unter Laborbedingungen durch und wendeten einzelne LD05- und LD50-Dosen topisch auf den Bienen an. Weiterhin verwendeten beide Autoren ausschließlich die RT-qPCR-Methodik, während unsere Untersuchungen initial mit RNA-Seq durchgeführt wurden und aufbauend auf diesen Ergebnissen die RT-qPCR-Validierungs-Analysen angeschlossen wurden.

### 5.1.2. *Varroa-Milbe*

Diese Studie untersuchte erstmals die molekulare Reaktion der *Varroa-Milbe* auf eine AS-Behandlung. Bisher finden sich in der Literatur keine experimentellen Studien, die das Transkriptom der *Varroa-Milbe* holistisch mit der RNA-Seq Methode untersuchten.

RT-qPCR-Daten bestätigten, dass die *FMO5 Dimethylanilin-Monooxygenase (FMO5)* in AS-exponierten VM signifikant höher exprimiert wurde als in der unbehandelten Kontrolle. Flavinhaltige Monooxygenasen (FMOs) mit einer prosthetischen FAD-Gruppe und einem NADPH-Cofaktor stellen eine Familie von Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen dar (LAWTON et al. 1994). Sowohl die strukturellen als auch die physiologischen Eigenschaften der FMO-Familie sind noch relativ unbekannt, mit Ausnahme der Funktionen im xenobiotischen Stoffwechsel. In Säugetieren sind heute fünf Subtypen von FMO als *FMO1 - FMO5* bekannt (LAWTON et al. 1994), die mit der Entgiftung von xenobiotischen Verbindungen der sogenannten Phase I verbunden sind. Diese geht einher mit der enzymatischen Veränderung der Toxinstruktur und der Hemmung der Interaktion mit lipophilen Zielstrukturen in einer Vielzahl von Organismen (SEHLMAYER et al. 2010, BERENBAUM und JOHNSON 2015). Eine Reihe strukturell unterschiedlicher Verbindungen, die ein "weiches Nukleophil" (meist Stickstoff oder Schwefel) enthalten, werden als potenzielles Substrat betrachtet (KRUEGER und WILLIAMS 2005, ESWARAMOORTHY et al. 2006). FMOs sind generell in der Lage, synthetische Arzneimittel und pflanzliche Alkaloide zu oxidieren. Diese Entgiftungsmechanismen wurden mit der Entwicklung von Resistenzen gegen bestimmte chemische Pestizide, einschließlich Pyrrolizidinalkaloide bei Lepidoptera-Arten und Pyrethroiden bei der *Varroa-Milbe*, in Verbindung gebracht (DAWKAR et al. 2013, SURLIS et al. 2016). Obwohl eine Studie von OVERBY et al. (1995) besagt, dass *FMO5* nicht ohne weiteres als arzneimittelabbauendes Enzym klassifiziert werden kann, deutet die induzierte Expression dieses Enzyms nach AS-Exposition in unserer Studie eine Rolle in der Entgiftung von AS an.

RT-qPCR-Daten bestätigten die Induktion von *CYP3A56* in VM nach AS-Exposition. Bei Wirbeltieren spielt die *CYP3A*-Unterfamilie eine dominante Rolle bei der Metabolisierung zahlreicher Substanzen, einschließlich Toxinen, Pestiziden und therapeutischen

## Diskussion

Medikamenten (LAMBA et al. 2002, CUI et al. 2016). Die meisten Studien zu CYP3A wurden an Wirbeltieren durchgeführt, während wenig über Nichtwirbeltierarten, insbesondere Insekten, bekannt ist. Unsere Daten belegen erstmals eine Genexpressionsänderung von *CYP3A56* im Zusammenhang mit AS-Exposition. Dies würde ähnliche, wie bei Wirbeltieren beschriebene Reaktionen nahelegen.

Weitere Studien sind erforderlich, um zu validieren, ob eine veränderte Transkription dieser Gene eine spezifische Entgiftungsreaktion auf AS ist und ob diese Enzyme in der Lage sind, AS in *Varroa* zu metabolisieren.

### **5.1.3. Validierung der RNA-Seq Daten durch RT-qPCR**

Die Expressionsänderung der meisten Gene war in den RNA-Seq- und RT-qPCR-Daten konsistent und stimmte in der Richtung der Genexpression überein, allerdings nicht immer mit den in den einzelnen Techniken gemessenen Expressionsstärken. Insgesamt zeigten fünf von sechs Kandidatengenen eines breiten Spektrums von DEGs eine sehr gute Übereinstimmung in den RNA-Seq- und RT-qPCR-Datensätzen. Ein Kandidatengen in der Gruppe der FVB zeigte große Unterschiede in der differentiellen Expression zwischen beiden Methoden: *CYP4AA1* (Abbildung 13). Dieses Gen war allerdings bereits nach der Cluster-Analyse der RNA-Seq-Daten eher variabel reguliert, sodass diese Unstimmigkeiten dadurch bedingt sein können. Es gibt mehrere Erklärungsmöglichkeiten für unterschiedliche Ergebnisse der beiden Methoden: Die Versuche wurden in zwei unterschiedlichen Jahren durchgeführt. Die Versuchsbedingungen (Beutentyp, Volksstärke, Applikationsart, etc.) waren gleichbleibend in beiden Jahren, jedoch kann es durch andere externe Faktoren (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, völkerspezifische Unterschiede) zu leichten Unterschieden in den Wirkungsbedingungen gekommen sein. Um die Technologie der RNA-Seq zu validieren, wurden die qRT-PCR-Analysen mit denselben RNA-Proben, die in der RNA-Seq-Analyse untersucht wurden, durchgeführt. Allerdings validieren RT-qPCR-Analysen derselben Proben, die in der RNA-Seq untersucht wurden, nur die Technologie, jedoch nicht die Schlussfolgerung über die Behandlungen. Erst die Validierung anhand verschiedener biologischer Replikate aus derselben Population kann die biologischen Schlussfolgerungen aus der RNA-Seq-Analyse validieren (ALLISON et al. 2006, FANG und CUI 2011). Deshalb wurde die Validierungs-Analyse über RT-qPCR mit verschiedenen biologischen Replikaten aus der gleichen Population ergänzt. Durch die Unterschiede zwischen den Proben kann es zu leichten Abweichungen in den Ergebnissen kommen. Weiterhin bestehen Unterschiede im Normalisierungsprozess der Methoden: In RT-qPCR-Analysen wird die Expression der *Genes of Interest* (GOI) relativ zur Expression eines oder mehrerer Referenzgens/e gemessen (HUGGETT et al. 2005, BUSTIN et al. 2009). Dadurch können das Primerdesign und die Auswahl der Referenzgene in der RT-qPCR-Analyse für unterschiedliche Expressionsergebnisse verantwortlich sein. Bei der RNA-Seq wird in den meisten Fällen vorausgesetzt, dass jede Probe die gleiche Gesamtmenge an exprimierter mRNA aufweist, dies kann als *Read Count* pro Millionen gemappter *Reads* oder RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*) ausgedrückt werden. Hier wird zur Normalisierung der Daten also die Größe der hinterlegten Bibliothek genutzt (EVANS et al. 2017).

### 5.2. Teil 2 - Proteom-Analyse nach Ameisensäure-Behandlung bei der Varroa-Milbe

Nach aktuellen Literaturrecherchen wurde der Einfluss von AS auf die Proteinexpression in der Varroa-Milbe bislang noch nicht untersucht. Durch Integration der Daten aus der Transkriptionsanalyse sollte auf die tatsächliche Häufigkeit und Funktion der codierten Proteine geschlossen werden. Nach unserem Wissen ist diese ganzheitliche Proteinexpressionsstudie die erste Analyse, die die Auswirkungen von AS auf Varroa-Milben auf Protein-Niveau untersucht.

Wie bereits zur Regulation der Transkription diskutiert (vgl. 5.1.1.), kann die AS-Behandlung potentiell Einfluss auf die Protein-Expression, aber auch die Protein-Aktivität haben. Die Induktion der Transkription mit anschließender Translation (HOLLENBERG 2002) ist mit messbaren Veränderungen der zellulären mRNA- und Protein-Konzentration verbunden. Zum gewählten Zeitpunkt nach 24 h AS-Exposition sind jedoch möglicherweise noch nicht alle Effekte nachweisbar. Weiterhin kann AS die Proteinaktivität auch als Aktivator (HOLLENBERG 2002) beeinflussen, was im Gegensatz zur Expressions-Induktion keine Auswirkung auf die zelluläre Protein-Konzentration hätte. Folglich sind vermutlich nicht alle Effekte der AS-Exposition auf die Protein-Expression und -Aktivität durch die Untersuchungen zu einem frühen Zeitpunkt detektierbar, denn sie bilden immer nur eine Momentaufnahme ab. Um eine Aussage über zukünftige Entwicklungen und Auswirkungen der AS im Gesamtorganismus treffen zu können, sind kontinuierliche Messungen über einen längeren Zeitraum sinnvoll.

#### 5.2.1. Einfluss der AS-Behandlung auf Energie-Stoffwechsel und oxidativen Stress

Die Analyse zeigte in AS-exponierten Milben eine signifikante Dysregulation von Kandidatenproteinen der mitochondrialen Zellatmung, die am Citrat-Zyklus und der Atmungskette beteiligt sind. In 24 h AS-behandelten Milben konnte eine signifikant geringere Protein-Konzentration der *Succinyl-CoA Synthetase* sowie eine Konzentrationserhöhung der *Malat Dehydrogenase* festgestellt werden; beide Enzyme sind mit dem Citrat-Zyklus assoziiert. Der in der mitochondrialen Matrix ablaufende Citrat-Zyklus ist ein zentrales Stoffwechselzentrum aerober Organismen, welcher wichtige Zwischenprodukte für die Biosynthese verschiedener Makromoleküle sowie Energie- und Elektronenakzeptoren liefert, die in nachgeschalteten zellulären Prozessen, wie der Atmungskette, verwendet werden. Eine aberrante Zyklus-Funktion kann durch die fehlende Bereitstellung von Substraten für die Aminosäure- und Fett-Synthese sowie Gluconeogenese nachfolgend zu vielfältigen Funktionsstörungen und Zellpathologien führen. Weiterhin konnte in den Ergebnissen nach AS-Exposition eine signifikant verringerte Quantität einiger Untereinheiten von mit der oxidativen Phosphorylierung assoziierten Enzymen gezeigt werden (*NADH Dehydrogenase* (Komplex I), *Cytochrom C Oxidase* (Komplex IV), *F-type H<sup>+</sup>-Transporting ATPase* (Komplex V)), was auf eine mitochondriale Dysfunktion mit folgend Hypoxie-ähnlichen Bedingungen hinweisen könnte. Der Komplex I stellt den Haupteintrittspunkt für Elektronen in die Atmungskette dar und spielt als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der gesamten Zellatmung eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel. Der Komplex IV ist das letzte Enzym in der Elektronentransportkette. Er nimmt von insgesamt vier Cyt C-Molekülen je ein Elektron auf und überträgt sie auf molekularen Sauerstoff, wobei final zwei Wassermoleküle entstehen. Bei diesem Prozess kommt es zur Erhöhung des Protonengradienten bzw. der Transmembrandifferenz des elektrochemischen Protonenpotenzials, sodass der Komplex V (ATP-Synthase) den Energieüberträger der Zelle, Adenosintriphosphat (ATP), generieren kann. Bereits mehrere Studien berichten von einer Hemmung der mitochondrialen Elektronentransportkette durch Interaktion von AS mit COX (NICHOLLS 1975, KEYHANI und KEYHANI 1980, LIESIVUORI et al. 1991). Die Studie von ZERIN et al. (2015) wies neben der Hemmung des Komplex IV auch eine Hemmung des Komplex I durch Formaldehyd, einem Metabolit der AS, in Neuroblastom-Zellen nach. Der mitochondriale Energiestoffwechsel ist notwendig für die Erzeugung von mehr als 90% der Zellenergie in Form von ATP. Die Störung der ATP-Synthese hätte folglich einen wichtigen Einfluss auf ATP-verbrauchende Stoffwechselwege, wie Bewegung, aktiver Transport und Biosynthesen (BERG et al. 2013)

## Diskussion

und manifestiert sich häufig in psychomotorischen Störungen und Azidose (durch die vermehrt ablaufende anaerobe Glykolyse) sowie Hypoglykämie (BLASS et al. 1988, BOLLI et al. 1993, REDDI 2019). Durch die Hemmung der Atmungskette wird das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis erhöht und blockiert den Citrat-Zyklus weiter, was die oben genannten Folgen der Zyklus-Hemmung verschärft. Eine Störung der mitochondrialen Atmungskette ist zudem mit einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verbunden (DISTELMAIER et al. 2009, SCHAFFER und BRONNIKOVA 2012). Zu diesen zählen Hyperoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Hydroxyl-Radikale (OH<sup>-</sup>). Übermäßige oxidative Reaktionen (oxidativer Stress) führt durch unkontrollierte DNA-, Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidoxidation zur Schädigung von zellulären Makromolekülen (SOHAL et al. 2002). Insekten reagieren dann in der Regel mit Symptomen der Alterung, die schließlich im Zelltod enden kann (FLEMING et al. 1992).

Da die Erfassung der Proteinkonzentration von Enzymen nicht unbedingt eine Aussage über bzw. eine direkte Korrelation mit deren enzymatischer Aktivität zulässt, kann erst die Analyse von deren spezifischen Enzymaktivitäten hierüber Aufschluss geben (siehe 5.4).

### **5.2.2. Einfluss der AS-Behandlung auf HSP70-Expression**

In den Proteom-Daten ist eine deutliche Konzentrationserhöhung des *Heat shock 70kDa Proteins* (HSP70) in AS-behandelten Milben zu beobachten. Hitzeschockproteine (HSP), auch als Stressproteine bezeichnet, schützen die Zellen unter ungünstigen Bedingungen durch Faltung, Reparatur und Abbau irreparabler Proteine vor den schädlichen Auswirkungen der Proteindenaturierung. Einige HSPs werden vom Organismus konstitutiv produziert (CHAPPELL et al. 1986). Bei den meisten handelt es sich jedoch um molekulare Chaperone, die als Reaktion auf verschiedene Stressfaktoren von den Zellen überexprimiert werden (HIGHTOWER 1991). Zu diesen Stressfaktoren zählen unter anderem Hitze, Nährstoffmangel und oxidativer Stress (ZÜGEL und KAUFMANN 1999).

Die Expression von HSP70 unter Stressbedingungen wurde bereits bei vielen Tierarten beschrieben, darunter auch bei Insekten (KING und MACRAE 2015). Hypoxie führt bei Dipteren wie *Sarcophaga crassipalpis* und *D. melanogaster* zur Expression mehrerer HSP-Gene, darunter *HSP70* (AZAD et al. 2011, MICHAUD et al. 2011). Ein Einfluss der AS-Exposition auf die HSP-Expression konnte in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) bereits nachgewiesen werden (LEE et al. 2010). So könnte auch in diesem Fall die AS-Behandlung mit potentieller Hemmung der zellulären Atmung zu oxidativem Stress und als Reaktion darauf zur Überexpression des *HSP70* in den Milben geführt haben.

### **5.2.3. Einfluss der AS-behandlung auf die Proteostase**

Die Ergebnisse der Proteom-Analyse deuten auf eine Imbalance in der Proteostase AS-behandelter Milben hin. Zwar konnten in der unbehandelten Kontrollgruppe und 24 h AS-behandelten Gruppe annähernd gleich viele Proteine relativ quantifiziert werden (durchschnittlich 2383 Proteine in der Kontroll- sowie 2405 Proteine in der Behandlungsgruppe), doch zeigten sich in den Expressionsdaten allgemeine Tendenzen einer Hemmung der Protein-Synthese sowie einer Induktion des Protein-Abbaus. So war eine eingeschränkte Protein-Biosynthese-Kapazität der AS-behandelten Milben zum einen durch eine generelle Tendenz der Hemmung Ribosomen-assoziiierter Proteine und zum anderen durch eine überwiegend reprimierte Expression verschiedener Translationsfaktoren (unter anderem *Translation initiation factor 1A* und *Elongation factor Tu*) zu beobachten. Ribosomen sind für die Protein-Synthese und somit für das Zellwachstum und die –proliferation, also das Überleben der Zelle, unerlässlich. Ribosomaler Stress – also eine Hemmung der Ribosomen-Synthese – würde folglich zur negativen Beeinflussung des Zellwachstums sowie der Zellteilung mit daraus resultierenden Entwicklungsstörungen und Alterungsprozessen führen (PESTOV et al. 2001). Weiterhin konnte eine Induktion von Proteasom-assoziierten Proteinen (z.B. *20S proteasome subunit alpha 2/ 4*, *26S proteasome regulatory subunit 8*) gezeigt werden. Das Proteasom ist ein hochorganisierter Proteasekomplex und für den kontrollierten zellulären Proteinabbau während der Entwicklung in eukaryotischen Zellen sowie des Zelltods zuständig (TANAKA 2009).



## Diskussion

Die Proteostase, also die Balance zwischen Proteinsynthese und -abbau in jeder Zelle, ist von enormer Wichtigkeit. Selbst ein geringfügiger Rückgang der Synthese oder eine geringfügige Steigerung des Abbaus kann zu einem deutlichen Protein-Masseverlust im Gesamtorganismus führen, wenn dieses Ungleichgewicht über einen längeren Zeitraum bestehen bleibt (LECKER et al. 1999).

Die Ribosomen-Synthese ist stark abhängig vom Nährstoff- und Energiestatus der Zellen. Dies macht den Prozess sehr anfällig für interne und externe Stressreize (TURI et al. 2019). Nährstoffmangel, insbesondere das Fehlen essentieller Aminosäuren, führt zur Hemmung der Ribosomen-Synthese. Um die Ressourcen zu schonen, müssen die Zellen die Produktion von Ribosomen einschränken, da sie einen komplexen und in hohem Maße energieverbrauchenden Prozess der Zelle darstellt (MAYER und GRUMMT 2006). Unzureichende Kalorienaufnahme führt durch eine gesteigerte Aktivität des Proteasoms außerdem zu einem gesteigerten Gesamtabbau von Zellproteinen, um eine Grundversorgung (Gluconeogenese, Energieproduktion) des Organismus basierend auf Aminosäuren sicherzustellen (MEDINA et al. 1995). Die AS-Behandlung könnte zu einer Schwächung der Milben mit nachfolgend verminderter Nahrungsaufnahme führen, die Einfluss auf die Aktivität des Proteinumsatzes hätte.

Zelluläre Stressoren, wie eine Hypoxie, können zur Hemmung der Ribosomen-Synthese (MEKHAIL et al. 2006), aber auch zu einer Aktivierung des Proteasom- und Autophagie-vermittelten Protein-Abbaus führen (GOMES-MARCONDES und TISDALE 2002, DE THEIJE et al. 2015). Durch eine mitochondriale Dysfunktion mit eingeschränkt ablaufender Atmungskette (was einen Hypoxie-ähnlichen Zustand des Organismus bewirkt) könnte es in den AS-behandelten Milben zu diesem Effekt kommen.

Ein gesteigerter Proteinabbau könnte weiterhin durch ein vermehrtes Auftreten von durch AS geschädigter Proteine, unter anderem durch Sauerstoffradikale oder durch Denaturierung, zu erklären sein. Diese würden durch eine gesteigerte Aktivität des Proteasoms selektiv eliminiert werden (LECKER et al. 1999).

Eine ähnliche Hemmung der Proteinbiosynthese durch AS konnte bereits in Hefezellen infolge einer Herunterregulierung der Ribosomen-Biogenese und der Kernsteuerung der ATPase-mRNA-Expression nachgewiesen werden (LEE et al. 2010).

### **5.2.4. Expression der Detoxifikations-assoziierten Proteine**

In den 24 h AS-behandelten Milben konnte eine signifikante Erhöhung verschiedener Enzyme beobachtet werden, die grundsätzlich mit der Detoxifikation assoziiert sind. Darunter ist die *Carbonyl Reduktase 1*, die einen wichtigen Nicht-P450-Weg zur Metabolisierung sowohl endogener Substrate als auch Xenobiotika darstellt (MALÁTKOVÁ und WSOL 2014, RAMSDEN et al. 2018). Sie zählt zu den NADPH-abhängigen kurzkettigen Reduktasen mit breiter Substratspezifität (BATEMAN et al. 2008) und spielt eine wichtige Rolle im Arzneimittel-Metabolismus sowie beim Schutz des Organismus vor potenziell schädlichen Carbonylen und Chinonen (BOUŠOVÁ et al. 2015).

Ein weiteres, nach 24 h AS-Exposition induziertes Entgiftungsenzym ist die *Homogentisat 1,2-Dioxygenase* (HGD), die am Abbau der Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin beteiligt ist (SCHMIDT et al. 1995). In einer Fütterungsstudie von Honigbienen wurde eine Induktion dieses Enzyms nach Fütterung mit Honig nachgewiesen (WHEELER und ROBINSON 2014). Eine Studie, die den Abbaumechanismus flüchtiger organischer Verbindungen (VOCs), zu denen auch AS zählt, in *Exophiala lecanii-corni*, einem dimorphen Pilz, untersuchte, beschreibt eine Beteiligung der HGD am Metabolismus von Ethylbenzol (GUNSCH et al. 2005).

Die Induktion eines antioxidativen Enzyms (*Peroxidase-like Isoform X1*) deutet darauf hin, dass oxidativer Stress, der durch eine potentielle Beeinträchtigung der Atmungskette ausgelöst werden kann, einer der schädigenden Wirkmechanismen der AS auf Varroa-Milben sein könnte. Wenn die Kapazität der antioxidativen Systeme der Zelle überschritten wird, löst eine erhöhte ROS-Produktion letztendlich den Zelltod aus.

Interessanterweise ist eine Erhöhung der Konzentration der flavinhaltigen Monooxygenase *FMO GS-OX5-like* in AS-exponierten Milben zu beobachten. Die FMO GS-OXs gelten als spezifische Enzymgruppe der Kreuzblütler (*Brassicaceae*) und katalysieren den ersten strukturellen Modifikationsschritt in der Synthese von aliphatischen Glucosinolaten, einer

## Diskussion

Klasse von Sekundärmetaboliten dieser Pflanzenfamilie (LI et al. 2008, KONG et al. 2016). Im Gegensatz dazu und auch im Kontrast zu den Ergebnissen der Transkriptom-Analyse zeigten die Ergebnisse der Proteinexpressionsanalyse eine signifikant verminderte Konzentration einer weiteren flavinhaltigen Monooxygenase, der *FMO5*. Wie bereits in Abschnitt 5.1.2. beschrieben, stellen flavinhaltige Monooxygenasen (FMOs) eine Familie von Enzymen dar, die xenobiotische Verbindungen in der sogenannten Phase I metabolisieren (LAWTON et al. 1994, SEHLMAYER et al. 2010, BERENBAUM und JOHNSON 2015). Ihre Aktivität wurde mit der Entwicklung von Resistenzen gegen Pyrethroide bei der Varroa-Milbe in Verbindung gebracht (SURLIS et al. 2016).

In der Varroa-Milbe wurden die genannten Enzyme bisher nicht im Zusammenhang mit der AS-Entgiftung beschrieben, sodass auch hier zukünftig eine funktionelle Untersuchung zur Bestimmung der Enzymaktivität Aufschluss über eine Beteiligung am AS-Metabolismus geben kann.

### 5.3. Vergleich von Transkriptom- und Proteomdaten

Die Korrelations-Analyse zwischen den Transkriptom und Proteom-Daten ergab eine geringe Übereinstimmung der Resultate beider Methoden. Dieses Ergebnis geht mit Erkenntnissen aus der aktuellen Literatur einher. Lange ging man in der systembiologischen Literatur von einer direkt proportionalen Beziehung zwischen mRNA- und Proteinexpression aus, doch die mRNA-Expressionsdaten aus denselben Zellen unter ähnlichen Bedingungen korrelierten in mehreren Studien nicht unbedingt immer mit Veränderungen der zellulären Gesamtprotein-Expression (GYGI et al. 1999, YEUNG 2011). Inzwischen ist allgemein akzeptiert, dass die Transkription nur eine Ebene der Genregulation darstellt, sodass die Transkriptionsebenen nicht direkt in das qualitative und quantitative Proteinexpressionsniveau übersetzt werden können. Die Translation, Degradation, Translokation und Modifizierung von Proteinen stehen unter dem Einfluss von vielfältigen intrinsischen und extrinsischen Faktoren, wie dem Zellzyklus, dem physiologischen Zustand des Zellsystems sowie posttranskriptionellen Modifikationen. Sie beeinflussen die Gesamtprotein-Expression, ohne dass auf Transkriptom-Ebene eine Änderung festzustellen ist (GREENBAUM et al. 2003, TOLEDO-ARANA und SOLANO 2010). Außerdem unterscheidet sich die durchschnittliche Halbwertszeit von mRNA und Proteinen erheblich (SCHWANHÄUSSER et al. 2011), was zu unterschiedlichen Mengen korrelierender mRNAs und Proteinen führen kann.

Folglich reicht die Betrachtung des Transkriptoms allein nicht aus, um auf die funktionelle Rolle bestimmter Gene im zellulären Stoffwechsel zu schließen (HAIDER und PAL 2013). Proteine verbinden als Hauptmediatoren der Stoffwechselaktivität die Transkriptionsexpression mit dem zellulären Stoffwechsel. Eine Ergänzung von Transkriptom-Daten mit Proteom-Analysen ist deshalb wesentlich für die umfassende Aufklärung der molekularen Wirkweise der AS in Varroa-Milben und Honigbienen. Eine entsprechende Analyse wurde bei den Varroa-Milben bereits durchgeführt, während sie für die Honigbiene, da diese in diesem Projekt nicht im Fokus stand, noch aussteht.

### **5.4. Teil 3 - Etablierung eines Tests zur funktionellen Untersuchung der mitochondrialen Enzym-Aktivitäten bei der Honigbiene und der Varroa-Milbe**

In dieser Studie wurden erstmalig gemeinsam die COX- sowie CS-Aktivität der Kontroll- und AS-Behandlungsgruppe von 1TA, FVB und VM gemessen. Nach erfolgreicher Etablierung beider Enzymaktivitätstests für Honigbienen und Varroa-Milben, konnte geprüft werden, ob die AS-Exposition auch in diesen Organismen einen hemmenden Einfluss auf die COX-Aktivität hat. Dazu wurden die auf die Gesamtprotein- und CS bezogenen Mittel der COX-Aktivität zwischen den Gruppen verglichen.

Aufgrund des geringen und variablen Stichprobenumfangs unserer Studie sind diese Ergebnisse vorläufig und nicht valide. Dennoch werden die vorläufigen Ergebnisse und Erkenntnisse dieser Studie bei der Planung weiterführender Studien hilfreich sein.

So bestätigen die Ergebnisse der COX-Aktivität pro mg Protein (U/ mg Protein) die bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur, die besagen, dass AS zu einer Hemmung der COX führt (NICHOLLS 1975, KEYHANI und KEYHANI 1980, LIESIVUORI et al. 1991). Die Hemmung der COX-Aktivität war in Varroa-Milben stärker ausgeprägt, als die bei Honigbienen. Dies geht einher mit Erkenntnissen der Studie von BOLLI et al. (1993), welche die Varroa-Milbe als empfindlicher gegenüber einer AS-Exposition im Vergleich zu verschiedenen Larvenstadien der Honigbiene beschreibt.

Die Aktivität der CS sollte zur Normalisierung der COX-Aktivität unterschiedlicher Proben genutzt werden, da sie mit dem Mitochondriengehalt der Probe korreliert. Allerdings war die mittlere CS-Aktivität pro mg Protein nach AS-Exposition deutlich reduziert, im Fall der FVB sogar signifikant. Die Normalisierung der COX-Aktivität auf die CS-Aktivität führte folglich zu einer Aufhebung der beobachteten Reduktion der COX-Aktivität nach AS-Exposition. Wenn also primär die COX-Aktivität beurteilt werden soll, könnte ihre Normalisierung auf die CS-Aktivität möglicherweise ein falsch negatives Ergebnis erzeugen, wenn durch AS auch eine Reduktion der CS-Aktivität erfolgt. Dies könnte indirekt mit einer zurückwirkenden Hemmung der Atmungskette erklärt werden: Durch die Hemmung der Atmungskette kommt es zur Akkumulation von NADH (MORENO-DOMÍNGUEZ et al. 2020), welches wiederum hemmend auf die CS-Aktivität wirkt. Da die Hemmung der CS-Aktivität nach AS-Exposition allerdings sehr deutlich war und in dem Ausmaß ihrer Hemmung nicht mit der Hemmung der COX korrelierte sowie mit gravierenden Unterschieden zwischen den Probengruppen einherging (Hemmung zwischen 33 und 98%), ist zu hinterfragen, ob dieser Effekt tatsächlich durch die AS-Exposition mit Hemmung der Atmungskette oder eher durch andere Faktoren, z. B. methodische Fehler, zu erklären ist.

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass die COX- und CS-Aktivitäten in allen Probengruppen durch die AS-Behandlung reduziert werden. Allerdings muss erneut darauf hingewiesen werden, dass es sich hierbei um vorläufige Befunde handelt und der kleine Stichprobenumfang eine endgültige Schlussfolgerung ausschließt. Weiterhin bestehen Unsicherheiten in Bezug auf die Ergebnisse der CS-Aktivitätsmessungen, die eine aussagekräftige Bewertung der COX-Aktivität normalisiert auf die CS-Aktivität nicht ermöglichen. Zukünftige Studien sollten eine größere Stichprobenanzahl sowie eine Optimierung des CS-Aktivitäts-Assays für das Honigbienen- und Varroa-System berücksichtigen.

### 6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten AS-vermittelte Gen- und Proteinexpressionsregulation in Honigbienen und Varroa-Milben charakterisiert werden, welche als möglicherweise neu entdeckte Zielstrukturen das Potential besitzen, neue therapeutische Ansatzpunkte für eine verbesserte Varroa-Therapie zu erschließen. Bezüglich des für die Zellatmung wichtigen Enzyms Cytochrom-C-Oxidase (COX), einer potentiellen Zielstruktur der AS, wurden erste, vorläufige Erkenntnisse zur Wirk- und Hemmweise der AS in Wirt und Parasit gewonnen.

Diese Arbeit erschließt durch holistische Proteinexpressionsdaten in Varroa-Milben erstmalig neue, erfolgversprechende Angriffspunkte, um eine Optimierung der Varroa-Therapie zu entwickeln. Die Integration von Transkriptom- und Proteomdaten führte zu neuen Einsichten bezüglich der molekularen Reaktion der Milbe auf AS, die aus Differentialanalysen weder allein auf mRNA- noch auf Proteinebene ersichtlich gewesen wären. Folgerichtig sollte die Bestimmung der mit den mRNA-Muster korrespondierenden Proteinmengen ebenfalls für die verschiedenen Altersstufen der Honigbiene durchgeführt werden, um auch hier das Bild der Genexpression um die Regulationsstufe der Translation zu ergänzen und somit eine vollständige Bewertung zu ermöglichen.

Ein endgültiger Beweis der Assoziation regulierter Transkripte und Proteine mit der AS-Exposition ist schlussendlich nur durch die Aufklärung des funktionellen Zusammenhangs zu leisten, da die Aktivität eines Enzyms nicht allein durch seine Häufigkeit bestimmt wird.

Im Fall der COX, deren Beeinflussung durch AS in den Expressionsdaten dieser Arbeit initial bestätigt wurde und deren Hemmung durch AS in Säugetieren in der Literatur bereits beschrieben wurde (NICHOLLS 1975, KEYHANI und KEYHANI 1980, LIESIVUORI et al. 1991), sollten Untersuchungen zur Funktionalität weiter geführt werden. Basierend auf dem etablierten Funktions-Assay im Mikrotiterplatten-Format, sollten die beobachteten Schwachstellen bezüglich der Normalisierung der Mitochondrienzahl mittels CS-Aktivität zukünftig behoben werden. Weiterführende Studien sollten einen größeren Stichprobenumfang und eine valide Normalisierung beinhalten, um eine potentielle Hemmung der zellulären Atmung mittels Enzymaktivitätsmessung zu ermöglichen.

Hinsichtlich einer funktionellen Charakterisierung der von uns identifizierten neuen Kandidatenproteine wäre die Überprüfung eines AS-Effekts mittels rekombinanter Expression ausgewählter Detoxifikations-assoziiierter Enzyme unter Verwendung des Baculovirus-Systems in Insektenzellen (KIDD und EMERY 1993, GALLEN und SICK 1999) mit nachfolgender Funktions-Analyse in entsprechenden Aktivitäts-Assays anzustreben.

Interessant wäre weiterhin die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur (3D) der ausgewählten Kandidatenproteine und deren Ligand-Komplexen, z.B. durch Proteinkristallographie (SOUZA et al. 2000, KLEBE 2009), NMR-Spektroskopie (Kernmagnetische Resonanz, *Nuclear magnetic resonance*) (KLEBE 2009, NORTON 2018), *Molecular Modelling* (D'ALFONSO et al. 2001, SILVA et al. 2019) sowie eine quantitative Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen (PERKINS et al. 2003). Dies würde die Entdeckung und gezielte Entwicklung von neuen Wirkstoffen (mit geringeren Nebenwirkungen auf die Honigbienen) oder Optimierung bestehender Therapie-Substanzen anfangs *in silico* ermöglichen (KLEBE 2009).

Um die Effekte der AS sowohl auf Expressions- als auch auf Funktionsebene ganzheitlicher beschreiben zu können und den Verlauf der Reaktionen in Honigbiene und Varroa-Milbe zu analysieren, ist es sinnvoll, die Versuche um weitere Zeitpunkte (im Verlauf bis 24 h und darüber hinaus), verschiedene AS-Konzentrationen (<60%) sowie weitere Entwicklungsstadien der Honigbienen bzw. Varroa-Milben zu ergänzen. Dadurch kann beurteilt werden, ob ein Unterschied zwischen der Reaktion von Wirt und Parasit und ihrer Schädigung durch AS in Bezug auf die Konzentration und Dauer der Behandlung besteht. Dies würde wichtige Ansatzpunkte für eine spezifischere Adaption der Behandlung auf die Varroa-Milbe, zum Beispiel durch Anpassung der gewählten AS-Dosierung oder Anwendungsdauer, bieten und somit helfen, die schädigende Wirkung auf die Honigbiene zu reduzieren.

## Ausblick

Eine weitere vielversprechende Strategie zur Anpassung der Behandlung an die Varroa-Milbe ist die RNA-Interferenz (RNAi). RNAi ist eine effiziente Technik zur Blockierung bestimmter Zielgene, die durch die Einführung von doppelsträngigen RNA-Molekülen (dsRNA) in den Organismus erreicht werden, welche die Expression von Zielgenen auf Transkriptionsebene reduzieren (HANNON 2002). Bei der Untersuchung der Resistenz-Entwicklung und Bekämpfung von Schadinsekten spielt diese Technik bereits eine tragende Rolle (KIM et al. 2015, HAFEEZ et al. 2020).

Die temporäre Abschaltung potentiell AS-verstoffwechselnder Enzyme in der Varroa-Milbe durch RNAi birgt das Potenzial, die Entgiftungs-Kapazität der Milbe gegenüber AS punktgenau und zeitgesteuert zu beeinträchtigen und damit die erforderliche AS-Dosierung für die Behandlung zu reduzieren. Dies würde eine Entlastung der Honigbiene bedeuten, sodass die schädigenden Auswirkungen der AS reduziert werden könnten. RNAi wurde bei Insekten schon häufig eingesetzt (AI et al. 2018) und kann durch Applikation von dsRNA z.B. durch orale Aufnahme erreicht werden (LIU et al. 2017, AI et al. 2018, HUANG et al. 2019). Eine Applikation der dsRNA an die Honigbienen ist über das Futter möglich; diese geben die aufgenommenen dsRNA-Moleküle an die Milbe weiter, wenn diese zur Nahrungsaufnahme am Bienenkörper saugt (GARBIAN et al. 2012). Als praktische Anwendung wäre als nicht-transformierende Strategie auch die direkte exogene Applikation von RNA-Molekülen denkbar z.B. durch Formulierungen sprühbarer dsRNAs (CAGLIARI et al. 2019, DALAKOURAS et al. 2020). Zumindest die phoretischen Stadien der Milbe wären durch eine solche Spray-Behandlung punktgenau abgedeckt.

Eine weitere Lösung wäre die Anwendung verschiedener Strategien zur Unterstützung und Modulation der Entgiftungsfunktionen der Honigbiene. Dies kann zum Beispiel durch die Supplementierung von Futtermitteln erreicht werden, die Stoffwechselwege positiv beeinflussen, um die Biotransformation und anschließende Ausscheidung von Toxinen bzw. das Immunsystem zu unterstützen.

So wurde durch MITTON et al. (2020) bereits die Wirkung der Supplementierung von p-Cumarsäure und Indol-3-Essigsäure auf das Überleben und die Aktivität der wichtigsten Entgiftungsenzyme von Honigbienen nach Tau-Fluvalinat-Exposition untersucht. Sie zeigten, dass eine Supplementierung mit diesen Substanzen das Überleben der exponierten Bienen um etwa 20% verbesserte.

Es ist bekannt, dass die Verabreichung von Folsäure in Säugetieren die AS-Akkumulation nach einer Methanolvergiftung verringert, indem sie die Oxidations- und Verwertungsrate der AS durch die Folat-abhängige 10-Formyl-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase (FDH) stimuliert (MCMARTIN et al. 1977, NOKER et al. 1980, JOHLIN et al. 1987). Eine ähnlich unterstützende Wirkung auf die Aktivität der FDH in der Honigbiene könnte durch die Supplementierung von Folsäure im Futter versucht werden, mit dem Ziel die AS-Detoxifikation zu optimieren.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Vitamin C höhere Gehalte an Gesamtprotein und höhere Aktivitäten von antioxidativen Enzymen (Peroxidase, Katalase und Glutathiontransferase) bewirkt (FARJAN et al. 2012). Es wäre durch Zufütterung der Honigbienen während einer AS-Behandlung zu prüfen, ob dadurch vor AS-induziertem oxidativen Stress geschützt werden könnte.

Durch unsere Ergebnisse zur molekularen AS-Wirkung ergeben sich zukünftig sehr erfolgversprechende neue Ansätze für eine Optimierung der Bekämpfung des wichtigsten Honigbienen-Pathogen, der Varroa-Milbe, unter Schonung der Honigbiene.

## 7. Zusammenfassung

### Charakterisierung des molekularen Wirkmechanismus des Varroazids Ameisensäure auf Honigbienen und Varroa-Milben

Diese Arbeit untersuchte den Einfluss des Varroazids Ameisensäure auf die Honigbiene *Apis mellifera* sowie ihren Parasiten *Varroa destructor*. Die Varroose führt, in Kombination mit weiteren Faktoren, zu teils massiven Honigbienen-Völkerverlusten. Diese sind von enormer ökologischer und ökonomischer Bedeutung, sodass eine effiziente medikamentöse Behandlung der Bienenvölker obligat ist. Die Ameisensäure gilt aufgrund zahlreicher Vorteile gegenüber anderen Wirkstoffen als derzeit zuverlässigste und relativ einfache Behandlungsmethode, obwohl es auch während dieser Behandlung zur Schädigung der Honigbiene kommen kann. Um das Verständnis zum Wirkmechanismus der Ameisensäure zu erweitern und zukünftig durch eine adaptierte Applikation die negativen Effekte bei der Honigbiene zu reduzieren, wurde die Reaktion auf 60%ige Ameisensäure in Honigbienen und Varroa-Milben mittels vergleichender molekularbiologischer und biochemischer Methoden untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollten molekulare endogene Effekte einer Ameisensäure-Behandlung auf die Genexpression in Honigbiene und Varroa-Milbe untersucht werden. Hierfür wurde die Technik der RNA-Seq angewandt und nachfolgend die Ergebnisse mittels RT-qPCR-Analysen validiert. Anschließende Proteom-Analysen sollten die korrelierenden Proteine erfassen, um zu überprüfen, ob diese nachgewiesenen transkriptionellen Veränderungen auch im Protein-Muster entsprechend reflektiert sind. Entsprechende Versuche wurden für die Varroa-Milbe als bisher am wenigsten untersuchtes Modell in dieser Arbeit durchgeführt. Da selbst die Konzentration eines Proteins in einem System keine gültigen Details über seine Aktivität und Funktion liefert, wurden im letzten Teil der Arbeit die Ameisensäure-spezifische Aktivität ausgesuchter Enzyme in Funktions-Assays überprüft. Dazu wurde ein Aktivitäts-Assay der Cytochrom C Oxidase im Mikrotiterplatten-System etabliert. Weiterführende Untersuchungen der enzymatischen Aktivität einiger wichtiger Kandidatenproteine soll durch deren rekombinante Expression mit nachfolgenden Funktions-Assays folgen.

Die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse bei Honigbienen deuten darauf hin, dass die bekanntlich höhere Ameisensäure-Empfindlichkeit der jüngeren Larvenstadien im Vergleich zu den frisch geschlüpften Arbeiterinnen auf eine niedrigere Entgiftungskapazität durch eine reduzierte Ausstattung mit entsprechenden Entgiftungsenzymen gegenüber adulten Bienen zurückzuführen ist. Ein Nachweis der durch Ameisensäure induzierten Kandidatengene in Honigbienen konnte allerdings in Varroa-Milben nicht geleistet werden. Dies könnte für unterschiedliche Ameisensäure-Metabolisierungs-Strategien zwischen diesen beiden Organismen sprechen. Auf dieser Grundlage könnte das anhaltende Problem der unerwünschten Schädigung der Bienen während der Ameisensäure-Behandlung durch die Entwicklung neuer Formulierungen und/oder Anwendungen gelöst werden, die spezielle Zielstrukturen in den Milben treffen.

Die Proteom-Analyse der Ameisensäure-behandelten Varroa-Milben deutete eine Imbalance in der Proteostase infolge einer eingeschränkten Proteinsynthese bei gleichzeitig gesteigertem Proteinabbau an. Dies deutet auf einen deutlichen Masseverlust hin und könnte eine Schädigung der Ameisensäure auf die Varroa-Milben erklären. Die Ameisensäure-exponierten Varroa-Milben zeigten eine Induktion von Hitzeschockproteinen, ein Anzeichen für oxidativen Stress. Dieser wird vermutlich ausgelöst durch eine, in unseren Daten belegte, spezifische Hemmung der Atmungskette und des Citrat-Zyklus. Dies führt durch Schädigung von zellulären Makromolekülen zur Alterung des Organismus und letztendlich zum Zelltod. Die Proteom-Analyse ergab weiterhin eine gesteigerte Konzentration mehrerer Kandidatenproteine, die mit der Detoxifikation assoziiert sind, die allerdings mit der Transkriptom-Analyse nicht korrelierten. Insgesamt lieferte die Untersuchung der Proteine mit den Bestandteilen der Atmungskette den mutmaßlich primären Zielort der Ameisensäure-Wirkung sowie die für die Ameisensäure-generierte Toxizität verantwortlichen

## Zusammenfassung

Abwehrmechanismen, zu denen nach unserer Datenlage hauptsächlich die Hitzeschockproteine und Detoxifikationsenzyme zählen.

Die initialen Ergebnisse der Aktivitäts-Untersuchungen der Cytochrom-C-Oxidase deuten auf eine Hemmung durch Ameisensäure hin. Diese Ergebnisse bestätigen bisherige Erkenntnisse aus der Literatur und weitere Datensätze dieser Arbeit. Somit scheint die Ameisensäure-Schadwirkung eine Folge des oxidativen Stresses, erzeugt durch die Hemmung der zellulären Atmung mit laktischer Azidose zu sein.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten erstmals molekulare endogene Effekte einer Ameisensäure-Behandlung auf Honigbienen und gleichzeitig auf Varroa-Milben. Auf Grundlage der Erkenntnisse dieser Studie können zukünftige, neue Strategien der Behandlung spezifisch an die Varroa-Milbe angepasst und dadurch der Behandlungs-Erfolg bei der Varroa-Bekämpfung deutlich erhöht werden; die bisher häufig auftretenden negativen Effekte auf Honigbienen können durch das bessere Verständnis der molekularen Prozesse reduziert werden.



## Summary

### 8. Summary

#### Characterization of the molecular mode of action of the varroacide formic acid on honeybees and varroa mites

This work investigated the influence of the varroacide formic acid on the honeybee *Apis mellifera* as well as its parasite *Varroa destructor*. Varroosis, in combination with other factors, leads to partially massive honeybee colony losses. These are of enormous ecological and economic importance, making an efficient drug treatment of the bee colonies obligatory. Formic acid is currently considered the most reliable and relatively simple treatment method due to its numerous advantages over other active substances, although damage to the honeybee may occur during this treatment. In order to increase the understanding of the mechanism of action of formic acid and to reduce the negative effects on the honeybee in the future by an adapted application, the reaction to 60% formic acid in honeybees and varroa mites was investigated using comparative molecular biological and biochemical methods. In the present study, molecular endogenous effects of formic acid treatment on gene expression in honeybee and varroa mite were investigated. For this purpose, RNA-Seq was applied and the results were subsequently validated by RT-qPCR analyses. Subsequent proteome analyses were performed to detect the correlating proteins in order to determine whether these detected transcriptional changes are also reflected in the protein pattern. In this work corresponding experiments were carried out for the varroa mite, the least studied model. Since even the concentration of a protein in a system does not provide valid details about its activity and function, the formic acid-specific activity of selected enzymes was examined in functional assays in the last part of the work. For this purpose, an activity assay of Cytochrom C oxidase was established in a microtiter plate system. Further investigations of the enzymatic activity of some important candidate proteins will follow by their recombinant expression with subsequent functional assays.

The results of transcriptome analysis in honeybees indicate that the known higher formic acid sensitivity of the younger larval stages compared to the newly hatched worker bees is due to a lower detoxification capacity as a result of a reduced equipment with appropriate detoxification enzymes compared to adult bees. However, a detection of formic acid-induced candidate genes in honey bees could not be achieved in varroa mites. This could indicate different formic acid metabolism strategies between these two organisms. On this basis, the persistent problem of unwanted damage to bees during formic acid treatment could be solved by developing new formulations and/or applications that target specific target structures in the mites.

The proteome analysis of formic acid-treated varroa mites indicated an imbalance in proteostasis due to restricted protein synthesis combined with increased protein degradation. This indicates a significant loss of mass and could explain a damaging effect of formic acid on the varroa mites. The formic acid-exposed varroa mites showed an induction of heat shock proteins, an indicator of oxidative stress. This is presumably caused by a specific inhibition of the respiratory chain and the citrate cycle, which is proven in our data. As a result, damage to cellular macromolecules leads to the ageing of the organism and ultimately to cell death. The proteome analysis further revealed an increased concentration of several candidate proteins associated with detoxification, which however did not correlate with the transcriptome analysis. Overall, the investigation of the proteins with the components of the respiratory chain provided the presumed primary target site of formic acid action as well as the defence mechanisms responsible for formic acid-generated toxicity, which according to our data mainly include heat shock proteins and detoxification enzymes.

The initial results of the activity studies of Cytochrom C oxidase indicate an inhibition by formic acid. These results confirm previous findings from the literature and further data sets of this work. Thus, formic acid damage appears to be a consequence of oxidative stress produced by inhibition of cellular respiration with lactic acidosis.

In summary, our data show for the first time molecular effects of formic acid treatment on honeybees and simultaneously on varroa mites. Based on the findings of this study, future

## Summary

treatment strategies can be specifically adapted to the varroa mite, thereby significantly increasing the success of treatment in varroa control; the negative effects on honeybees, which have frequently occurred up to now, can be reduced by a better understanding of the molecular processes.

## 9. Literaturverzeichnis

Aebersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." *Nature* **422**: 198.

Ai, X., Y. Wei, L. Huang, J. Zhao, Y. Wang and X. Liu (2018). "Developmental control of *Helicoverpa armigera* by ingestion of bacteria expressing dsRNA targeting an arginine kinase gene." *Biocontrol Science and Technology* **28**: 253-267.

Aizen, M. A., L. A. Garibaldi, S. A. Cunningham and A. M. Klein (2008). "Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency." *Current biology* **18**: 1572-1575.

Allison, D. B., X. Cui, G. P. Page and M. Sabripour (2006). "Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus." *Nature reviews genetics* **7**: 55-65.

Amdam, G. V. and S. W. Omholt (2002). "The regulatory anatomy of honeybee lifespan." *Journal of theoretical biology* **216**: 209-228.

Amrine Jr, J. W. and R. Noel (2006). "Formic acid fumigator for controlling varroa mites in honey bee hives." *International Journal of Acarology* **32**: 115-124.

Anderson, D. and J. Trueman (2000). "*Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species." *Experimental & applied acarology* **24**: 165-189.

Anderson, N. L. and N. G. Anderson (1998). "Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words." *Electrophoresis* **19**: 1853-1861.

Anguera, M. C., M. S. Field, C. Perry, H. Ghandour, E.-P. Chiang, J. Selhub, B. Shane and P. J. Stover (2006). "Regulation of folate-mediated one-carbon metabolism by 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase." *Journal of Biological Chemistry* **281**: 18335-18342.

Arbeitman, M. N., E. E. Furlong, F. Imam, E. Johnson, B. H. Null, B. S. Baker, M. A. Krasnow, M. P. Scott, R. W. Davis and K. P. White (2002). "Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*." *Science* **297**: 2270-2275.

Aronstein, K. A., E. Saldivar, R. Vega, S. Westmiller and A. E. Douglas (2012). "How *Varroa* parasitism affects the immunological and nutritional status of the honey bee, *Apis mellifera*." *Insects* **3**: 601-615.

Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight and J. T. Eppig (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology." *Nature genetics* **25**: 25.

Azad, P., J. Ryu and G. G. Haddad (2011). "Distinct role of Hsp70 in *Drosophila* hemocytes during severe hypoxia." *Free Radical Biology and Medicine* **51**: 530-538.

## Literaturverzeichnis

Ball, B. (1983). association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees. *Varroa jacobsoni* Oud. affecting honey bees: present status and needs: proceedings of a meeting of the EC Experts' Group, Wageningen, 7-9 February 1983/edited by R. Cavalloro, Rotterdam: Published for the Commission of the European Communities by AA ....

Barry, B. C., L. Verstraten, F. T. Butler, P. M. Whelan and W. M. Wright (2018). The use of airborne ultrasound for *Varroa destructor* mite control in beehives. 2018 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), IEEE.

Bateman, R. L., D. Rauh, B. Tavshanjian and K. M. Shokat (2008). "Human carbonyl reductase 1 is an S-nitrosoglutathione reductase." *Journal of Biological Chemistry* **283**: 35756-35762.

Becker, C., A. Hammerle-Fickinger, I. Riedmaier and M. Pfaffl (2010). "mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis." *Methods* **50**: 237-243.

BEENOW (2015). Acid Vapor Baths In The Beehive.

Beetsma, J. (1994). "The *Varroa* mite, a devastating parasite of western honeybees and an economic threat to beekeeping." *Outlook on Agriculture* **23**: 169-175.

Berenbaum, M. R. (2002). "Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions." *Journal of chemical ecology* **28**: 873-896.

Berenbaum, M. R. and R. M. Johnson (2015). "Xenobiotic detoxification pathways in honey bees." *Current opinion in insect science* **10**: 51-58.

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer (2013). *Der Stoffwechsel: Konzepte und Grundmuster*. Stryer Biochemie, Springer: 431-455.

Blackiston, H. and T. Schwaibold (2016). *Imkern für Dummies*, Wiley VCH Verlag GmbH.

Blass, J., R. Sheu and J. Cedarbaum (1988). "Energy metabolism in disorders of the nervous system." *Revue neurologique* **144**: 543-563.

Boecking, O. and E. Genersch (2008). "Varroosis—the ongoing crisis in bee keeping." *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **3**: 221-228.

Bogdanov, S. (2006). "Contaminants of bee products." *Apidologie* **37**: 1-18.

Bogdanov, S., A. Imdorf and V. Kilchenmann (1998). "Residues in wax and honey after Apilife VAR® treatment." *Apidologie* **29**: 513-524.

Bolli, H., S. Bogdanov, A. Imdorf and P. Fluri (1993). "Zur Wirkungsweise von Ameisensäure bei *Varroa jacobsoni* Oud und der Honigbiene (*Apis mellifera* L)." *Apidologie* **24**: 51-57.

## Literaturverzeichnis

Boncristiani, H., R. Underwood, R. Schwarz, J. D. Evans, J. Pettis and D. vanEngelsdorp (2012). "Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*." *J Insect Physiol* **58**: 613-620.

Boot, W., J. Schoenmaker, J. Calis and J. Beetsma (1995). "Invasion of *Varroa jacobsoni* into drone brood cells of the honey bee, *Apis mellifera*." *Apidologie* **26**: 109-118.

Boušová, I., L. Skálová, P. Souček and P. Matoušková (2015). "The modulation of carbonyl reductase 1 by polyphenols." *Drug metabolism reviews* **47**: 520-533.

Bowen-Walker, P., S. Martin and A. Gunn (1999). "The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni* Oud." *Journal of invertebrate pathology* **73**: 101-106.

Bray, N. L., H. Pimentel, P. Melsted and L. Pachter (2016). "Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification." *Nature biotechnology* **34**: 525.

Brunori, M. and M. Wilson (1995). "Electron transfer and proton pumping in cytochrome oxidase." *Biochimie* **77**: 668-676.

Büchler, R., W. Drescher and I. Tornier (1992). "Grooming behaviour of *Apis cerana*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata* and its effect on the parasitic mites *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*." *Experimental & applied acarology* **16**: 313-319.

Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellems, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl and G. L. Shipley (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." *Clinical chemistry* **55**: 611-622.

Cagliari, D., E. Avila dos Santos, N. Dias, G. Smagghe and M. Zotti (2019). Nontransformative strategies for RNAi in crop protection. *Modulating Gene Expression-Abridging the RNAi and CRISPR-Cas9 Technologies*, IntechOpen.

Calderone, N. W. (1999). "Evaluation of formic acid and a thymol-based blend of natural products for the fall control of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)." *Journal of Economic Entomology* **92**: 253-260.

Calla, B., M. MacLean, L. H. Liao, I. Dhanjal, C. Tittiger, G. Blomquist and M. R. Berenbaum (2018). "Functional characterization of CYP4G11—a highly conserved enzyme in the western honey bee *Apis mellifera*." *Insect molecular biology* **27**: 661-674.

Cameron, R. C., E. J. Duncan and P. K. Dearden (2013). "Biased gene expression in early honeybee larval development." *BMC genomics* **14**: 903.

Chandramouli, K. and P.-Y. Qian (2009). "Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity." *Human genomics and proteomics: HGP* **2009**.

## Literaturverzeichnis

Chappell, T. G., W. J. Welch, D. M. Schlossman, K. B. Palter, M. J. Schlesinger and J. E. Rothman (1986). "Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins." *Cell* **45**: 3-13.

Charlesworth, B. (2003). "Sex determination in the honeybee." *Cell* **114**: 397-398.

Charrière, J., V. Dietemann, M. Schäfer, B. Dainat, P. Neumann and P. Gallmann (2012). "Leitfaden Bienengesundheit des Zentrums für Bienenforschung."

Chauzat, M. P. and J. P. Faucon (2007). "Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France." *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* **63**: 1100-1106.

Chen, M. and J. L. Manley (2009). "Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches." *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 741.

Chen, Y. and J. D. Evans (2007). "Historical presence of Israeli acute paralysis virus in the United States." *American bee journal* **147**: 1027-1028.

Chen, Y., J. S. Pettis, J. D. Evans, M. Kramer and M. F. Feldlaufer (2004). "Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*." *Apidologie* **35**: 441-448.

Claudianos, C., H. Ranson, R. Johnson, S. Biswas, M. A. Schuler, M. R. Berenbaum, R. Feyereisen and J. G. Oakeshott (2006). "A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee." *Insect molecular biology* **15**: 615-636.

Conesa, A., S. Götz, J. M. García-Gómez, J. Terol, M. Talón and M. Robles (2005). "Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research." *Bioinformatics* **21**: 3674-3676.

Cornuet, J. and L. Garnery (1991). "Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications." *Apidologie* **22**: 627-642.

Cox-Foster, D. L., S. Conlan, E. C. Holmes, G. Palacios, J. D. Evans, N. A. Moran, P.-L. Quan, T. Briese, M. Hornig and D. M. Geiser (2007). "A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder." *Science* **318**: 283-287.

Cui, S., L. Wang, L. Ma and X. Geng (2016). "P450-mediated detoxification of botanicals in insects." *Phytoparasitica* **44**: 585-599.

D'Alfonso, G., A. Tramontano and A. Lahm (2001). "Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling." *Journal of structural biology* **134**: 246-256.

Dainat, B., J. D. Evans, Y. P. Chen, L. Gauthier and P. Neumann (2012). "Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees." *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 981-987.

## Literaturverzeichnis

Dalakouras, A., M. Wassenegger, E. Dadami, I. Ganopoulos, M. Pappas and K. K. Papadopoulou (2020). "GMO-free RNAi: exogenous application of RNA molecules in plants." *Plant physiology*: pp. 00570.02019.

Dawkar, V. V., Y. R. Chikate, P. R. Lomate, B. B. Dholakia, V. S. Gupta and A. P. Giri (2013). "Molecular insights into resistance mechanisms of lepidopteran insect pests against toxicants." *Journal of Proteome Research* **12**: 4727-4737.

de Guzman, L. I. and T. E. Rinderer (1999). "Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees." *Apidologie* **30**: 85-95.

De Jong, D., P. De Jong and L. Goncalves (1982). "Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*." *Journal of apicultural research* **21**: 165-167.

de Theije, C. C., R. C. Langen, W. H. Lamers, H. R. Gosker, A. M. Schols and S. E. Koehler (2015). "Differential sensitivity of oxidative and glycolytic muscles to hypoxia-induced muscle atrophy." *Journal of Applied Physiology* **118**: 200-211.

Delaplane, K. and D. Mayer (2000). *Crop pollination by bees*. New York, CAB, ISBN: 978-0851994482.

Deracinois, B., C. Flahaut, S. Duban-Deweere and Y. Karamanos (2013). "Comparative and quantitative global proteomics approaches: an overview." *Proteomes* **1**: 180-218.

Derecka, K., M. J. Blythe, S. Malla, D. P. Genereux, A. Guffanti, P. Pavan, A. Moles, C. Snart, T. Ryder and C. A. Ortori (2013). "Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae." *PLoS One* **8**: e68191.

Di Prisco, G., F. Pennacchio, E. Caprio, H. F. Boncristiani Jr, J. D. Evans and Y. Chen (2011). "*Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*." *Journal of General Virology* **92**: 151-155.

Dietemann, V., J. Pflugfelder, D. Anderson, J.-D. Charrière, N. Chejanovsky, B. Dainat, J. de Miranda, K. Delaplane, F.-X. Dillier and S. Fuch (2012). "*Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control." *Journal of Apicultural Research* **51**: 125-132.

Distelmaier, F., W. J. H. Koopman, L. P. van den Heuvel, R. J. Rodenburg, E. Mayatepek, P. H. G. M. Willems and J. A. M. Smeitink (2009). "Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease." *Brain* **132**: 833-842.

Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson and T. R. Gingeras (2013). "STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner." *Bioinformatics* **29**: 15-21.

Duay, P., D. De Jong and W. Engels (2003). "Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites." *Apidologie* **34**: 61-65.

## Literaturverzeichnis

Eckert, J., K. T. Friedhoff, H. Zahner and P. Deplazes (2005). Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, Enke Verlag Stuttgart.

Ellis, A. M., G. W. Hayes and J. D. Ellis (2009). "The efficacy of dusting honey bee colonies with powdered sugar to reduce Varroa mite populations." *Journal of apicultural research* **48**: 72-76.

Elzen, P. J., F. A. Eischen, J. R. Baxter, G. W. Elzen and W. T. Wilson (1999). "Detection of resistance in US Varroa jacobsoni Oud.(Mesostigmata: Varroidae) to the acaricide fluvalinate." *Apidologie* **30**: 13-17.

Eswaramoorthy, S., J. B. Bonanno, S. K. Burley and S. Swaminathan (2006). "Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 9832-9837.

Evans, C., J. Hardin and D. M. Stoebel (2017). "Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions." *Briefings in bioinformatics* **19**: 776-792.

Fang, Z. and X. Cui (2011). "Design and validation issues in RNA-seq experiments." *Briefings in bioinformatics* **12**: 280-287.

Farjan, M., M. Dmitryjuk, Z. Lipiński, E. Biernat-Łopieńska and K. Żółtowska (2012). "Supplementation of the honey bee diet with vitamin C: The effect on the antioxidative system of Apis mellifera carnica brood at different stages." *Journal of Apicultural Research* **51**: 263-270.

Feyereisen, R. (2005). "Insect cytochrome P450." In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier. pp. 1–77.

Feyereisen, R. (2012). *Insect CYP genes and P450 enzymes*. *Insect molecular biology and biochemistry*, Elsevier: 236-316.

Fleming, J., I. Reveillaud and A. Niedzwiecki (1992). "Role of oxidative stress in Drosophila aging." *Mutation Research/DNAging* **275**: 267-279.

Fornelli, L., T. K. Toby, L. F. Schachner, P. F. Doubleday, K. Srzentić, C. J. DeHart and N. L. Kelleher (2018). "Top-down proteomics: Where we are, where we are going?" *Journal of proteomics* **175**: 3-4.

Franck, P., L. Garnery, M. Solignac and J.-M. Cornuet (2000). "Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East." *Apidologie* **31**: 167-180.

Fries, I. (1991). "Treatment of sealed honey bee brood with formic acid for control of Varroa jacobsoni." *American bee journal* (USA).



## Literaturverzeichnis

Fries, I., A. Imdorf and P. Rosenkranz (2006). "Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate." *Apidologie* **37**: 564-570.

Gallagher, S. R. and P. R. Desjardins (2006). "Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy." *Current protocols in molecular biology* **76**: A. 3D. 1-A. 3D. 21.

Gallai, N., J.-M. Salles, J. Settele and B. E. Vaissière (2009). "Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline." *Ecological economics* **68**: 810-821.

Galleno, M. and A. J. Sick (1999). *Baculovirus expression vector system. Gene expression systems*, Elsevier: 331-363.

Garbian, Y., E. Maori, H. Kalev, S. Shafir and I. Sela (2012). "Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and *Varroa destructor*: *Varroa* gene silencing reduces *Varroa* population." *PLoS pathogens* **8**.

Garedew, A., E. Schmolz and I. Lamprecht (2004). "The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*." *Apidologie* **35**: 419-430.

Gashout, H. A., P. H. Goodwin and E. Guzman-Novoa (2018). "Lethality of synthetic and natural acaricides to worker honey bees (*Apis mellifera*) and their impact on the expression of health and detoxification-related genes." *Environmental Science and Pollution Research* **25**: 34730-34739.

Gashout, H. A. and E. Guzmán-Novoa (2009). "Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.)." *Journal of apicultural research* **48**: 263-269.

Gibson, G. and S. V. Muse (2002). *A primer of genome science*, 3. Auflage, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, ISBN: 978-0-87893-236-8.

Girişgin, A. O. and L. Aydin (2010). "Efficacies of formic, oxalic and lactic acids against *Varroa destructor* in naturally infested honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies in Turkey." *Kafkasuniv vet fakderg*16 (6): 941-945.

Gisder, S., P. Aumeier and E. Genersch (2009). "Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*)." *Journal of General Virology* **90**: 463-467.

Gomes-Marcondes, M. C. C. and M. J. Tisdale (2002). "Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress." *Cancer letters* **180**: 69-74.

Goras, G., C. Tananaki, S. Gounari, M. Dimou, E. Lazaridou, E. Karazafiris, D. Kanelis, V. Liolios, H. F. El Taj and A. Thrasyvoulou (2015). "Hyperthermia-a non-chemical control strategy against varroa." *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* **66**: 249-256.

## Literaturverzeichnis

Greenbaum, D., C. Colangelo, K. Williams and M. Gerstein (2003). "Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale." *Genome biology* **4**: 117.

Gregorc, A. and I. Planinc (2002). "The control of Varroa destructor using oxalic acid." *The Veterinary Journal* **163**: 306-310.

Gregorc, A. and I. Planinc (2005). "The control of Varroa destructor in honey bee colonies using the thymol-based acaricide-Apiguard." *American Bee Journal* **145**: 672-675.

Gregorc, A., A. Pogacnik and I. D. Bowen (2004). "Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated

with oxalic or formic acid." *Apidologie* **35**: 453-460.

Gregorc, A. and J. Poklukar (2003). "Rotenone and oxalic acid as alternative acaricidal treatments for Varroa destructor in honeybee colonies." *Veterinary parasitology* **111**: 351-360.

Gunes, N., L. Aydın, D. Belenli, J. M. Hranitz, S. Mengilig and S. Selova (2017). "Stress responses of honey bees to organic acid and essential oil treatments against varroa mites." *Journal of Apicultural Research* **56**: 175-181.

Gunsch, C. K., Q. Cheng, K. A. Kinney, P. J. Szaniszlo and C. P. Whitman (2005). "Identification of a homogentisate-1, 2-dioxygenase gene in the fungus *Exophiala lecanii-corni*: analysis and implications." *Applied microbiology and biotechnology* **68**: 405-411.

Gygi, S. P., Y. Rochon, B. R. Franza and R. Aebersold (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." *Molecular and cellular biology* **19**: 1720-1730.

Hafeez, M., M. Qasim, S. Ali, H. K. Yousaf, M. Waqas, E. Ali, M. A. Ahmad, S. Jan, M. A. Bashir and A. Noman (2020). "Expression and functional analysis of P450 gene induced tolerance/resistance to lambda-cyhalothrin in quercetin fed larvae of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner)." *Saudi journal of biological sciences* **27**: 77-87.

Haider, S. and R. Pal (2013). "Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data." *Current genomics* **14**: 91-110.

Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." *nature* **418**: 244-251.

Hatefi, Y. (1985). "The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system." *Annual review of biochemistry* **54**: 1015-1069.

Heimpel, G. E. and J. G. De Boer (2008). "Sex determination in the Hymenoptera." *Annu. Rev. Entomol.* **53**: 209-230.

Hightower, L. E. (1991). "Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity." *Cell* **66**: 191-197.

## Literaturverzeichnis

Hollenberg, P. F. (2002). "Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes." *Drug metabolism reviews* **34**: 17-35.

Hou, Z., P. Jiang, S. A. Swanson, A. L. Elwell, B. K. S. Nguyen, J. M. Bolin, R. Stewart and J. A. Thomson (2015). "A cost-effective RNA sequencing protocol for large-scale gene expression studies." *Scientific reports* **5**: 9570.

Huang, Z. Y., G. Bian, Z. Xi and X. Xie (2019). "Genes important for survival or reproduction in *Varroa destructor* identified by RNAi." *Insect science* **26**: 68-75.

Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin and A. Zumla (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." *Genes and immunity* **6**: 279.

Ifantidis, M. D. and P. Rosenkranz (1988). "Reproduktion der Bienenmilbe *Varroa jacobsoni* (Acarina: Varroidae)." *Entomologia generalis*: 111-122.

Illumina, I. (2010). "Illumina Sequencing Technology." *Technology Spotlight*.

Illumina, I. (2016). "An introduction to Next-Generation Sequencing Technology."

Imdorf, A., J.-D. Charrière, V. Kilchenmann, S. Bogdanov and P. Fluri (2003). "Alternative strategy in central Europe for the control of *Varroa destructor* in honey bee colonies." *Apiacta* **38**: 258-278.

Imdorf, A., J.-D. Charrière and P. Rosenkranz (1999). "Varroa control with formic acid." *FAIR CT97-3686*: 24.

Jaffe, R., V. Dietemann, M. H. Allsopp, C. Costa, R. M. Crewe, R. DALL'OLIO, P. de la Rua, M. A. EL-NIWEIRI, I. Fries and N. Kezic (2010). "Estimating the density of honeybee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses." *Conservation biology* **24**: 583-593.

Johlin, F. C., C. S. Fortman, D. Nghiem and T. R. Tephly (1987). "Studies on the role of folic acid and folate-dependent enzymes in human methanol poisoning." *Molecular pharmacology* **31**: 557-561.

Johlin, F. C., E. Swain, C. Smith and T. R. Tephly (1989). "Studies on the mechanism of methanol poisoning: purification and comparison of rat and human liver 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase." *Molecular pharmacology* **35**: 745-750.

Johnson, R. M., J. D. Evans, G. E. Robinson and M. R. Berenbaum (2009). "Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*)." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 14790-14795.

Johnson, R. M., W. Mao, H. S. Pollock, G. Niu, M. A. Schuler and M. R. Berenbaum (2012). "Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis mellifera*." *PloS one* **7**: e31051.

## Literaturverzeichnis

Jungblut, P. R., H. G. Holzhütter, R. Apweiler and H. Schlüter (2008). "The speciation of the proteome." *Chemistry Central Journal* **2**: 16.

Käll, Lukas, Jesse D. Canterbury, Jason Weston, William Stafford Noble, and Michael J. MacCoss. 2007. 'Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets', *Nature Methods*, 4: 923-25.

Kanbar, G. and W. Engels (2004). "Visualisation by vital staining with trypan blue of wounds punctured by *Varroa destructor* mites in pupae of the honey bee (*Apis mellifera*)." *Apidologie* **35**: 25-29.

Kanehisa, M. and S. Goto (2000). "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes." *Nucleic acids research* **28**: 27-30.

Keyhani, J. and E. Keyhani (1980). "EPR study of the effect of formate on cytochrome c oxidase." *Biochemical and biophysical research communications* **92**: 327-333.

Kidd, I. M. and V. C. Emery (1993). "The use of baculoviruses as expression vectors." *Applied biochemistry and biotechnology* **42**: 137-159.

Kim, Y. H., M. S. Issa, A. M. Cooper and K. Y. Zhu (2015). "RNA interference: applications and advances in insect toxicology and insect pest management." *Pesticide Biochemistry and Physiology* **120**: 109-117.

King, A. M. and T. H. MacRae (2015). "Insect heat shock proteins during stress and diapause." *Annual review of entomology* **60**: 59-75.

Klebe, G. (2009). *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, 2. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, ISBN: 978-3-8274-2046-6.

Klein, A.-M., B. E. Vaissiere, J. H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S. A. Cunningham, C. Kremen and T. Tscharntke (2006). "Importance of pollinators in changing landscapes for world crops." *Proceedings of the royal society B: biological sciences* **274**: 303-313.

Koeniger, N., G. Koeniger and M. Delfinado-Baker (1983). "Observations on mites of the Asian honeybee species (*Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*)." *Apidologie* **14**: 197-204.

Kong, W., J. Li, Q. Yu, W. Cang, R. Xu, Y. Wang and W. Ji (2016). "Two novel flavin-containing monooxygenases involved in biosynthesis of aliphatic glucosinolates." *Frontiers in plant science* **7**: 1292.

Kovac, H. and K. Crailsheim (1988). "Lifespan of *Apis mellifera carnica* Pollm. infested by *Varroa jacobsoni* Oud. in relation to season and extent of infestation." *Journal of Apicultural Research* **27**: 230-238.

## Literaturverzeichnis

Kraus, B. and S. Berg (1994). "Effect of a lactic acid treatment during winter in temperate climate upon *Varroa jacobsoni* Oud. and the bee (*Apis mellifera* L.) colony." *Experimental & Applied Acarology* **18**: 459-468.

Kraus, B. and R. E. Page Jr (1995). "Effect of *varroa jacobsoni* (mesostigmata: Varroidae) on feral *apis mellifera* (hymenoptera: Apidae) in california." *Environmental Entomology* **24**: 1473-1480.

Krueger, S. K. and D. E. Williams (2005). "Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism." *Pharmacology & therapeutics* **106**: 357-387.

Lamba, J. K., Y. S. Lin, E. G. Schuetz and K. E. Thummel (2002). "Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism." *Advanced drug delivery reviews* **54**: 1271-1294.

Langley, S. R., J. Dwyer, I. Drozdov, X. Yin and M. Mayr (2012). "Proteomics: from single molecules to biological pathways." *Cardiovascular research* **97**: 612-622.

Lawton, M., J. Cashman, T. Cresteil, C. Dolphin, A. Elfarra, R. Hines, E. Hodgson, T. Kimura, J. Ozols and I. Phillips (1994). "A nomenclature for the mammalian flavin-containing monooxygenase gene family based on amino acid sequence identities." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **308**: 254-257.

Le Conte, Y., C. Alaux, J. F. Martin, J. R. Harbo, J. W. Harris, C. Dantec, D. Séverac, S. Cros-Arteil and M. Navajas (2011). "Social immunity in honeybees (*Apis mellifera*): transcriptome analysis of varroa-hygienic behaviour." *Insect molecular biology* **20**: 399-408.

Le Conte, Y., M. Ellis and W. Ritter (2010). "Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?" *Apidologie* **41**: 353-363.

Lecker, S. H., V. Solomon, W. E. Mitch and A. L. Goldberg (1999). "Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." *The Journal of nutrition* **129**: 227S-237S.

Lee, S.-E., B.-S. Park and J.-J. Yoon (2010). "Proteomic Evaluation of Cellular Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to Formic Acid Stress." *Mycobiology* **38**: 302-309.

Li, B. and C. N. Dewey (2011). "RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome." *BMC bioinformatics* **12**: 323.

Li, J., B. G. Hansen, J. A. Ober, D. J. Kliebenstein and B. A. Halkier (2008). "Subclade of flavin-monooxygenases involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis." *Plant Physiology* **148**: 1721-1733.

Liesivuori, J., Savolainen and Heikki (1991). "Methanol and formic acid toxicity: biochemical mechanisms." *Pharmacology & toxicology* **69**: 157-163.

## Literaturverzeichnis

Liu, S., M. Hafeez, X. Zhang, F. U. Dawar, J. Guo, C. Gao and M. Wang (2017). "Isolation and functional identification of three cuticle protein genes during metamorphosis of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*." *Scientific reports* **7**: 1-8.

Lodesani, M., A. Pellacani, S. Bergomi, E. Carpana, T. Rabitti and P. Lasagni (1992). "Residue determination for some products used against *Varroa* infestation in bees." *Apidologie* **23**: 257-272.

Love, M. I., W. Huber and S. Anders (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome biology* **15**: 550.

Mahram, A. and M. C. Herbordt (2010). Fast and accurate NCBI BLASTP: acceleration with multiphase FPGA-based prefiltering. *Proceedings of the 24th ACM International Conference on Supercomputing, ACM*.

Malátková, P. and V. Wsol (2014). "Carbonyl reduction pathways in drug metabolism." *Drug metabolism reviews* **46**: 96-123.

Mao, W., S. G. Rupasinghe, R. M. Johnson, A. R. Zangerl, M. A. Schuler and M. R. Berenbaum (2009). "Quercetin-metabolizing CYP6AS enzymes of the pollinator *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **154**: 427-434.

Mao, W., M. A. Schuler and M. R. Berenbaum (2015). "Task-related differential expression of four cytochrome P450 genes in honeybee appendages." *Insect molecular biology* **24**: 582-588.

Maul, V., A. Klepsch and U. Assmann-Werthmüller (1988). "Das Bannwabenverfahren als Element imkerlicher Betriebsweise bei starkem Befall mit *Varroa jacobsoni* Oud." *Apidologie* **19**: 139-154.

Mayer, C. and I. Grummt (2006). "Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases." *Oncogene* **25**: 6384-6391.

McMartin, K., G. Martin-Amat, A. Makar and T. Tephly (1977). Methanol poisoning: role of formate metabolism in the monkey. *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, Elsevier*: 429-440.

Medina, R., S. S. Wing and A. L. Goldberg (1995). "Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy." *Biochemical Journal* **307**: 631-637.

Meixner, M. D. (2010). "A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them." *Journal of invertebrate pathology* **103**: S80-S95.

Mekhail, K., L. Rivero-Lopez, M. Khacho and S. Lee (2006). "Restriction of rRNA synthesis by VHL maintains energy equilibrium under hypoxia." *Cell Cycle* **5**: 2401-2413.

## Literaturverzeichnis

Metzker, M. L. (2010). "Sequencing technologies—the next generation." *Nature reviews genetics* **11**: 31.

Michaud, M. R., N. M. Teets, J. T. Peyton, B. M. Blobner and D. L. Denlinger (2011). "Heat shock response to hypoxia and its attenuation during recovery in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*." *Journal of insect physiology* **57**: 203-210.

Michener, C. D. (2000). *The bees of the world*, JHU press.

Mitton, G. A., N. Szawarski, F. M. Mitton, A. Iglesias, M. J. Eguaras, S. R. Ruffinengo and 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.

Mondet, F., M. Goodwin and A. Mercer (2011). "Age-related changes in the behavioural response of honeybees to Apiguard®, a thymol-based treatment used to control the mite *Varroa destructor*." *Journal of Comparative Physiology A* **197**: 1055.

Moreno-Domínguez, A., P. Ortega-Sáenz, L. Gao, O. Colinas, P. García-Flores, V. Bonilla-Henao, J. Aragonés, M. Hüttemann, L. I. Grossman and N. Weissmann (2020). "Acute O<sub>2</sub> sensing through HIF2 $\alpha$ -dependent expression of atypical cytochrome oxidase subunits in arterial chemoreceptors." *Science Signaling*.

Moritz, R. F., J. De Miranda, I. Fries, Y. Le Conte, P. Neumann and R. J. Paxton (2010). "Research strategies to improve honeybee health in Europe." *Apidologie* **41**: 227-242.

Moritz, R. F., F. B. Kraus, P. Kryger and R. M. Crewe (2007). "The size of wild honeybee populations (*Apis mellifera*) and its implications for the conservation of honeybees." *Journal of Insect Conservation* **11**: 391-397.

Mullin, C. A., M. Frazier, J. L. Frazier, S. Ashcraft, R. Simonds and J. S. Pettis (2010). "High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health." *PloS one* **5**: e9754.

Nanetti, A., R. Büchler, J.-P. Charriere, I. Fries, S. Helland, A. Imdorf, S. Korpela and P. Kristiansen (2003). "Oxalic acid treatments for varroa control."

Neymeyer, V. and T. Tephly (1994). "Detection and quantification of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (10-FTHFDH) in rat retina, optic nerve, and brain." *Life sciences* **54**: PL395-PL399.

Nicholls, P. (1975). "Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase." *Biochemical and biophysical research communications* **67**: 610-616.

Noker, P., J. Eells and T. Tephly (1980). "Methanol toxicity: treatment with folic acid and 5-formyl tetrahydrofolic acid." *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **4**: 378-383.

## Literaturverzeichnis

Norton, R. S. (2018). Peptide Toxin Structure and Function by NMR. Modern Magnetic Resonance. G. A. Webb. Cham, Springer International Publishing: 2081-2097.

Oldroyd, B. P. (1999). "Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees." *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 312-315.

Ostermann, D. J. and R. W. Currie (2004). "Effect of formic acid formulations on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies and influence of colony and ambient conditions on formic acid concentration in the hive." *Journal of Economic Entomology* **97**: 1500-1508.

Overby, L. H., A. R. Buckpitt, M. P. Lawton, E. Attaasafodjei, J. Schulze and R. M. Philpot (1995). "Characterization of Flavin-Containing Monooxygenase-5 (FMO5) Cloned from Human and Guinea-Pig: Evidence That the Unique Catalytic Properties of FMO5 Are Not Confined to the Rabbit Ortholog." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **317**: 275-284.

Padmanaban, A., R. Salowsky and C. Cher (2012). "RNA quality control using the Agilent 2200 TapeStation system—assessment of the RIN e quality metric." *Agilent technologies application notes*.

Padula, M., I. Berry, B. Raymond, J. Santos and S. P. Djordjevic (2017). "A comprehensive guide for performing sample preparation and top-down protein analysis." *Proteomes* **5**: 11.

Perkins, R., H. Fang, W. Tong and W. J. Welsh (2003). "Quantitative structure-activity relationship methods: Perspectives on drug discovery and toxicology." *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* **22**: 1666-1679.

Pestov, D. G., Ž. Strezoska and L. F. Lau (2001). "Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G1/S transition." *Molecular and cellular biology* **21**: 4246-4255.

Pohl, F. (2017). 1 x 1 des Imkers: Das Praxisbuch, Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Company KG, Stuttgart, ISBN: 978-3440149454.

Potts, S. G., S. P. Roberts, R. Dean, G. Marris, M. A. Brown, R. Jones, P. Neumann and J. Settele (2010). "Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe." *Journal of Apicultural Research* **49**: 15-22.

Quevillon, E., V. Silventoinen, S. Pillai, N. Harte, N. Mulder, R. Apweiler and R. Lopez (2005). "InterProScan: protein domains identifier." *Nucleic acids research* **33**: W116-W120.

Rademacher, E. (1990). Die Varroatose der Bienen—Geschichte, Diagnose. Berlin, Schelzky und Jeep, ISBN: 9783923024254.

Rademacher, E., M. Harz and S. Schneider (2017). "Effects of oxalic acid on *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)." *Insects* **8**: 84.



## Literaturverzeichnis

- Ramsden, D., D. Smith, R. Arenas, K. Frederick and M. A. Cerny (2018). "Identification and characterization of a selective human carbonyl reductase 1 substrate." *Drug Metabolism and Disposition* **46**: 1434-1440.
- Ramsey, S. D., R. Ochoa, G. Bauchan, C. Gulbranson, J. D. Mowery, A. Cohen, D. Lim, J. Joklik, J. M. Cicero and J. D. Ellis (2019). "Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**: 1792-1801.
- Reddi, A. S. (2019). *Acid-Base Disorders: Clinical Evaluation and Management*, Springer Nature, Berlin, ISBN: 978-3-030-28894-5.
- Richards, E., B. Jones and A. Bowman (2011). "Salivary secretions from the honeybee mite, *Varroa destructor*: effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization." *Parasitology* **138**: 602-608.
- Ritter, W., E. Leclercq and W. Koch (1984). "Observations des populations d'abeilles et de varroa dans les colonies a differents niveaux d'infestation." *Apidologie* **15**: 389-400.
- Rosenkranz, P., P. Aumeier and B. Ziegelmann (2010). "Biology and control of *Varroa destructor*." *Journal of invertebrate pathology* **103**: S96-S119.
- Ruttner, F., L. Tassencourt and J. Louveaux (1978). "Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L1 Material and methods." *Apidologie* **9**: 363-381.
- Sammataro, D., U. Gerson and G. Needham (2000). "Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact." *Annual review of entomology* **45**: 519-548.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proceedings of the national academy of sciences* **74**: 5463-5467.
- Satta, A., I. Floris, M. Eguaras, P. Cabras, V. L. Garau and M. Melis (2005). "Formic acid-based treatments for control of *Varroa destructor* in a Mediterranean area." *Journal of economic entomology* **98**: 267-273.
- Schaffer, W. M. and T. Bronnikova (2012). "Peroxidase-ROS interactions." *Nonlinear Dynamics* **68**: 413-430.
- Schmehl, D. R., P. E. Teal, J. L. Frazier and C. M. Grozinger (2014). "Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*)." *Journal of insect physiology* **71**: 177-190.
- Schmidt, S. R., C. R. Müller and W. Kress (1995). "Murine liver homogentisate 1, 2-dioxygenase: Purification to homogeneity and novel biochemical properties." *European journal of biochemistry* **228**: 425-430.

## Literaturverzeichnis

Schwanhäusser, B., D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen and M. Selbach (2011). "Global quantification of mammalian gene expression control." *Nature* **473**: 337.

Sehlmeyer, S., L. Wang, D. Langel, D. G. Heckel, H. Mohagheghi, G. Petschenka and D. Ober (2010). "Flavin-dependent monooxygenases as a detoxification mechanism in insects: new insights from the arctiids (Lepidoptera)." *PLoS One* **5**: e10435.

Shen, M., X. Yang, D. Cox-Foster and L. Cui (2005). "The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees." *Virology* **342**: 141-149.

Shi, W., J. Sun, B. Xu and H. Li (2013). "Molecular characterization and oxidative stress response of a cytochrome P450 gene (CYP4G11) from *Apis cerana cerana*." *Zeitschrift für Naturforschung C* **68**: 509-521.

Silva, D. R., S. J. Barigye, L. Santos-Garcia and E. Fontes Ferreira da Cunha (2019). "Molecular Modelling of Potential Candidates for the Treatment of Depression." *Molecular informatics* **38**: 1900024.

Słowińska, M., J. Nynca, B. Bąk, J. Wilde, M. Siuda and 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**: 632-656.

Smirle, M. J. and G. E. Robinson (1989). "Behavioral status and detoxifying enzyme activity are related in worker honey bees." *Journal of insect behavior* **2**: 285-289.

Sohal, R. S., R. J. Mockett and W. C. Orr (2002). "Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis." *Free Radical Biology and Medicine* **33**: 575-586.

Southwick, E. E. and L. Southwick Jr (1992). "Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States." *Journal of Economic Entomology* **85**: 621-633.

Souza, D. H., H. S. Selistre-de-Araujo and R. C. Garratt (2000). "Determination of the three-dimensional structure of toxins by protein crystallography." *Toxicon* **38**: 1307-1353.

Spreafico, M., F. R. Eördegh, I. Bernardinelli and M. Colombo (2001). "First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials." *Apidologie* **32**: 49-55.

Stokstad, E. (2007). "The case of the empty hives." *Science* **316**: 970-972.

Strachecka, A. J., J. Paleolog, G. Borsuk and K. Olszewski (2012). "The influence of formic acid on the body surface proteolytic system at different developmental stages in *Apis mellifera* L. workers." *Journal of Apicultural Research* **51**: 252-262.

## Literaturverzeichnis

Surlis, C., J. C. Carolan, M. F. Coffey and K. Kavanagh (2016). "Proteomic analysis of Bayvarol® resistance mechanisms in the honey bee parasite *Varroa destructor*." *Journal of Apicultural Research* **55**: 49-64.

Tanaka, K. (2009). "The proteasome: overview of structure and functions." *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **85**: 12-36.

Tantillo, G., M. Bottaro, A. Di Pinto, V. Martella, P. Di Pinto and V. Terio (2015). "Virus infections of honeybees *Apis Mellifera*." *Italian journal of food safety* **4**.

Tentcheva, D., L. Gauthier, N. Zappulla, B. Dainat, F. Cousserans, M. E. Colin and M. Bergoin (2004). "Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France." *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7185-7191.

Thompson, H. M. (2003). "Behavioural effects of pesticides in bees—their potential for use in risk assessment." *Ecotoxicology* **12**: 317-330.

Thompson, H. M., M. A. Brown, R. F. Ball and M. H. Bew (2002). "First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK." *Apidologie* **33**: 357-366.

Toledo-Arana, A. and C. Solano (2010). "Deciphering the physiological blueprint of a bacterial cell: revelations of unanticipated complexity in transcriptome and proteome." *Bioessays* **32**: 461-467.

Turi, Z., M. Lacey, M. Mistrik and P. Moudry (2019). "Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging." *Aging (Albany NY)* **11**: 2512.

Tyers, M. and M. Mann (2003). "From genomics to proteomics." *Nature* **422**: 193.

Underwood, R. M. and R. W. Currie (2003). "The effects of temperature and dose of formic acid on treatment efficacy against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), a parasite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)." *Experimental & Applied Acarology* **29**: 303.

Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe and F. Speleman (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome biology* **3**: research0034. 0031.

Velculescu, V. E., L. Zhang, W. Zhou, J. Vogelstein, M. A. Basrai, D. E. Bassett Jr, P. Hieter, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1997). "Characterization of the yeast transcriptome." *Cell* **88**: 243-251.

Wehling, M., W. Ohe and K. Ohe (2003). "Natural Content of Formic and Oxalic Acids in Honeys." *Apiacta* **38**: 257.

Wheeler, M. M. and G. E. Robinson (2014). "Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup." *Scientific reports* **4**: 5726.

## Literaturverzeichnis

Wilkins, M. R., C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J.-C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes and I. Humphery-Smith (1996). "From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis." *Bio/technology* **14**: 61.

Wilm, M. (2011). "Principles of electrospray ionization." *Molecular & cellular proteomics* **10**: M111. 009407.

Winnebeck, E. C., C. D. Millar and G. R. Warman (2010). "Why does insect RNA look degraded?" *Journal of Insect Science* **10**: 159.

Yang, X. and D. Cox-Foster (2007). "Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge." *Parasitology* **134**: 405-412.

Yeung, E. S. (2011). "Genome-wide correlation between mrna and protein in a single cell." *Angewandte Chemie International Edition* **50**: 583-585.

Zerin, T., J.-S. Kim, H.-W. Gil, H.-Y. Song and S.-Y. Hong (2015). "Effects of formaldehyde on mitochondrial dysfunction and apoptosis in SK-N-SH neuroblastoma cells." *Cell biology and toxicology* **31**: 261-272.

Zhang, W., C. Wenfeng, L. Zhenfeng, L. Ma, J. Yu, H. Wang, Z. Liu and B. Xu (2018). "Identification and characterisation of three new cytochrome P450 genes and the use of RNA interference to evaluate their roles in antioxidant defence in *Apis cerana cerana* Fabricius." *Frontiers in physiology* **9**: 1608.

Zhang, Y., B. R. Fonslow, B. Shan, M.-C. Baek and J. R. Yates III (2013). "Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics." *Chemical reviews* **113**: 2343-2394.

Zügel, U. and S. H. Kaufmann (1999). "Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases." *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 19-39.

## Anhang

### Anhang

Tabelle 25: Tabellarische Zusammenfassung der RNA-Qualitätsuntersuchungs-Ergebnisse mittels Qubit und Tape-Station.

Probe	Qubit		TapeStation	
	Nucleic Acid Conc. (ng/ µl)	Total Amount (ng)	RIN	DV 200
V1-0-BV-1	79,0	1185,4	6,7	75,8
V1-0-BV-2	76,9	1152,8	9,2	79,7
V1-0-BV-3	79,9	1198,5	9,0	75,4
V2-0-BV-1	72,3	1085,0	9,0	73,9
V2-0-BV-2	79,0	1184,7	9,1	75,4
V2-0-BV-3	80,4	1206,0	9,2	74,2
V3-0-BV-1	83,1	1245,9	9,9	85,1
V3-0-BV-2	73,2	1098,1	9,0	78,1
V3-0-BV-3	76,0	1139,9	9,9	84,7
V4-0-BV-1	67,3	1010,0	9,0	78,9
V4-0-BV-2	65,8	987,0	9,0	78,1
V4-0-BV-3	73,2	1098,4	9,0	78,5
V1-24-BV-1	74,2	1113,0	8,5	75,6
V1-24-BV-2	74,3	1114,1	9,1	76,2
V1-24-BV-3	75,4	1130,7	8,8	76,2
V2-24-BV-1	71,2	1068,6	9,4	80,8
V2-24-BV-2	73,7	1104,8	9,6	83,4
V2-24-BV-3	76,6	1148,5	9,5	80,8
V3-24-BV-1	119,5	1792,4	9,6	82,8
V3-24-BV-2	80,7	1209,8	9,2	81,2
V3-24-BV-3	84,9	1272,8	9,2	78,3
V4-24-BV-1	70,3	1055,2	10,0	85,4
V4-24-BV-2	76,2	1143,0	9,7	81,6
V4-24-BV-3	75,9	1138,5	9,5	81,2
V1-0-G-1	66,1	991,5	9,6	84,9
V1-0-G-2	67,0	1004,6	9,6	85,6
V1-0-G-3	77,2	1157,9	9,4	86,4
V2-0-G-1	77,3	1160,0	9,8	85,5
V2-0-G-2	80,4	1206,7	9,9	83,5
V2-0-G-3	73,4	1101,6	9,7	82,0
V3-0-G-1	72,9	1094,0	9,5	84,7
V3-0-G-2	76,0	1139,6	9,6	84,9
V3-0-G-3	72,5	1087,0	9,4	82,9
V4-0-G-1	69,0	1035,4	9,6	86,7
V4-0-G-2	69,1	1037,1	9,6	84,2
V4-0-G-3	71,4	1071,3	9,6	84,3
V1-24-G-1	77,2	1158,2	9,7	83,6

## Anhang

V1-24-G-2	79,7	1196,1	9,8	83,5
V1-24-G-3	83,6	1253,9	9,8	84,7
V2-24-G-1	74,0	1109,4	9,9	84,8
V2-24-G-2	73,9	1108,9	9,5	84,2
V2-24-G-3	87,2	1308,4	9,5	85,5
V3-24-G-1	69,5	1042,1	9,6	83,7
V3-24-G-2	71,4	1071,0	9,3	84,0
V3-24-G-3	73,2	1097,3	9,5	83,2
V4-24-G-1	71,1	1066,4	9,6	83,2
V4-24-G-2	68,3	1024,6	9,5	85,2
V4-24-G-3	76,2	1142,9	9,8	84,0
M-0-1	58,6	878,6	9,5	76,3
M-0-2	61,8	926,6	9,0	73,7
M-0-3	62,0	929,9	7,6	67,6
M-24-1	59,8	897,4	9,1	77,9
M-24-2	63,2	947,7	8,9	79,0
M-24-3	60,0	899,4	8,6	84,1

*Tabelle 26: Differentiell exprimierte Gene der 1TA.*

### Induzierte Transkripte

ID	RefSeq Symbol	Beschreibung
GB51383	LOC550965	probable Cytochrom P450 6a14
GB40836	LOC100576126	uncharacterized LOC100576126
GB41097	LOC724565	trypsin-7
GB41306	LOC551369	actin, clone 205-like
GB42514		
GB43892	LOC551401	cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase
GB46197	LOC726277	anaphase-promoting complex subunit CDC26-like
GB50989		
GB51146	LOC102655756	PDZ and LIM domain protein 7-like
GB51218	LOC107964586	uncharacterized LOC107964586
GB54099		

### Reprimierte Transkripte

ID	RefSeq Symbol	Beschreibung
GB47752	LOC727290	probable Cytochrom P450 303a1
GB40053	LOC413550	neuropeptide CCHamide-2 receptor-like
GB40123	LOC726599	angiotensin-converting enzyme-like
GB40167	LOC409963	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase
GB40541	LOC409089	vesicular inhibitory amino acid transporter
GB40610	LOC100578276	uncharacterized LOC100578276
GB42737	LOC724395	mucin-3A-like
GB43585	LOC102656613	uncharacterized LOC102656613
GB44545	LOC107964461	uncharacterized LOC107964461

## Anhang

GB46900	LOC726857	MORN repeat-containing protein 3-like
GB47092	LOC724483	coiled-coil domain-containing protein 65-like
GB47494		
GB48006	LOC724803	membrane metallo-endopeptidase-like 1
GB48383	LOC107965117	uncharacterized LOC107965117
GB48447	LOC100576223	myb-like protein X
GB48938	LOC413574	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2-like
GB48972	LOC410739	teneurin-m
GB50363	LOC100576540	vacuolar protein sorting-associated protein 27-like
GB51407		
GB51475	LOC102656217	mucin-3A-like
GB51671	LOC411290	uncharacterized LOC411290
GB53073	LOC102654965	uncharacterized LOC102654965
GB53871		
GB54124	LOC100578862	dynein assembly factor 1, axonemal homolog

*Tabelle 27: Differentiell exprimierte Gene der FVB.*

### Induzierte Transkripte

ID	RefSeq Symbol	Beschreibung
GB49626	LOC100577883	Cytochrom P450 4aa1-like
GB40609	LOC102655710	proline-rich extensin-like protein EPR1
GB40842	LOC100576547	glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like
GB40945	LOC552636	dipeptidase 1
GB40997	LOC411021	UDP-glucuronosyltransferase 2B18
GB41188	LOC724865	ABC transporter G family member 20-like
GB42540	LOC100576841	uncharacterized LOC100576841
GB42553	LOC100577098	enolase-phosphatase E1
GB42556	LOC100577380	protein takeout-like
GB42557	LOC100577380	protein takeout-like
GB42582	LOC100579047	cuticular protein 10
GB42594	LOC100578664	organic solute transporter alpha-like protein
GB42598	LOC100578625	tetra-peptide repeat homeobox protein 1-like
GB42792	LOC409805	uncharacterized LOC409805
GB42795	LOC100577064	uncharacterized LOC100577064
GB42800	LOC727028	uncharacterized LOC727028
GB43098	LOC410272	cationic amino acid transporter 2
GB43298	LOC725019	loricrin-like
GB43579	LOC102653655	mucin-19-like
GB43738	PPO	phenoloxidase subunit A3
GB44064	LOC725703	uncharacterized LOC725703
GB44145	LOC409789	uncharacterized peptidase C1-like protein F26E4.3
GB44146	LOC409789	uncharacterized peptidase C1-like protein F26E4.3
GB44560	LOC725148	uncharacterized LOC725148
GB45654	LOC410096	gamma-glutamyltranspeptidase 1-like

## Anhang

GB45973	LOC410638	aromatic-L-amino-acid decarboxylase
GB46277	LOC409277	acidic phospholipase A2 PA4
GB46310	CPR17	cuticular protein 17
GB48123	LOC102654335	uncharacterized LOC102654335
GB48492	JHBP-1	take-out-like carrier protein
GB48981	LOC726451	cuticle protein 7
GB49287	LOC725283	uncharacterized LOC725283
GB49401	LOC725783	protein msta-like
GB49578	LOC552078	glutamyl aminopeptidase-like
GB49616	LOC102656714	chitotriosidase-1-like
GB50206	LOC100578286	flavin-containing monooxygenase FMO GS-OX-like 2
GB50439	LOC725547	cell division protein ZipA
GB50449	LOC100578672	uncharacterized LOC100578672
GB50509	LOC410621	multiple epidermal growth factor-like domains protein 10
GB50526	LOC410626	sodium-coupled monocarboxylate transporter 1
GB51772	LOC102654436	uncharacterized LOC102654436
GB51834	LOC725420	sodium-dependent nutrient amino acid transporter 1-like
GB51845	LOC102654427	sodium-dependent nutrient amino acid transporter 1-like
GB51989	LOC107963967	serine protease inhibitor 3-like
GB52047	LOC102654959	myb-like protein Q
GB52161	CPR28	cuticular protein 28
GB52656	LOC552154	uncharacterized LOC552154
GB52756	LOC408474	apyrase
GB52810	LOC724293	yellow-x1
GB52820	LOC726953	secretin receptor-like
GB52854	LOC413679	cuticular protein analogous to peritrophins 3-E
GB53319	LOC100576504	uncharacterized LOC100576504
GB53925	LOC724993	uncharacterized LOC724993
GB54396	LOC724552	elongation of very long chain fatty acids protein AAEL008004-like
GB54988	LOC102655961	uncharacterized LOC102655961
GB55268	LOC409238	43 kDa receptor-associated protein of the synapse homolog
GB55355	LOC552124	CD151 antigen
GB55613	LOC100576118	uncharacterized LOC100576118
GB55894	LOC725916	uncharacterized LOC725916

### Variabel regulierte Transkripte

ID	RefSeq Symbol	Beschreibung
GB40157	LOC408421	uncharacterized LOC408421
GB40393	LOC102656154	uncharacterized LOC102656154
GB42639	LOC107963974	uncharacterized LOC107963974
GB44996	Hex110	hexamerin 110
GB45120	LOC410324	villin-like protein quail
GB45188	LOC552689	estradiol 17-beta-dehydrogenase 11
GB45764	LOC413205	tropomyosin-2-like
GB46077	LOC107963964	uncharacterized LOC107963964



## Anhang

GB46629	LOC100577537	uncharacterized LOC100577537
GB47505	LOC725344	histone H2B-like
GB49392	LOC410370	actin-binding Rho-activating protein-like
GB49580	LOC100577614	uncharacterized LOC100577614
GB53209		
GB54124	LOC100578862	dynein assembly factor 1, axonemal homolog
GB54945	LOC107966060	uncharacterized LOC107966060

*Tabelle 28: Differentiell exprimierte Gene der VM.*

### Induzierte Transkripte

ID	Beschreibung
XM_022787822.1	CREB-binding protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Crebbp PE=1 SV=3
XM_022788480.1	Fatty acyl- reductase 1 OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=far1 PE=2 SV=1
XM_022788603.1	Extended synaptotagmin-2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Esy2 PE=1 SV=1
XM_022788618.1	Extended synaptotagmin-2-A OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=esy2-a PE=2 SV=1
XM_022788646.1	Proton-coupled amino acid transporter 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC36A1 PE=1 SV=1
XM_022788648.1	P protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OCA2 PE=1 SV=2
XM_022789197.1	CUGBP Elav-like family member 2 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=celf2 PE=2 SV=1
XM_022789501.1	RNA exonuclease 1 homolog OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rexo1 PE=1 SV=1
XM_022789560.1	Mucolipin-3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mcoln3 PE=1 SV=1
XM_022789607.1	Proclotting enzyme OS=Tachypleus tridentatus OX=6853 PE=1 SV=1
XM_022789835.1	Echinoderm microtubule-associated 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EML1 PE=1 SV=3
XM_022790115.1	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PNPLA2 PE=1 SV=1
XM_022790187.1	Engulfment and cell motility protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ELMO1 PE=1 SV=2
XM_022790331.1	Transcription factor AP-2-beta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tfap2b PE=1 SV=2
XM_022790418.1	Engulfment and cell motility protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ELMO1 PE=1 SV=2
XM_022790467.1	MCES_MACF cap guanine-N7 methyltransferase OS=Macaca fascicularis OX=9541 GN=RNMT PE=2 SV=1
XM_022790548.1	Homeobox-containing protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hmbox1 PE=1 SV=1
XM_022790906.1	---NA---
XM_022790912.1	Alpha-galactosidase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLA PE=1 SV=1
XM_022791023.1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 T OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBE2T PE=1 SV=1
XM_022791151.1	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Gallus gallus OX=9031 GN=ATIC PE=1 SV=1

## Anhang

XM_022792703.1	Zinc finger protein 318 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Znf318 PE=1 SV=3
XM_022793166.1	---NA---
XM_022793281.1	Puromycin-sensitive aminopeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPEPPS PE=1 SV=2
XM_022793709.1	Histone H3 OS=Euplotes crassus OX=5936 PE=3 SV=3
XM_022793946.1	Ecdysone 20-monooxygenase OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=shd PE=1 SV=3
XM_022794088.1	Afadin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Afdn PE=1 SV=3
XM_022794111.1	Protein YAE1 OS=Coccidioides immitis (strain RS) OX=246410 GN=YAE1 PE=3 SV=1
XM_022794454.1	La-related protein 6 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Larp6 PE=1 SV=1
XM_022794950.1	Gamma-butyrobetaine dioxygenase OS=Pseudomonas (strain AK-1) OX=29440 PE=1 SV=1
XM_022795078.1	GTP-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GTPBP2 PE=1 SV=1
XM_022795163.1	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Flrt3 PE=1 SV=1
XM_022795236.1	Plexin-A4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLXNA4 PE=1 SV=4
XM_022795361.1	Proclotting enzyme OS=Tachyplesus tridentatus OX=6853 PE=1 SV=1
XM_022795726.1	Protein still isoform SIF type 1 OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=sif PE=2 SV=2
XM_022796425.1	Down syndrome cell adhesion molecule homolog OS=Gallus gallus OX=9031 GN=DSCAM PE=1 SV=3
XM_022796571.1	BTB POZ domain-containing protein KCTD20 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KCTD20 PE=1 SV=1
XM_022796600.1	---NA---
XM_022797398.1	N-terminal Xaa-Pro-Lys N-methyltransferase 1 OS=Danio rerio OX=7955 GN=ntmt1 PE=2 SV=1
XM_022797471.1	Branched-chain-amino-acid cytosolic OS=Ovis aries OX=9940 GN=BCAT1 PE=2 SV=1
XM_022797472.1	Branched-chain-amino-acid cytosolic OS=Ovis aries OX=9940 GN=BCAT1 PE=2 SV=1
XM_022797474.1	Branched-chain-amino-acid cytosolic OS=Ovis aries OX=9940 GN=BCAT1 PE=2 SV=1
XM_022797518.1	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atp6v0a1 PE=1 SV=3
XM_022797926.1	FMO5_RATDimethylaniline monooxygenase
XM_022797929.1	FMO5_RATDimethylaniline monooxygenase
XM_022798193.1	Acetyl- acetyltransferase mitochondrial OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=acat1-b PE=2 SV=1
XM_022798397.1	Nose resistant to fluoxetine protein 6 OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=nrf-6 PE=1 SV=3
XM_022798402.1	Nose resistant to fluoxetine protein 6 OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=nrf-6 PE=1 SV=3
XM_022798467.1	Homeobox protein six1b OS=Danio rerio OX=7955 GN=six1b PE=1 SV=1
XM_022798710.1	ZC21C_RATZinc finger C2HC domain-containing protein 1C OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Zc2hc1c PE=2 SV=1
XM_022798844.1	Serine threonine-protein kinase WNK3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Wnk3 PE=1 SV=3

## Anhang

XM_022799066.1	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 6 OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSD17B6 PE=2 SV=1
XM_022799397.1	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme OS=Mesocricetus auratus OX=10036 GN=AMD1 PE=2 SV=1
XM_022799576.1	Cytochrom P450 3A56 OS=Fundulus heteroclitus OX=8078 GN=cyp3a56 PE=2 SV=1
XM_022799815.1	Unconventional myosin-VIIa OS=Mus musculus OX=10090 GN=Myo7a PE=1 SV=2
XM_022799996.1	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Glpr2 PE=1 SV=3
XM_022800563.1	Fibulin-1 OS=Gallus gallus OX=9031 GN=FBLN1 PE=2 SV=2
XM_022800630.1	Post-GPI attachment to proteins factor 2-like OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=CG7990 PE=2 SV=4
XM_022800736.1	TBC1 domain family member 22B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TBC1D22B PE=1 SV=3
XM_022801022.1	---NA---
XM_022802218.1	---NA---
XM_022802315.1	DDB1- and CUL4-associated factor 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCAF4 PE=1 SV=3
XM_022802327.1	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase OS=Bos taurus OX=9913 GN=ACP1 PE=1 SV=3
XM_022802364.1	RNA-dependent RNA polymerase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RDR1 PE=2 SV=1
XM_022802403.1	---NA---
XM_022802911.1	---NA---
XM_022803720.1	Mid1-interacting protein 1-B OS=Danio rerio OX=7955 GN=mid1ip1b PE=2 SV=1
XM_022803739.1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cdkn1a PE=1 SV=4
XM_022804329.1	and PH domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FGD4 PE=1 SV=2
XM_022804398.1	---NA---
XM_022804485.1	Snake venom vascular endothelial growth factor toxin barietin OS=Bitis arietans OX=8692 PE=1 SV=1
XM_022804751.1	Glucose-6-phosphatase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G6PC2 PE=1 SV=1
XM_022805347.1	Iporin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rusc2 PE=1 SV=2
XM_022805572.1	---NA---
XM_022806799.1	---NA---
XM_022806931.1	---NA---
XM_022807030.1	Zinc finger protein 64 isoforms 1 and 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZFP64 PE=1 SV=3
XM_022807033.1	Sodium channel protein para OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=para PE=2 SV=3
XM_022807064.1	Divergent protein kinase domain 1A OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=dipk1a PE=2 SV=1
XM_022807443.1	Isobutyryl- mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acad8 PE=1 SV=2
XM_022807521.1	Coronin-B OS=Dictyostelium discoideum OX=44689 GN=corB PE=1 SV=1
XM_022808320.1	Beta-hexosaminidase subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HEXB PE=1 SV=3

## Anhang

XM_022808326.1	Serine proteinase stubble OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Sb PE=2 SV=2
XM_022808514.1	Glutamate-gated chloride channel OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=lalpha PE=1 SV=2
XM_022809307.1	Endoribonuclease dcr-1 OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=dcr-1 PE=1 SV=3
XM_022810045.1	Sodium hydrogen exchanger 7 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=NHX7 PE=1 SV=1
XM_022810098.1	Zinc transporter 9 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc30a9 PE=1 SV=2
XM_022810442.1	Protein kibra OS=Drosophila erecta OX=7220 GN=Kibra PE=3 SV=1
XM_022810721.1	Acetylcholine receptor subunit alpha-like 1 OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=nA alpha1 PE=2 SV=2
XM_022810931.1	Poly -specific ribonuclease PARN OS=Danio rerio OX=7955 GN=parn PE=1 SV=2
XM_022811161.1	Folylpolyglutamate mitochondrial OS=Cricetulus griseus OX=10029 GN=FPGS PE=2 SV=1
XM_022811461.1	GTR1_PIGSolute carrier family facilitated glucose transporter member 1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=SLC2A1 PE=2 SV=2
XM_022811462.1	GTR1_PIGSolute carrier family facilitated glucose transporter member 1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=SLC2A1 PE=2 SV=2
XM_022811513.1	Carboxypeptidase Q OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=cpq PE=2 SV=1
XM_022811796.1	Ankyrin-2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ank2 PE=1 SV=2
XM_022811834.1	Transmembrane protein 47 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tmem47 PE=1 SV=1
XM_022812431.1	Transducin-like enhancer protein 3-B OS=Danio rerio OX=7955 GN=tle3b PE=1 SV=2
XM_022812644.1	Vesicle-associated membrane protein synaptobrevin-binding protein OS=Aplysia californica OX=6500 PE=2 SV=1
XM_022812678.1	Myophilin OS=Echinococcus granulosus OX=6210 PE=2 SV=1
XM_022812843.1	Solute carrier family 41 member 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc41a1 PE=2 SV=1
XM_022812845.1	ADAT1_DROM -specific adenosine deaminase 1 OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Adat1 PE=1 SV=1
XM_022813267.1	Protein Mpv17 OS=Danio rerio OX=7955 GN=mpv17 PE=2 SV=1
XM_022813445.1	Lysozyme C OS=Colobus guereza OX=33548 GN=LYZ PE=2 SV=1
XM_022813585.1	Inositol oxygenase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Miox PE=1 SV=2
XM_022813927.1	Huntingtin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HTT PE=1 SV=2
XM_022814148.1	NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1 OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=ndor1 PE=2 SV=1
XM_022814400.1	Protein jagged-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=JAG1 PE=1 SV=3
XM_022815357.1	Ribonuclease 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DROSHA PE=1 SV=2
XM_022815900.1	PDE1C_RATCalcium calmodulin-dependent 3 -cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Pde1c PE=1 SV=1
XM_022816034.1	---NA---
XM_022816223.1	Zinc transporter ZIP1 OS=Danio rerio OX=7955 GN=slc39a1 PE=2 SV=1
XM_022816236.1	Intraflagellar transport protein 46 homolog OS=Danio rerio OX=7955 GN=ift46 PE=2 SV=2

## Anhang

XM_022816508.1	Sphingomyelin phosphodiesterase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMPD1 PE=1 SV=5
XM_022816682.1	---NA---
XM_022817063.1	Pleckstrin homology-like domain family B member 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Phldb2 PE=1 SV=2
XM_022817132.1	TM11L_RATTransmembrane protease serine 11B-like protein OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Tmprss11b1 PE=2 SV=1
XM_022817207.1	Sialin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC17A5 PE=1 SV=2
XM_022817573.1	---NA---
XM_022817699.1	4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Oryctolagus cuniculus OX=9986 GN=SLC3A2 PE=1 SV=2

### Reprimierte Transkripte

ID	Beschreibung
XM_022788580.1	Vam6 Vps39-like protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Vps39 PE=1 SV=1
XM_022789391.1	Acyl- :lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lpgat1 PE=1 SV=1
XM_022789492.1	MFS4B_RATsodium-dependent glucose transporter 1 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Mfsd4b PE=1 SV=1
XM_022789737.1	---NA---
XM_022789757.1	BDH_RATD-beta-hydroxybutyrate mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Bdh1 PE=1 SV=2
XM_022789968.1	EAA2_RATExcitatory amino acid transporter 2 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Slc1a2 PE=1 SV=2
XM_022790074.1	KAPC1_DROM -dependent protein kinase catalytic subunit 1 OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Pka-C1 PE=1 SV=3
XM_022790077.1	KAPC1_DROM -dependent protein kinase catalytic subunit 1 OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Pka-C1 PE=1 SV=3
XM_022790191.1	Patched domain-containing protein 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ptchd3 PE=1 SV=1
XM_022790349.1	Hormone-sensitive lipase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lipe PE=1 SV=2
XM_022790435.1	DNA-binding protein P3A2 OS=Strongylocentrotus purpuratus OX=7668 PE=1 SV=1
XM_022790495.1	DNA excision repair protein ERCC-6-like OS=Danio rerio OX=7955 GN=ercc6l PE=1 SV=1
XM_022790528.1	RNA-binding protein Rsf1 OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Rsf1 PE=1 SV=1
XM_022790821.1	Purine nucleoside phosphorylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PNP PE=1 SV=2
XM_022790947.1	NADH dehydrogenase
XM_022790955.1	Actin-binding protein IPP OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ipp PE=2 SV=3
XM_022791616.1	E3 ubiquitin-protein ligase RNF19A OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rnf19a PE=1 SV=2
XM_022791831.1	Splicing factor 3B subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B1 PE=1 SV=3
XM_022791891.1	Helicase ARIP4 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=rad54l2 PE=2 SV=1
XM_022792531.1	Thyroid transcription factor 1 OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=TITF1 PE=2 SV=1

## Anhang

XM_022792747.1	NINJ2_RATNinjurin-2 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Ninj2 PE=2 SV=1
XM_022793023.1	---NA---
XM_022793090.1	PDZ and LIM domain protein Zasp OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Zasp52 PE=1 SV=2
XM_022793987.1	---NA---
XM_022795612.1	Cell division cycle protein 27 homolog OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cdc27 PE=1 SV=1
XM_022796155.1	Thyrotropin receptor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSHR PE=1 SV=2
XM_022796249.1	---NA---
XM_022796698.1	ATP synthase subunit mitochondrial OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN= PE=3 SV=1
XM_022796905.1	Required for meiotic nuclear division protein 1 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RMND1 PE=1 SV=2
XM_022797020.1	PPID_RHIO9Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D OS=Rhizopus delemar (strain RA 99-880 ATCC MYA-4621 FGSC 9543 NRRL 43880) OX=246409 GN=cyp12 PE=3 SV=1
XM_022797071.1	phosphoenolpyruvate synthase OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=pps PE=3 SV=1
XM_022797397.1	N-terminal Xaa-Pro-Lys N-methyltransferase 1 OS=Danio rerio OX=7955 GN=ntmt1 PE=2 SV=1
XM_022797522.1	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atp6v0a1 PE=1 SV=3
XM_022798112.1	Dual serine threonine and tyrosine protein kinase OS=Tetraodon nigroviridis OX=99883 GN=dstyk PE=2 SV=1
XM_022798303.1	N6-adenosine-methyltransferase catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=METTL3 PE=1 SV=2
XM_022798823.1	Intersectin-1 OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=itsn1 PE=1 SV=2
XM_022798925.1	Protein RCC2 homolog OS=Danio rerio OX=7955 GN=rcc2 PE=2 SV=1
XM_022799441.1	Ribosome biogenesis regulatory protein homolog OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rrs1 PE=1 SV=1
XM_022799831.1	UDP-galactose transporter senju OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=senju PE=1 SV=2
XM_022800174.1	Monocarboxylate transporter 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC16A5 PE=2 SV=1
XM_022802350.1	NFX1-type zinc finger-containing protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Znfx1 PE=1 SV=3
XM_022802395.1	Protein unc-79 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UNC79 PE=2 SV=4
XM_022802661.1	Probable glutamine--tRNA ligase OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Aats-gln PE=2 SV=1
XM_022802685.1	Neurocalcin homolog OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Nca PE=1 SV=2
XM_022802687.1	Neurocalcin homolog OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Nca PE=1 SV=2
XM_022803071.1	Membrane-associated protein Hem OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Hem PE=2 SV=1
XM_022804262.1	Protein ECT2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ect2 PE=1 SV=2
XM_022804569.1	Ran-binding protein 3 OS=Pongo abelii OX=9601 GN=RANBP3 PE=2 SV=1
XM_022804657.1	High affinity cAMP-specific 3 -cyclic phosphodiesterase 7A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDE7A PE=1 SV=2

## Anhang

XM_022805204.1	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha OS=Pongo abelii OX=9601 GN=PIK3C2A PE=2 SV=1
XM_022805465.1	Rab proteins geranylgeranyltransferase component A OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Rep PE=1 SV=1
XM_022805499.1	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POLR3A PE=1 SV=2
XM_022806623.1	---NA---
XM_022806674.1	Protein capicua homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CIC PE=1 SV=2
XM_022806690.1	Chitotriosidase-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHIT1 PE=1 SV=1
XM_022807162.1	Hexosaminidase D OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hexd PE=1 SV=1
XM_022807710.1	---NA---
XM_022807949.1	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CACNB2 PE=1 SV=3
XM_022808130.1	Glutaredoxin-related protein mitochondrial OS=Danio rerio OX=7955 GN=glrx5 PE=2 SV=1
XM_022808601.1	5 -AMP-activated protein kinase subunit beta-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PRKAB1 PE=2 SV=3
XM_022808671.1	Degenerin-like protein unc-105 OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=unc-105 PE=1 SV=3
XM_022809849.1	E2AK3_RATEukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Eif2ak3 PE=1 SV=1
XM_022809894.1	UPF0472 protein C16orf72 homolog OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN= PE=2 SV=1
XM_022810212.1	GTP-binding protein Rheb OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RHEB PE=1 SV=1
XM_022810286.1	Ran-binding protein 9 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ranbp9 PE=1 SV=1
XM_022810335.1	Lysosomal-trafficking regulator OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lyst PE=1 SV=1
XM_022810464.1	Homeotic protein Sex combs reduced OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=Scr PE=1 SV=5
XM_022810950.1	Kelch-like protein 36 OS=Bos taurus OX=9913 GN=KLHL36 PE=2 SV=1
XM_022811354.1	Lissencephaly-1 homolog OS=Ixodes scapularis OX=6945 GN=ISCW007420 PE=3 SV=2
XM_022812181.1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 OS=Bos taurus OX=9913 GN=IRAK4 PE=2 SV=1
XM_022812248.1	Pleckstrin homology domain-containing family H member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEKHH1 PE=2 SV=2
XM_022812337.1	Polyhomeotic-like protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Phc2 PE=1 SV=1
XM_022812471.1	Serine palmitoyltransferase 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sptlc2 PE=1 SV=2
XM_022812598.1	Gamma-secretase subunit pen-2 OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=pen-2 PE=1 SV=3
XM_022812965.1	GTP-binding protein 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=GTPBP1 PE=2 SV=2
XM_022813269.1	Protein Mpv17 OS=Danio rerio OX=7955 GN=mpv17 PE=2 SV=1
XM_022813389.1	Pecanex-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCNX1 PE=1 SV=2
XM_022813464.1	Zinc finger protein ush OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=ush PE=1 SV=2

## Anhang

XM_022813719.1	Thymidylate kinase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ZEU1 PE=2 SV=1
XM_022814033.1	---NA---
XM_022814435.1	Methionine aminopeptidase 1 OS=Danio rerio OX=7955 GN=metap1 PE=2 SV=2
XM_022814473.1	Casein kinase I isoform alpha OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=csnk1a1 PE=1 SV=1
XM_022814840.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=HDHD2 PE=2 SV=1
XM_022814975.1	Zinc finger protein 596 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF596 PE=2 SV=2
XM_022816245.1	---NA---
XM_022816516.1	Zinc finger protein 629 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Znf629 PE=2 SV=2
XM_022816864.1	NSFL1 cofactor p47 OS=Pongo abelii OX=9601 GN=NSFL1C PE=2 SV=1
XM_022817068.1	SNW domain-containing protein 1 OS=Pongo abelii OX=9601 GN=SNW1 PE=2 SV=1
XM_022817429.1	Plipastatin synthase subunit D OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=ppsD PE=1 SV=2

*Tabelle 29: Übersicht aller differentiell exprimierter Milben-Proteine.*

ID	Fold-change	p	Beschreibung
XP_022662741.1	0,60	0,03	LETM1 domain-containing protein 1-like
XP_022649886.1	0,60	0,03	protein lunapark-B-like isoform X1
XP_022661692.1	0,61	0,05	leukocyte elastase inhibitor-like
XP_022670068.1	0,63	0,04	COP9 signalosome complex subunit 2-like
XP_022656378.1	0,64	0,04	importin subunit alpha-7-like
XP_022661693.1	0,65	0,02	ovalbumin-related protein X-like
XP_022669247.1	0,66	0,02	uncharacterized protein LOC111253709
XP_022643858.1	0,68	0,05	palmitoyl-protein thioesterase 1-like
XP_022643904.1	0,69	0,03	store-operated calcium entry-associated regulatory factor-like isoform X1
XP_022672161.1	0,70	0,02	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm1
XP_022645818.1	0,70	0,03	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-like
XP_022660285.1	0,72	0,05	trafficking protein particle complex subunit 3-like isoform X1
XP_022646767.1	0,73	0,04	uncharacterized protein LOC111244180 isoform X1
XP_022672765.1	0,76	0,02	1,5-anhydro-D-fructose reductase-like isoform X1



## Anhang

XP_022662313.1	0,77	0,00	phosphofurin acidic cluster sorting protein 2-like isoform X1
XP_022662805.1	0,77	0,04	carbonyl reductase [NADPH] 1-like
XP_022652666.1	0,77	0,01	glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like
XP_022656929.1	0,77	0,01	sarcosine dehydrogenase, mitochondrial-like isoform X3
XP_022646263.1	0,77	0,01	RNA-binding protein Rsf1-like
XP_022667482.1	0,81	0,03	26S proteasome regulatory subunit 8 isoform X1
XP_022652658.1	0,82	0,04	SH3 domain-binding glutamic acid-rich protein homolog isoform X1
XP_022667854.1	0,83	0,00	serine/arginine-rich splicing factor 1-like isoform X2
XP_022650841.1	0,83	0,00	leukocyte elastase inhibitor-like isoform X1
XP_022663720.1	0,84	0,05	delta-aminolevulinic acid dehydratase-like isoform X4
XP_022670350.1	0,84	0,05	eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 isoform X1
XP_022643399.1	0,86	0,02	disks large homolog 1-like isoform X1
XP_022645555.1	0,87	0,01	transmembrane protease serine 9-like
XP_022672122.1	0,87	0,01	proteasome subunit alpha type-7-like
XP_022649728.1	0,87	0,03	homogentisate 1,2-dioxygenase-like
XP_022646811.1	0,90	0,04	proteasome subunit alpha type-2-like
XP_022655212.1	0,90	0,03	uncharacterized protein LOC111247927 isoform X1
XP_022656771.1	0,90	0,04	uncharacterized protein LOC111248552
XP_022672923.1	0,90	0,04	splicing factor U2AF 50 kDa subunit-like
XP_022657098.1	0,93	0,02	short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial-like
XP_022657447.1	0,94	0,05	ELAV-like protein 1
XP_022649780.1	0,94	0,03	aladin-like
XP_022649081.1	0,95	0,05	gamma-taxilin-like isoform X1
XP_022651110.1	0,97	0,02	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog, mitochondrial-like
XP_022657060.1	0,99	0,05	39S ribosomal protein L46, mitochondrial-like
XP_022653082.1	1,00	0,05	actin-related protein 2/3 complex subunit 2-like isoform X1
XP_022657397.1	1,00	0,01	ras-related protein Rab-14-like
XP_022654261.1	1,00	0,01	protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase-like isoform X1

## Anhang

XP_022657123.1	1,01	0,05	39S ribosomal protein L15, mitochondrial-like isoform X1
XP_022672301.1	1,01	0,04	dual specificity protein phosphatase 3-like isoform X1
XP_022669216.1	1,02	0,01	protein-lysine methyltransferase METTL21D-like
XP_022662509.1	1,05	0,04	immunoglobulin-binding protein 1b-like
XP_022658493.1	1,06	0,02	uncharacterized protein LOC111249200 isoform X1
XP_022669895.1	1,07	0,03	elongation factor-like GTPase 1 isoform X1
XP_022657753.1	1,11	0,05	vitellogenin-3-like
XP_022657153.1	1,12	0,01	diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 3-alpha-like isoform X1
XP_022666467.1	1,14	0,04	uncharacterized protein LOC111252579 isoform X2
XP_022650016.1	1,16	0,02	uncharacterized protein LOC111245657 isoform X1
XP_022643449.1	1,16	0,05	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase-like isoform X1
XP_022668567.1	1,19	0,01	uridine-cytidine kinase 2-B-like isoform X1
XP_022660127.1	1,22	0,03	histidine triad nucleotide-binding protein 3-like
XP_022654402.1	1,23	0,04	protein canopy 4-like
XP_022658327.1	1,24	0,05	N-acetylgalactosamine kinase-like isoform X1
XP_022650038.1	1,25	0,01	nuclear receptor-binding protein-like isoform X1
XP_022665584.1	1,29	0,02	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3-like isoform X1
XP_022660835.1	1,30	0,05	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H-like
XP_022666496.1	1,37	0,00	lysine--tRNA ligase-like
XP_022671624.1	1,38	0,03	transmembrane protein 62-like
XP_022668104.1	1,41	0,04	GDP-L-fucose synthase-like
XP_022664578.1	1,41	0,05	tetratricopeptide repeat protein 1-like isoform X1
XP_022647036.1	1,42	0,05	vesicle-trafficking protein SEC22b-B-like
XP_022665998.1	1,46	0,05	E3 ubiquitin-protein ligase RNF126-like
XP_022660963.1	1,49	0,00	integrin alpha-PS1-like isoform X1
XP_022668708.1	1,53	0,04	28S ribosomal protein S5, mitochondrial-like isoform X1
XP_022665344.1	1,55	0,00	phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha-like isoform X1
XP_022665961.1	1,58	0,05	striatin-interacting protein 1 homolog isoform X1
XP_022670740.1	1,65	0,05	uncharacterized protein LOC111254308

## Anhang

XP_022671439.1	1,66	0,04	transport and Golgi organization protein 2 homolog isoform X1
XP_022657475.1	1,69	0,02	small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B-like isoform X1
XP_022646008.1	1,71	0,01	uncharacterized protein LOC111243925 isoform X1
XP_022666617.1	1,71	0,05	ribosomal protein S6 kinase beta-1-like isoform X1
XP_022659092.1	1,74	0,03	uncharacterized protein LOC111249466
XP_022647764.1	1,78	0,05	farnesyl pyrophosphate synthase-like isoform X1
XP_022670575.1	1,84	0,04	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2
XP_022659202.1	2,12	0,01	peroxidase-like isoform X1
XP_022666956.1	2,19	0,04	protein ABHD11-like isoform X1
XP_022650723.1	2,41	0,05	heat shock 70 kDa protein cognate 2-like
XP_022670306.1	2,42	0,03	flavin-containing monooxygenase FMO GS-OX5-like
XP_022659550.1	2,47	0,03	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1-like isoform X1
XP_022668477.1	2,48	0,01	histone H3-like
XP_022656533.1	2,52	0,02	protein stoned-B-like isoform X1
XP_022652126.1	2,55	0,04	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit-like
XP_022647416.1	2,67	0,04	GTP-binding protein ypt2-like
XP_022668453.1	2,76	0,04	uncharacterized protein LOC111253396 isoform X1
XP_022656732.1	2,98	0,03	F-BAR domain only protein 2-like
XP_022661193.1	3,56	0,00	rab proteins geranylgeranyltransferase component A 1-like isoform X1
XP_022651093.1	4,15	0,00	85/88 kDa calcium-independent phospholipase A2-like isoform X1
XP_022656610.1	-7,78	0,00	DNA-binding protein HEXBP-like isoform X1
XP_022644180.1	-6,91	0,01	cold shock protein 2-like
XP_022664914.1	-6,77	0,01	leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2-like isoform X1
XP_022657977.1	-6,08	0,00	calcium uniporter protein, mitochondrial-like isoform X1
XP_022671297.1	-5,85	0,03	splicing factor 3A subunit 2-like
XP_022663667.1	-5,11	0,00	tetratricopeptide repeat protein 37-like isoform X1
XP_022671280.1	-4,94	0,02	protein phosphatase 1H-like
XP_022666258.1	-3,84	0,00	uncharacterized protein LOC111252501 isoform X1

## Anhang

XP_022650138.1	-3,69	0,00	mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40-B-like
XP_022655300.1	-3,29	0,05	39S ribosomal protein L19, mitochondrial-like
XP_022647212.1	-3,27	0,05	calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein-like isoform X1
XP_022657666.1	-3,17	0,00	uncharacterized protein LOC111248875
XP_022668338.1	-3,04	0,01	eukaryotic translation initiation factor 4H-like isoform X1
XP_022645744.1	-2,90	0,00	uncharacterized protein F12A10.7-like
XP_022653817.1	-2,60	0,02	adenylate kinase-like
XP_022661089.1	-2,58	0,01	zinc finger protein on ecdysone puffs-like
XP_022649584.1	-2,58	0,05	cuticle protein 65-like
XP_022658098.1	-2,52	0,01	uncharacterized protein LOC111249053 isoform X1
XP_022654661.1	-2,51	0,00	protein RCC2-like
XP_022649578.1	-2,35	0,03	general transcriptional corepressor trfA-like
XP_022652629.1	-2,32	0,05	stromal cell-derived factor 2-like
XP_022643968.1	-2,31	0,04	alpha-L-fucosidase-like
XP_022653517.1	-2,29	0,03	mitochondrial dicarboxylate carrier-like
XP_022662891.1	-2,28	0,02	natterin-4-like
XP_022660857.1	-2,25	0,02	glycine-rich RNA-binding protein 2-like
XP_022645657.1	-2,25	0,01	MIF-like protein mif-2
XP_022671489.1	-2,23	0,03	39S ribosomal protein L39, mitochondrial-like isoform X1
XP_022647433.1	-2,20	0,03	importin subunit alpha-4-like
XP_022663994.1	-2,17	0,01	digestive cysteine proteinase 2-like
XP_022667558.1	-2,12	0,04	signal peptidase complex subunit 2-like
XP_022647162.1	-2,08	0,04	uncharacterized protein LOC111244381
XP_022649083.1	-2,07	0,05	uncharacterized protein LOC111245245
XP_022657637.1	-2,06	0,05	oxysterol-binding protein-related protein 9-like isoform X1
XP_022652113.1	-1,97	0,01	neurofilament medium polypeptide-like
XP_022665444.1	-1,92	0,01	NADH-Cytochrom b5 reductase 2-like
XP_022651535.1	-1,89	0,01	uncharacterized protein LOC111246340
XP_022669632.1	-1,87	0,05	uncharacterized protein LOC111253826
XP_022671354.1	-1,78	0,04	adenosine kinase 2-like isoform X1

## Anhang

XP_022654442.1	-1,73	0,02	rab5 GDP/GTP exchange factor-like isoform X1
XP_022661409.1	-1,70	0,04	serine/threonine-protein kinase PAK 1-like isoform X1
XP_022654170.1	-1,69	0,02	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1-like isoform X1
XP_022652546.1	-1,66	0,01	multiple inositol polyphosphate phosphatase 1-like isoform X1
XP_022666219.1	-1,53	0,01	uncharacterized protein LOC111252488
XP_022652849.1	-1,52	0,02	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-chromosomal-like isoform X1
XP_022646731.1	-1,49	0,01	60S acidic ribosomal protein P0-like
XP_022668871.1	-1,48	0,00	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C-like
XP_022661544.1	-1,45	0,01	uridine phosphorylase 2-like
XP_022649450.1	-1,41	0,02	polycystic kidney disease protein 1-like 3
XP_022650419.1	-1,38	0,03	mRNA export factor-like
XP_022660180.1	-1,38	0,05	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12-like
XP_022670985.1	-1,32	0,00	uncharacterized protein LOC111254418 isoform X1
XP_022663326.1	-1,31	0,00	glutathione synthetase-like
XP_022666047.1	-1,30	0,01	guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1
XP_022658137.1	-1,29	0,05	glycine-rich cell wall structural protein 1.8-like
XP_022647563.1	-1,26	0,02	syntaxin-like
XP_022664109.1	-1,21	0,05	pyroglutamyl-peptidase 1-like
XP_022668765.1	-1,20	0,05	coatamer subunit beta-like isoform X1
XP_022648612.1	-1,19	0,05	coatamer subunit delta-like
XP_022649597.1	-1,18	0,05	uncharacterized protein LOC111245471
XP_022662250.1	-1,17	0,04	spidroin-2-like isoform X1
XP_022655493.1	-1,15	0,02	Cytochrom c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial-like isoform X1
XP_022667852.1	-1,14	0,01	serine/arginine-rich splicing factor 1A-like isoform X1
XP_022650946.1	-1,11	0,02	uncharacterized protein LOC111246029 isoform X1
XP_022667676.1	-1,09	0,01	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit-like
XP_022647380.1	-1,07	0,04	phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2-like isoform X1
XP_022655171.1	-1,02	0,04	coatamer subunit epsilon-like

## Anhang

XP_022661221.1	-1,02	0,02	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 1-like isoform X1
XP_022660387.1	-1,00	0,03	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor homolog
XP_022663924.1	-1,00	0,04	uncharacterized protein LOC111251536 isoform X1
XP_022668304.1	-1,00	0,01	uncharacterized protein LOC111253325
XP_022657429.1	-0,99	0,05	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2-like
XP_022658062.1	-0,99	0,02	low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase-like
XP_022653489.1	-0,98	0,01	cingulin-like isoform X1
XP_022671762.1	-0,97	0,02	ribose-5-phosphate isomerase-like isoform X1
XP_022665777.1	-0,96	0,05	translationally-controlled tumor protein homolog
XP_022663978.1	-0,95	0,01	natterin-3-like
XP_022656302.1	-0,95	0,02	delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial-like
XP_022661869.1	-0,89	0,04	endophilin-A-like isoform X2
XP_022667303.1	-0,89	0,05	ATPase family AAA domain-containing protein 3-B-like
XP_022643440.1	-0,88	0,05	soma ferritin-like
XP_022646986.1	-0,87	0,02	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1-like isoform X1
XP_022661778.1	-0,86	0,01	phytanoyl-CoA dioxygenase, peroxisomal-like
XP_022646833.1	-0,84	0,04	60S ribosomal protein L8-like
XP_022654997.1	-0,84	0,01	signal recognition particle subunit SRP72-like isoform X1
XP_022653664.1	-0,80	0,01	dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5-like
XP_022650517.1	-0,80	0,03	succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial-like isoform X1
XP_022668845.1	-0,79	0,03	basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein-like isoform X1
XP_022661063.1	-0,79	0,04	T-complex protein 1 subunit delta-like
XP_022666911.1	-0,78	0,01	complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial-like isoform X1
XP_022647013.1	-0,78	0,04	60S acidic ribosomal protein P1-like
XP_022653165.1	-0,78	0,03	ATP synthase subunit g, mitochondrial-like
XP_022646476.1	-0,77	0,02	acetylcholinesterase-1-like

## Anhang

XP_022657571.1	-0,77	0,05	alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial-like isoform X1
XP_022669814.1	-0,75	0,03	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial-like
XP_022667770.1	-0,74	0,02	NECAP-like protein CG9132
XP_022646545.1	-0,74	0,04	microtubule-associated protein RP/EB family member 1-like
XP_022663334.1	-0,74	0,03	beta-mannosidase-like isoform X1
XP_022643827.1	-0,74	0,04	heat shock-related 70 kDa protein 2-like
XP_022661668.1	-0,73	0,02	glycine-rich cell wall structural protein-like
XP_022670962.1	-0,73	0,00	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10-like
XP_022643642.1	-0,72	0,05	probable imidazolonepropionase
XP_022653730.1	-0,71	0,03	hsp90 co-chaperone Cdc37-like
XP_022656514.1	-0,70	0,03	protein NDRG3-like isoform X1
XP_022653274.1	-0,70	0,05	cuticle protein 14-like isoform X1
XP_022650620.1	-0,69	0,04	uncharacterized protein LOC111245902
XP_022653613.1	-0,69	0,05	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like
XP_022668059.1	-0,67	0,01	fructose-bisphosphate aldolase A-like
XP_022666309.1	-0,66	0,05	neprilysin-1-like
XP_022656777.1	-0,65	0,04	probable serine/threonine-protein kinase clkA isoform X1
XP_022657427.1	-0,65	0,03	uncharacterized protein LOC111248775
XP_022671579.1	-0,63	0,01	sex-regulated protein janus-A-like isoform X3
XP_022649857.1	-0,63	0,05	uncharacterized protein LOC111245586
XP_022667514.1	-0,62	0,02	ankyrin-2-like isoform X1
XP_022666220.1	-0,60	0,04	macrophage migration inhibitory factor-like

*Tabelle 30: Übersicht aller DEPs, denen eine KEGG-Nummer zugewiesen werden konnte, einschließlich ihrer voraussichtlichen Funktion.*

ID	Description	Hauptfunktion	Unterfunktion	Stoffwechselweg
XP_022650517.1	Succinyl-CoA synthetase beta subunit	09100 Metabolism	09101 Carbohydrate metabolism	00020 Citrate cycle (TCA cycle) [PATH:ko00020]

## Anhang

XP_022649886.1	malate dehydrogenase	09100 Metabolism	09101 Carbohydrate metabolism	00020 Citrate cycle (TCA cycle) [PATH:ko00020]
XP_022668059.1	fructose-bisphosphate aldolase, class I	09100 Metabolism	09101 Carbohydrate metabolism	00030 Pentose phosphate pathway [PATH:ko00030]
XP_022672765.1	aldehyde reductase	09100 Metabolism	09101 Carbohydrate metabolism	00040 Pentose and glucuronate interconversions [PATH:ko00040]
XP_022672765.1	aldehyde reductase	09100 Metabolism	09101 Carbohydrate metabolism	00051 Fructose and mannose metabolism [PATH:ko00051]
XP_022672765.1	aldehyde reductase	09100 Metabolism	09101 Carbohydrate metabolism	00052 Galactose metabolism [PATH:ko00052]
XP_022643858.1	palmitoyl-protein thioesterase	09100 Metabolism	09103 Lipid metabolism	00062 Fatty acid elongation [PATH:ko00062]
XP_022657098.1	butyryl-CoA dehydrogenase	09100 Metabolism	09103 Lipid metabolism	00071 Fatty acid degradation [PATH:ko00071]
XP_022670962.1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex subunit 10	09100 Metabolism	09102 Energy metabolism	00190 Oxidative phosphorylation [PATH:ko00190]
XP_022653165.1	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit g	09100 Metabolism	09102 Energy metabolism	00190 Oxidative phosphorylation [PATH:ko00190]
XP_022655493.1	Cytochrome c oxidase subunit 4	09100 Metabolism	09102 Energy metabolism	00190 Oxidative phosphorylation [PATH:ko00190]
XP_022646767.1	5'-nucleotidase	09100 Metabolism	09104 Nucleotide metabolism	00230 Purine metabolism [PATH:ko00230]
XP_022653817.1	adenylate kinase	09100 Metabolism	09104 Nucleotide metabolism	00230 Purine metabolism [PATH:ko00230]
XP_022671354.1	adenosine kinase	09100 Metabolism	09104 Nucleotide metabolism	00230 Purine metabolism [PATH:ko00230]
XP_022661544.1	uridine phosphorylase	09100 Metabolism	09104 Nucleotide metabolism	00240 Pyrimidine metabolism [PATH:ko00240]
XP_022649886.1	malate dehydrogenase	09100 Metabolism	09105 Amino acid metabolism	00270 Cysteine and methionine metabolism [PATH:ko00270]



## Anhang

XP_022663326.1	glutathione synthase	09100 Metabolism	09105 Amino acid metabolism	00270 Cysteine and methionine metabolism [PATH:ko00270]
XP_022657098.1	butyryl-CoA dehydrogenase	09100 Metabolism	09105 Amino acid metabolism	00280 Valine, leucine and isoleucine degradation [PATH:ko00280]
XP_022657571.1	alpha-amino adipic semialdehyde synthase	09100 Metabolism	09105 Amino acid metabolism	00310 Lysine degradation [PATH:ko00310]
XP_022649728.1	homogentisate 1,2-dioxygenase	09100 Metabolism	09105 Amino acid metabolism	00350 Tyrosine metabolism [PATH:ko00350]
XP_022663334.1	beta-mannosidase	09100 Metabolism	09107 Glycan biosynthesis and metabolism	00511 Other glycan degradation [PATH:ko00511]
XP_022643968.1	alpha-L-fucosidase	09100 Metabolism	09107 Glycan biosynthesis and metabolism	00511 Other glycan degradation [PATH:ko00511]
XP_022666911.1	complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	09100 Metabolism	09107 Glycan biosynthesis and metabolism	00536 Glycosaminoglycan binding proteins [BR:ko00536]
XP_022653730.1	cell division cycle protein 37	09100 Metabolism	09107 Glycan biosynthesis and metabolism	00536 Glycosaminoglycan binding proteins [BR:ko00536]
XP_022672765.1	aldehyde reductase	09100 Metabolism	09103 Lipid metabolism	00561 Glycerolipid metabolism [PATH:ko00561]
XP_022652546.1	multiple inositol-polyphosphate phosphatase / 2,3-bisphosphoglycerate 3-phosphatase	09100 Metabolism	09101 Carbohydrate metabolism	00562 Inositol phosphate metabolism [PATH:ko00562]
XP_022665344.1	phosphatidylinositol 4-kinase type 2	09100 Metabolism	09101 Carbohydrate metabolism	00562 Inositol phosphate metabolism [PATH:ko00562]
XP_022651093.1	calcium-independent	09100 Metabolism	09103 Lipid metabolism	00564 Glycerophospholipid

## Anhang

	phospholipase A2			metabolism [PATH:ko00564]
XP_022662805.1	carbonyl reductase 1	09100 Metabolism	09103 Lipid metabolism	00590 Arachidonic acid metabolism [PATH:ko00590]
XP_022649886.1	malate dehydrogenase	09100 Metabolism	09101 Carbohydrate metabolism	00620 Pyruvate metabolism [PATH:ko00620]
XP_022649886.1	malate dehydrogenase	09100 Metabolism	09101 Carbohydrate metabolism	00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism [PATH:ko00630]
XP_022650517.1	succinyl-CoA synthetase beta subunit	09100 Metabolism	09101 Carbohydrate metabolism	00640 Propanoate metabolism [PATH:ko00640]
XP_022649728.1	homogentisate 1,2-dioxygenase	09100 Metabolism	09111 Xenobiotics biodegradation and metabolism	00643 Styrene degradation [PATH:ko00643]
XP_022649886.1	malate dehydrogenase	09100 Metabolism	09102 Energy metabolism	00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms [PATH:ko00710]
XP_022658062.1	low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	09100 Metabolism	09108 Metabolism of cofactors and vitamins	00730 Thiamine metabolism [PATH:ko00730]
XP_022658062.1	low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	09100 Metabolism	09108 Metabolism of cofactors and vitamins	00740 Riboflavin metabolism [PATH:ko00740]
XP_022646767.1	5'-nucleotidase	09100 Metabolism	09108 Metabolism of cofactors and vitamins	00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism [PATH:ko00760]
XP_022662805.1	carbonyl reductase 1	09100 Metabolism	09111 Xenobiotics biodegradation and metabolism	00980 Metabolism of xenobiotics by Cytochrom P450 [PATH:ko00980]
XP_022653664.1	dimethylaniline monooxygenase (N-oxide forming)	09100 Metabolism	09111 Xenobiotics biodegradation and metabolism	00982 Drug metabolism - Cytochrom P450 [PATH:ko00982]
XP_022668567.1	uridine kinase	09100 Metabolism	09111 Xenobiotics	00983 Drug metabolism - other

## Anhang

			biodegradation and metabolism	enzymes [PATH:ko00983]
XP_022650038.1	nuclear receptor-binding protein	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01001 Protein kinases [BR:ko01001]
XP_022659550.1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01001 Protein kinases [BR:ko01001]
XP_022665584.1	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01001 Protein kinases [BR:ko01001]
XP_022672122.1	20S proteasome subunit alpha 4	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01002 Peptidases [BR:ko01002]
XP_022646811.1	20S proteasome subunit alpha 2	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01002 Peptidases [BR:ko01002]
XP_022650620.1	ATP-dependent Clp protease, protease subunit	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01002 Peptidases [BR:ko01002]
XP_022664109.1	pyroglutamyl-peptidase	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01002 Peptidases [BR:ko01002]
XP_022666956.1	abhydrolase domain-containing protein 11	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01002 Peptidases [BR:ko01002]
XP_022643858.1	palmitoyl-protein thioesterase	09100 Metabolism	09103 Lipid metabolism	01004 Lipid biosynthesis proteins [BR:ko01004]
XP_022658062.1	low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01009 Protein phosphatase and associated proteins [BR:ko01009]
XP_022643827.1	heat shock 70kDa protein 1/8	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01009 Protein phosphatase and associated proteins [BR:ko01009]
XP_022662509.1	immunoglob	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01009 Protein phosphatase and

## Anhang

	ulin-binding protein 1			associated proteins [BR:ko01009]
XP_022668453.1	meiosis arrest female protein 1	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01009 Protein phosphatase and associated proteins [BR:ko01009]
XP_022671280.1	protein phosphatase 1H	09100 Metabolism	09112 Enzyme families	01009 Protein phosphatase and associated proteins [BR:ko01009]
XP_022643827.1	heat shock 70kDa protein 1/8	09130 Environmental Information Processing	09131 Membrane transport	02000 Transporters [BR:ko02000]
XP_022653517.1	solute carrier family 25 (mitochondrial dicarboxylate transporter), member 10	09130 Environmental Information Processing	09131 Membrane transport	02000 Transporters [BR:ko02000]
XP_022654997.1	signal recognition particle subunit SRP72	09130 Environmental Information Processing	09131 Membrane transport	02044 Secretion system [BR:ko02044]
XP_022656610.1	cellular nucleic acid-binding protein	09120 Genetic Information Processing	09121 Transcription	03000 Transcription factors [BR:ko03000]
XP_022669895.1	ribosome assembly protein 1	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03008 Ribosome biogenesis in eukaryotes [PATH:ko03008]
XP_022643827.1	heat shock 70kDa protein 1/8	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03009 Ribosome biogenesis [BR:ko03009]
XP_022647013.1	large subunit ribosomal protein LP1	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03010 Ribosome [PATH:ko03010]
XP_022646833.1	large subunit ribosomal protein L8e	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03010 Ribosome [PATH:ko03010]
XP_022646731.1	large subunit ribosomal protein LP0	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03010 Ribosome [PATH:ko03010]
XP_022655300.1	large subunit	09120 Genetic	09122 Translation	03010 Ribosome [PATH:ko03010]

## Anhang

	ribosomal protein L19	Information Processing		
XP_022657123.1	large subunit ribosomal protein L15	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03010 Ribosome [PATH:ko03010]
XP_022666258.1	large subunit ribosomal protein L20	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03010 Ribosome [PATH:ko03010]
XP_022668708.1	small subunit ribosomal protein S5	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03010 Ribosome [PATH:ko03010]
XP_022671489.1	large subunit ribosomal protein L39	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03011 Ribosome [BR:ko03011]
XP_022656771.1	elongation factor Tu	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03012 Translation factors [BR:ko03012]
XP_022657429.1	translation initiation factor 4G	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03012 Translation factors [BR:ko03012]
XP_022670350.1	peptide chain release factor subunit 1	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03012 Translation factors [BR:ko03012]
XP_022652849.1	translation initiation factor 1A	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03012 Translation factors [BR:ko03012]
XP_022668871.1	translation initiation factor 3 subunit C	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03012 Translation factors [BR:ko03012]
XP_022650419.1	mRNA export factor	09120 Genetic Information Processing	09122 Translation	03013 RNA transport [PATH:ko03013]
XP_022657475.1	small nuclear ribonucleoprotein B and B'	09120 Genetic Information Processing	09124 Replication and repair	03032 DNA replication proteins [BR:ko03032]
XP_022646545.1	microtubule-associated protein, RP/EB family	09120 Genetic Information Processing	09124 Replication and repair	03036 Chromosome and associated proteins [BR:ko03036]
XP_022667854.1	splicing factor,	09120 Genetic	09121 Transcription	03040 Spliceosome [PATH:ko03040]

## Anhang

	arginine/serine-rich 1	Information Processing		
XP_022672923.1	splicing factor U2AF 65 kDa subunit	09120 Genetic Information Processing	09121 Transcription	03040 Spliceosome [PATH:ko03040]
XP_022647212.1	calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	09120 Genetic Information Processing	09121 Transcription	03040 Spliceosome [PATH:ko03040]
XP_022660835.1	peptidyl-prolyl isomerase H (cyclophilin H)	09120 Genetic Information Processing	09121 Transcription	03040 Spliceosome [PATH:ko03040]
XP_022671297.1	splicing factor 3A subunit 2	09120 Genetic Information Processing	09121 Transcription	03040 Spliceosome [PATH:ko03040]
XP_022660180.1	26S proteasome regulatory subunit N5	09120 Genetic Information Processing	09123 Folding, sorting and degradation	03050 Proteasome [PATH:ko03050]
XP_022667558.1	signal peptidase complex subunit 2	09120 Genetic Information Processing	09123 Folding, sorting and degradation	03060 Protein export [PATH:ko03060]
XP_022666047.1	guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	09130 Environmental Information Processing	09132 Signal transduction	04011 MAPK signaling pathway - yeast [PATH:ko04011]
XP_022647416.1	Rab family, other	09130 Environmental Information Processing	09133 Signaling molecules and interaction	04031 GTP-binding proteins [BR:ko04031]
XP_022670068.1	COP9 signalosome complex subunit 2	09120 Genetic Information Processing	09123 Folding, sorting and degradation	04121 Ubiquitin system [BR:ko04121]
XP_022647036.1	vesicle transport protein SEC22	09120 Genetic Information Processing	09123 Folding, sorting and degradation	04130 SNARE interactions in vesicular transport [PATH:ko04130]
XP_022667770.1	adaptin ear-binding coat-associated protein 1/2	09120 Genetic Information Processing	09123 Folding, sorting and degradation	04131 Membrane trafficking [BR:ko04131]
XP_022668845.1	low-density lipoprotein receptor-	09120 Genetic	09123 Folding, sorting and degradation	04131 Membrane trafficking [BR:ko04131]

## Anhang

	related protein 4	Information Processing		
XP_022661869.1	endophilin-A	09120 Genetic Information Processing	09123 Folding, sorting and degradation	04131 Membrane trafficking [BR:ko04131]
XP_022653082.1	actin related protein 2/3 complex, subunit 2	09120 Genetic Information Processing	09123 Folding, sorting and degradation	04131 Membrane trafficking [BR:ko04131]
XP_022655171.1	coatamer subunit epsilon	09120 Genetic Information Processing	09123 Folding, sorting and degradation	04131 Membrane trafficking [BR:ko04131]
XP_022656533.1	stonin-1/2	09120 Genetic Information Processing	09123 Folding, sorting and degradation	04131 Membrane trafficking [BR:ko04131]
XP_022656732.1	F-BAR domain only protein	09120 Genetic Information Processing	09123 Folding, sorting and degradation	04131 Membrane trafficking [BR:ko04131]
XP_022643858.1	palmitoyl-protein thioesterase	09140 Cellular Processes	09141 Transport and catabolism	04142 Lysosome [PATH:ko04142]
XP_022661778.1	phytanoyl-CoA hydroxylase	09140 Cellular Processes	09141 Transport and catabolism	04146 Peroxisome [PATH:ko04146]
XP_022656771.1	elongation factor Tu	09140 Cellular Processes	09141 Transport and catabolism	04147 Exosome [BR:ko04147]
XP_022654170.1	dimethylargininase	09140 Cellular Processes	09141 Transport and catabolism	04147 Exosome [BR:ko04147]
XP_022667514.1	ankyrin	09150 Organismal Systems	09151 Immune system	04624 Toll and Imd signaling pathway [PATH:ko04624]
XP_022669814.1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex subunit 8	09150 Organismal Systems	09156 Nervous system	04723 Retrograde endocannabinoid signaling [PATH:ko04723]

# Publikationen

## Publikationen

### Vorträge

A. Genath: Wirkungsweise des Varroazids Ameisensäure - Vision eines Projektes  
Institut für Veterinär-Biochemie, Tierbiochemisches Seminar, 2018, Berlin

A. Genath: Erste Ergebnisse zur Untersuchung der molekularen Wirkung von Ameisensäure auf Bienen und Varroa-Milben  
49. Süddeutsche Berufsimkertage, 2019, Donaueschingen

A. Genath: Erste Ergebnisse zur Untersuchung der molekularen Wirkung von Ameisensäure auf Bienen und Varroa-Milben  
Institut für Veterinär-Biochemie, Tierbiochemisches Seminar, 2019, Berlin

A. Genath: Wirkung der Ameisensäure auf Biene und Milbe  
Monatsversammlung Imkerverein Berlin-Zehlendorf und Umgebung e.V., 2020, Berlin

A. Genath: Formic acid treatment causes a different expression of detoxification-associated enzymes in the honeybee (*Apis mellifera*) and its parasite *Varroa destructor*  
Tagung der DVG-Fachgruppe "Physiologie und Biochemie", 2020, Leipzig

### Poster

A. Genath, S. Sharbati, M. Krahnstöver, B. Polaczek, R. Einspanier: Characterisation of molecular mechanisms of the varroacide formic acid on *Apis mellifera* and *Varroa destructor*  
11. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar „Biomedical Sciences“, 2018, Berlin

A. Genath, S. Sharbati, A. Kablau, M. Krahnstöver, B. Polaczek, R. Einspanier: Detection of holistic and candidate gene expression changes in *Apis mellifera* and *Varroa destructor* after formic acid treatment  
66. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., 2019, Frankfurt

A. Genath, S. Sharbati, H. Petruschke, M. von Bergen, R. Einspanier: Influence of formic acid treatment on gene and protein expression in *Varroa destructor*  
67. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., 2020, Halle

### Zeitschriftenartikel

A. Genath: Ameisensäure – sie wirkt, und keiner weiß, warum  
Deutsches Bienen-Journal 3/2020



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2018 bis März 2020 im Institut für Veterinär-Biochemie am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Allen voran möchte ich Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier danken, für die Möglichkeit in einem anregenden und konstruktiven Umfeld promovieren zu können, sowie für die Unterstützung, Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Soroush Sharbati, der für mich stets ein kompetenter Ansprechpartner und konstruktiver Betreuer mit hilfreichen Anregungen und Lösungen war. Danke für deine intensive Betreuung und Beratung, die entscheidend für das Gelingen dieser Arbeit waren.

Ein sehr herzlicher Dank gilt Dr. Benedikt Polaczek, nicht nur für die Unterstützung in imkerlicher Sache, sondern auch für all das Wissen über die Honigbienen und den Zuspruch während der gesamten Zeit.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Barbara Kutz-Lohroff bedanken, für die Zeit der intensiven Einarbeitung und Unterstützung im Labor, das angenehme Arbeitsklima und die aufrichtenden Worte, wenn es mal nicht so lief wie geplant.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Veterinär-Biochemie für die herzliche Aufnahme, das tolle Arbeitsumfeld, die unermüdliche Hilfsbereitschaft und die lehrreiche Zeit. Diese Arbeit wäre ohne euch nicht möglich gewesen. Dr. Ralf Nauen und Dr. Benjamin Buer von Bayer CropScience danke ich für die kollegiale Kooperation, die Möglichkeit der lehrreichen Hospitation sowie die äußerst geduldige Beantwortung der bioinformatischen und statistischen Fragen.

Prof. Dr. Martin von Bergen und Hannes Petruschke vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung danke ich für die gute Zusammenarbeit im gemeinsamen Projekt.

Ich möchte mich bei allen Imkern und Imkerinnen, die Proben für die Untersuchungen bereitgestellt haben, bedanken.

Bei dem Deutschen Berufs- und Erwerbsimkerbund und der Ernst-Reuter-Gesellschaft bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Unermesslicher Dank geht an meine Familie und Lieben für eure beständige Ermutigung und bedingungslose Unterstützung zu jeder Zeit. Danke, dass es euch gibt!

## **Finanzierungsquellen**

Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt durch den Deutschen Berufs- und Erwerbsimkerbund und die Ernst-Reuter-Gesellschaft.

## **Interessenskonflikte**

Es besteht kein Interessenskonflikt durch die finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

## **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.

Berlin, den 16.06.2020

Antonia Genath











**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-057-8