

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



**Die Expression humoraler und zellulärer Immunreaktionen  
bei Drohnenlarven und adulten Drohnen  
der Honigbiene (*Apis mellifera*)**

vorgelegt von

**Heike Gätschenberger**

aus

**Mosbach (Baden)**

**Würzburg 2012**

Eingereicht am: \_\_\_\_\_

Bei der Fakultät für Biologie

Mitglieder der Promotionskommission:

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

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hildburg Beier  
Lehrstuhl für Biochemie

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation

„Die Expression humoraler und zellulärer Immunreaktionen  
bei Drohnenlarven und adulten Drohnen der Honigbiene (*Apis mellifera*)“

selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Würzburg, den

---

Heike Gätschenberger

## **Danksagung**

Für die Betreuung und Unterstützung während meiner Promotion möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Tautz bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Hildburg Beier, die mich mit Rat und Tat absolut großartig unterstützt hat, möchte ich mich für ihre tolle Betreuung bedanken.

Imkermeister Dirk Ahrens-Lagast möchte ich für seine Hilfe mit den „Gotlandvölkern“, sonstige praktische Hilfen, Anregungen und Ratschläge danken.

Klara Azzami möchte ich für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfe, Diskussionen und so weiter ganz herzlich danken.

Olaf Gimple danke ich für die gute Zusammenarbeit, seine Hilfe, Ratschläge, Diskussionen und Unterstützung.

Helga Heilmann für ihre wunderbaren Fotos.

Gudrun Grimmer und Karin Möller für die Unterstützung im Labor.

Stefan Albert für seine Hilfe, Unterstützung und Diskussionen.

Daniel Michelberger danke ich für seine Unterstützung bei den Nosemaversuchen und Versuchen mit der Wärmebildkamera.

Nicole Höcherl und Sabine Steigerwald für Hilfe, Unterstützung und Diskussionen.

Katharina Sollmann für die unendliche Geduld bei den Nodulationsversuchen. Hierbei auch Dank an meine Praktikanten Michaela Kurz, Timo Staab und Philip Wieland, dass sie ein Praktikum mit Nodulationsversuchen durchgehalten haben.

Kerstin Duscha für die Unterstützung bei meinem Drohnenlangzeitversuch und Nodulationsversuchen.

Bei ALLEN Mitgliedern der BEEgroup möchte ich mich bedanken, dass sie sowohl in praktischen, wie auch theoretischen Fragen immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir freundschaftlich zur Seite standen. Danke für die schöne Zeit, auch an nicht namentlich erwähnte.

**Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Brüdern samt Anhang für ihre Unterstützung und dass sie immer für mich da waren.**

Diese Arbeit wurde gefördert im Rahmen von FUGAPIS (Functional genome analysis of disease resistance in honeybees (*Apis mellifera*)) durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, FKZ 0315125B).

Sie wurde zudem durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, SFB 567, TP A9 unterstützt.

## Inhaltsverzeichnis

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1       | Die Honigbiene, ein eusoziales Insekt.....   | 1         |
| 1.2       | Krankheiten und Pathogene der Honigbiene.....  | 5         |
| 1.2.1     | Varroa destructor .....  | 5         |
| 1.2.2     | Bienenviren.....   | 6         |
| 1.2.3     | Bakterielle Pathogene der Honigbiene.....  | 6         |
| 1.2.4     | Nosema .....   | 7         |
| 1.2.5     | Die Kalkbrut – eine Pilzerkrankung der Honigbiene.....                               | 8         |
| 1.3       | Das Immunsystem der Honigbiene .....   | 9         |
| 1.3.1     | Das humorale Immunsystem.....  | 10        |
| 1.3.2     | Das ProPhenoloxidase aktivierende System.....  | 10        |
| 1.3.3     | Das zelluläre Immunsystem.....   | 11        |
| 1.4       | Wespen.....  | 12        |
| 1.5       | Wildbienen – Solitärbiene.....   | 14        |
| 1.5       | Hummeln .....  | 16        |
| 1.6       | Aufgabenstellung der Arbeit .....  | 17        |
| <b>2.</b> | <b>Materialien .....</b>   | <b>18</b> |
| 2.1       | Verwendete Bienen und andere Hymenopteren.....                                       | 18        |
| 2.2       | Bakterienstämme und Medien für die Bakterienkultur.....                              | 18        |
| 2.3       | Chemikalienliste .....   | 19        |
| 2.4       | Puffer und molekulare Längenstandards.....   | 21        |
| 2.5       | Geräte und sonstige Materialien.....   | 22        |
| 2.6       | Antikörper.....  | 25        |
| <b>3.</b> | <b>Methoden .....</b>  | <b>26</b> |
| 3.1       | <i>In Vitro</i> Aufzucht von Bienenlarven.....                                       | 26        |
| 3.2       | Injektion immunstimulierender Substanzen bei Larven, Arbeiterinnen und Drohnen ..... | 27        |
| 3.2.1     | Vorbereiten von Bakterien für die Infektion .....                                    | 27        |
| 3.2.2     | Die Injektion immunstimulierender Substanzen.....                                    | 27        |
| 3.3       | Die Entnahme von Haemolymphe bei Larven, Arbeiterinnen und Drohnen.....              | 29        |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3.4     | Versuche mit Drohnenpuppen.....  | 29 |
| 3.5     | Die Haltung von Bienen während eines Versuches .....                       | 30 |
| 3.6     | Versuche mit Hummeln, Mauerbienen und Wespen .....                         | 31 |
| 3.6.1   | Hummeln ( <i>Bombus terrestris</i> ) .....                                 | 31 |
| 3.6.2   | Wespen ( <i>Vespidae</i> ).....  | 31 |
| 3.6.3   | Mauerbienen ( <i>Osmia</i> ).....  | 31 |
| 3.7     | Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....             | 32 |
| 3.7.1   | Diskontinuierliche SDS-PAGE .....  | 32 |
| 3.7.2   | Das Laemmli Puffersystem (Laemmli, 1970) .....                             | 34 |
| 3.7.3   | Tricine-Puffersystem (Schägger und Jagow, 1987).....                       | 34 |
| 3.7.4   | Färbemethoden .....  | 35 |
| 3.7.4.1 | Coomassie-Blau R250-Färbung .....  | 35 |
| 3.7.4.2 | Kolloidale Coomassie-Blau G250 - Färbung .....                             | 35 |
| 3.8     | Western Blot (Immunoblot) .....  | 36 |
| 3.8.1   | Übertragen von Proteinen auf eine PVDF-Membran .....                       |    |
|         | (Semi-Dry Western Blot).....   | 36 |
| 3.8.2   | Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine .....                  |    |
|         | mittels Antikörperfärbung.....   | 37 |
| 3.8.3   | „Stripping“ von Western Blot Membranen .....                               | 38 |
| 3.9     | Hemmhoftest (durch Agardiffusion) .....                                    | 38 |
| 3.10    | Zweidimensionale-Gelelektrophorese .....                                   | 39 |
| 3.10.1  | Die Isoelektrische Fokussierung (Erste Dimension).....                     | 39 |
| 3.10.2  | Äquilibrierung .....   | 39 |
| 3.10.3  | Zweite Dimension (SDS-PAGE).....   | 40 |
| 3.10.4  | Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford (1976).....            | 41 |
| 3.11    | Nachweis von Noduli bei infizierten Larven und adulten Bienen .....        | 42 |
| 3.11.1  | Präparation von Larven.....  | 42 |
| 3.11.2  | Präparation von adulten Bienen.....  | 42 |
| 3.12    | Abnahme Koloniebildender Einheiten nach einer bakteriellen Infektion ..... | 43 |
| 3.13    | Die Infektion mit <i>Nosema</i> .....                                      | 44 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4. Ergebnisse</b> .....   | <b>45</b> |
| 4.1 <i>In vitro</i> Aufzucht von Drohnenlarven .....   | 45        |
| 4.1.1 Etablierung der Larvenaufzucht für Drohnenlarven.....  | 45        |
| 4.1.2 Aufzucht der Drohnenlarven bis zum adulten Drohn.....  | 46        |
| 4.1.3 Wachstumskurve von Drohnenlarven während der <i>in vitro</i> Aufzucht.....   | 46        |
| 4.1.4 Die Proteinzusammensetzung der Haemolymphe von .....<br>Drohnenlarven während der Larvalentwicklung .....                              | 49        |
| 4.2 Humorale Immunreaktionen von Drohnenlarven.....  | 52        |
| 4.2.1 Proteinanalyse der Haemolymphe von Drohnenlarven nach .....<br>bakterieller Infektion .....  | 52        |
| 4.2.2 Die Expression antibakterieller Peptide in der Haemolymphe .....<br>von Drohnenlarven nach Injektion unterschiedlicher Elizitoren..... | 54        |
| 4.2.3 Abnahme Koloniebildender Einheiten nach bakterieller Infektion .....<br>in der Haemolymphe von Drohnenlarven.....                      | 56        |
| 4.3 Drohnenpuppen: Übergang zwischen Larven und adulten Drohnen .....  | 57        |
| 4.3.1 Proteinanalyse der Haemolymphe von Drohnenpuppen.....  | 57        |
| 4.3.2 Die Auswirkung einer <i>E.coli</i> Infektion auf Drohnenpuppen .....   | 59        |
| 4.4 Infektionsversuche mit adulten Drohnen .....   | 63        |
| 4.4.1 Proteinanalyse der Haemolymphe adulter nicht infizierter Drohnen.....  | 63        |
| 4.4.2 Analyse des Proteinmusters der Haemolymphe adulter Drohnen .....<br>nach Infektion .....   | 66        |
| 4.4.3 Abnahme Koloniebildender Einheiten nach bakterieller Infektion .....<br>bei adulten Drohnen.....                                       | 74        |
| 4.4.4 Vergleich der Haemolymphproteine von Larven und adulten Drohnen.....   | 75        |
| 4.5 Die humorale Immunantwort verschiedener Hymenopteren .....   | 78        |
| 4.5.1 Versuche mit der Erdhummel <i>Bombus terrestris</i> .....  | 78        |
| 4.5.2 Untersuchungen an der sächsischen Wespe ( <i>Dolichovespula saxonica</i> ) .....   | 81        |
| 4.5.3 Versuche mit der Deutschen Wespe <i>Vespula germanica</i> .....  | 82        |
| 4.5.4 Versuche mit Mauerbienen (Gattung <i>Osmia</i> ) .....   | 84        |
| 4.5.5 Vergleich der Immunantwort von <i>Bombus terrestris</i> , <i>Apis mellifera</i> .....<br>und <i>Vespula germanica</i> .....            | 86        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 4.6       | Nodulation – Teil der zellulären Immunantwort in der Honigbiene.....           | 87         |
| 4.6.1     | Nodulationsreaktionen von Larven .....   | 87         |
| 4.6.2     | Nodulationsreaktionen von Arbeiterinnen .....                                  | 89         |
| 4.6.3     | Abwesenheit von Nodulationsreaktionen bei Winterbienen.....                    | 92         |
| 4.6.4     | Nodulationsreaktionen von adulten Drohnen .....                                | 95         |
| 4.6.5     | Vergleich der Nodulationsreaktion von Arbeiterinnen und Drohnen.....           | 98         |
| 4.6.6     | Nodulationsreaktionen von Königinnen.....                                      | 99         |
| 4.7       | Nosema als Cofaktor bei einer bakteriellen Infektion .....                     | 100        |
| 4.8       | Glucosekonzentration in der Haemolymphe von der Honigbiene .....               | 102        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>103</b> |
| 5.1       | Strategien der Pathogenabwehr bei Honigbienen.....                             | 103        |
| 5.2       | Drohnenlarven.....   | 104        |
| 5.2.1     | <i>In vitro</i> Aufzucht von Drohnenlarven .....                               | 104        |
| 5.2.2     | Die Haemolymphe nicht infizierter Larven und ihre Besonderheiten .....         | 106        |
| 5.3       | Drohnenlarven reagieren mit starker humoraler und .....                        |            |
|           | schwacher zellulärer Immunantwort auf bakterielle Infektionen .....            | 107        |
| 5.4       | Drohnenpuppen besitzen keine Immunkompetenz .....                              | 109        |
| 5.5       | Adulte Drohnen zeigen eine starke humorale und eine .....                      |            |
|           | starke zelluläre Immunantwort.....   | 113        |
| 5.5.1     | Das Haemolymphproteinmuster adulter Drohnen variiert mit dem Alter ...         | 113        |
| 5.5.2     | Die lebenslange, starke Immunantwort von adulten Drohnen.....                  | 113        |
| 5.6       | Nodulation, eine wichtige Komponente der zellulären Immunantwort.....          | 116        |
| 5.7       | Zelluläre Immunreaktionen erfolgen vor humoraler Immunantwort .....            | 118        |
| 5.8       | Entwicklungsspezifische Immunkompetenz .....                                   | 121        |
| 5.9       | Die Immunantwort von Arbeiterinnen und Drohnen der Honigbiene .....            |            |
|           | im Vergleich.....  | 122        |
| 5.10      | Hummeln besitzen eine ähnliche Immunabwehr wie Honigbienen.....                | 124        |
| 5.11      | Soziale Wespen und solitäre Wildbienen zeigen .....                            |            |
|           | kaum oder keine humorale Immunität .....                                       | 125        |
| 5.12      | OCLP1, ein animales Peptidtoxin (APT) mit antimikrobiellen Eigenschaften ..... | 126        |
| 5.13      | Nosema, eine Darmerkrankung adulter Bienen.....                                | 128        |



|   |            |
|---|------------|
| <b>6. Zusammenfassung.....</b>                                      | <b>129</b> |
| <b>7. Summary.....</b>  | <b>132</b> |
| <b>8. Literaturverzeichnis.....</b>                                 | <b>135</b> |
| <b>9. Anhang .....</b>  | <b>147</b> |
| 9.1 Haemolymphproteine von Honigbienen Drohnen.....                 | 147        |
| 9.2 Statistik zum Vergleich der Noduligröße bei der Honigbiene..... | 154        |
| 9.3 Alignment von OCLP 1 Proteinsequenzen bei Hymenopteren .....    | 155        |
| 9.4 IRp42.....  | 156        |
| <b>10. Publikationen.....</b>                                       | <b>157</b> |
| <b>11. Lebenslauf.....</b>  | <b>159</b> |

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

|                        |   |
|------------------------|---|
| ***                    | Signifikanz-Niveau $p < 0,001$ ; höchstsignifikant  |
| % v/v                  | Volumenprozent (,,volume per volume“)   |
| % w/v                  | Gewichtsprozent (,,weight per volume“)  |
| %                      | Prozent   |
| 23±2                   | 23 mit einer Standardabweichung von 2   |
| >                      | größer als  |
| <                      | kleiner als   |
| °C                     | Grad Celsius  |
| μ                      | Mikro-, $10^{-6}$   |
| ♀                      | weiblich  |
| ♂                      | männlich  |
| 2D                     | zweidimensional   |
| A                      | Ampere  |
| à                      | je, zu je   |
| Abb.                   | Abbildung   |
| ABPV                   | Akutes Bienen Paralyse Virus  |
| ad libitum             | Es wurde soviel Futter zur Verfügung gestellt, dass alle Tiere bis zur Sättigung fressen konnten. |
| ad                     | mit der angegebenen Lösung auf das angegebene Volumen auffüllen                                   |
| AFB                    | Amerikanische Faulbrut  |
| AK                     | Antikörper  |
| AMP                    | antimikrobielles Peptid   |
| APS                    | Ammoniumperoxidsulfat   |
| Art.-Nr.               | Artikelnummer   |
| BPB                    | Bromphenolblau  |
| BSA                    | Albumin aus Rinderserum (,,bovine serum albumin“)   |
| bzw.                   | beziehungsweise   |
| ca.                    | circa   |
| CE                     | Carboxylesterase  |
| cm                     | Zentimeter  |
| CO <sub>2</sub>        | Kohlendioxid  |
| COX                    | Cyclooxygenase  |
| d                      | Tag(e)  |
| d.h.                   | das heißt   |
| deion H <sub>2</sub> O | deionisiertes Wasser  |
| DMSO                   | Dimethylsulfoxid  |
| DSM Nr.                | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen   |
| DTT                    | Dithiothreitol  |
| DWV                    | Deformed Wing Virus   |
| Ec                     | <i>E.coli</i> ; <i>Escherichia coli</i> 682   |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| EFB                              | Europäische Faulbrut   |
| el. Feld                         | elektrisches Feld  |
| et al.                           | und Mitautoren   |
| g                                | Gramm  |
| GNBPs                            | Gram-negativ bindende Proteine                                 |
| GST                              | Glutathion S Transferase                                       |
| h                                | Stunde   |
| H <sub>2</sub> O                 | Wasser   |
| HCl                              | Salzsäure  |
| Hz                               | Hertz  |
| IAPV                             | Israelisches Akutes Bienen Paralyse Virus                      |
| IEF                              | Isoelektrische Fokussierung                                    |
| IRPs                             | Immun reaktive Proteine  |
| KBV                              | Kashmir Bienen Virus   |
| KCl                              | Kaliumchlorid  |
| kDa                              | Kilodalton   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Kaliumdihydrogenphosphat                                       |
| l                                | Liter  |
| L                                | Lysozym  |
| LA                               | Laminarin  |
| LOX                              | Lipoxygenase   |
| LPS                              | Lipopolysaccharid  |
| M                                | Mol  |
| mA                               | Milliampere  |
| min                              | Minute   |
| mm                               | Millimeter   |
| MRJP                             | Major Royal Jelly Proteine                                     |
| MW                               | Molekulargewicht   |
| n.i.                             | unbehandelt, ohne Infektion, naiv                              |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | di-Natriumhydrogenphosphat                                     |
| NaCl                             | Natriumchlorid   |
| NaOH                             | Natriumhydroxid  |
| nm                               | Nanometer  |
| No                               | Nummer   |
| Nr.                              | Nummer   |
| PAA                              | Polyacrylamid  |
| PAGE                             | Polyacrylamid Gelelektrophorese                                |
| PAMPs                            | Pathogen-associated molecular patterns                         |
| PBS                              | Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline) |
| p.i.                             | nach der Infektion (post infection)                            |
| PG                               | Prostaglandin  |
| PGN                              | Peptidoglycan  |

|                  |   |
|------------------|---|
| PGRPs            | „peptidoglycan recognition proteins“                                  |
| pH               | negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration   |
| PLA <sub>2</sub> | Phospholipase A <sub>2</sub>  |
| PO               | Phenoloxidase   |
| ProPO            | Prophenoloxidase  |
| PTU              | Phenylthiourea  |
| PVDF             | Immobilon P Transfer Membran  |
| ®                | eingetragene Waren- oder Dienstleistungsmarke (registered trade mark) |
| RNAi             | RNA-Interferenz oder auch RNA-Silencing                               |
| RNA              | Ribonucleinsäure  |
| s                | Sekunde   |
| s.               | siehe   |
| S                | Seite   |
| SDS              | Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfat)                            |
| ...spp.          | Mehrere Arten der Gattung ...   |
| Stdabw.          | Standardabweichung  |
| TBS              | Tris buffered saline  |
| TBST             | Tris buffered saline and Tween  |
| TEMED            | N,N, N',N'-Tetramethylethyldiamin                                     |
| Tricine          | N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycine                                  |
| Tris             | Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan                                      |
| ™                | trade mark  |
| UpM              | Umdrehungen pro Minute  |
| V                | Volt  |
| W                | Watt  |
| w                | Woche(n)  |
| x                | mal   |
| z.B.             | zum Beispiel  |
| Z/μl             | Zellen pro Mikroliter   |
| Z                | Zellen  |

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Honigbiene, ein eusoziales Insekt

Es gibt weltweit 9 Honigbienenarten (Abb. 1), die sich in ihren Abwehrstrategien und in ihrer Krankheitsanfälligkeit unterscheiden. Die über zahlreiche Unterarten verfügende Art *Apis mellifera*, die untereinander problemlos kreuzbar sind, ist als einzige in Europa heimisch. Der ursprüngliche Wirt der Varroamilbe, die Östliche Honigbiene *Apis cerana*, ist die bekannteste der asiatischen Honigbienenarten. Trotz der Artenarmut ist die Honigbiene dennoch ein wichtiger Faktor in der Ökologie, durch ihre Bestäubungsleistung, die sie damit zum drittwichtigsten Nutztier macht. Obwohl sie nicht die einzigen bestäubenden Insekten sind, zählen die Honigbienen dennoch in den meisten Regionen der Erde, in denen Blütenpflanzen zu finden sind, zu den wichtigsten Bestäubern. Durch ihre Bestäubungsleistung tragen sie zur Erhaltung der Biodiversität bei.



Abb. 1: Arbeiterinnen der neun bekannten Honigbienenarten

Honigbienen sind hoch eusoziale Hymenopteren (Hautflügler), deren Staaten in der Hochsaison bis zu 50.000 Arbeiterinnen umfassen. Während des Spätsommers geht ihre Zahl auf 5.000 bis 10.000 zurück. Völker mit weniger als 5.000 Arbeiterinnen im Herbst schaffen meist die Überwinterung bis ins nächste Frühjahr nicht. Drohnen sind nur von Anfang April bis zur Drohnenschlacht Mitte Juli im Bienenstaat anzutreffen. Der Zeitpunkt der Drohnenschlacht ist stark von Witterungsbedingungen abhängig. Die Drohnenschlacht dauert meist nur einen Tag und scheint aktiv von den Arbeiterinnen betrieben zu werden, indem sie schon einige Tage vor der Drohnenschlacht frisch geschlüpfte Drohnen nicht mehr so gut mit Nahrung versorgen und währenddessen die Drohnen angreifen („Abknabbern“ der Antennen) und diese aus dem Stock entfernen (Hirtz, 2011). In der kurzen Zeitspanne der Anwesenheit von Drohnen werden auch die Jungköniginnen im Volk herangezogen. Ungefähr vier Wochen vorm Schwärmen erreicht die Anzahl an Drohnen die aufgezogen werden ihren Höhepunkt, damit die Drohnen rechtzeitig schlüpfen und Geschlechtsreif werden können (Winston, 1995). Das einzige fertile Weibchen eines Volkes ist die Königin. Bevor die Jungköniginnen schlüpfen verlässt die alte Königin mit einem Teil ihres Volkes das Nest und bezieht mit diesem Schwarm eine neue Unterkunft. Während der Jungfernflüge paaren sich die Jungköniginnen mit bis zu 20 Drohnen bevor sie in den Stock zurückkehren. Die Drohnen fliegen nicht die gesamte Zeit während ihrer Erkundungsflüge, sondern sitzen oft zu dutzenden in der Vegetation auf Büschen oder Bäumen in der Nähe von Drohnensammelplätzen (Tautz, 2007). Die Drohnen sterben nach der Begattung und hinterlassen ein fest steckendes

Begattungszeichen, das die Königin besser auffindbar macht für weitere Drohnen. Ob die Begattung der Königin während des Fluges stattfindet, ist noch nicht mit Sicherheit geklärt. Aufgrund der Mehrfachverpaarung der Königin sind die Arbeiterinnen eines Volkes entweder Halb- oder Vollschwwestern. Der Verwandtschaftskoeffizient liegt also zwischen 0,5 und 0,75 (Tautz, 2007). Somit sind die Arbeiterinnen teilweise näher miteinander verwandt, als sie es mit eigenem Nachwuchs wären.

In der Hochsaison legt eine Königin zwischen 1000 und 2000 Eier pro Tag. Als holometaboles Insekt umfasst die Entwicklung der Honigbiene eine komplette Metamorphose vom Ei, über Larven- und Puppenstadien bis zum adulten Tier. Die Entwicklungszeit von Bienen ist von der Temperatur, der Nahrung und der Bienenrasse abhängig. Arbeiterinnen von *Apis mellifera* benötigen durchschnittlich 21, Königinnen 16 und Drohnen 24 Tage bis zum Schlupf des adulten Tieres.

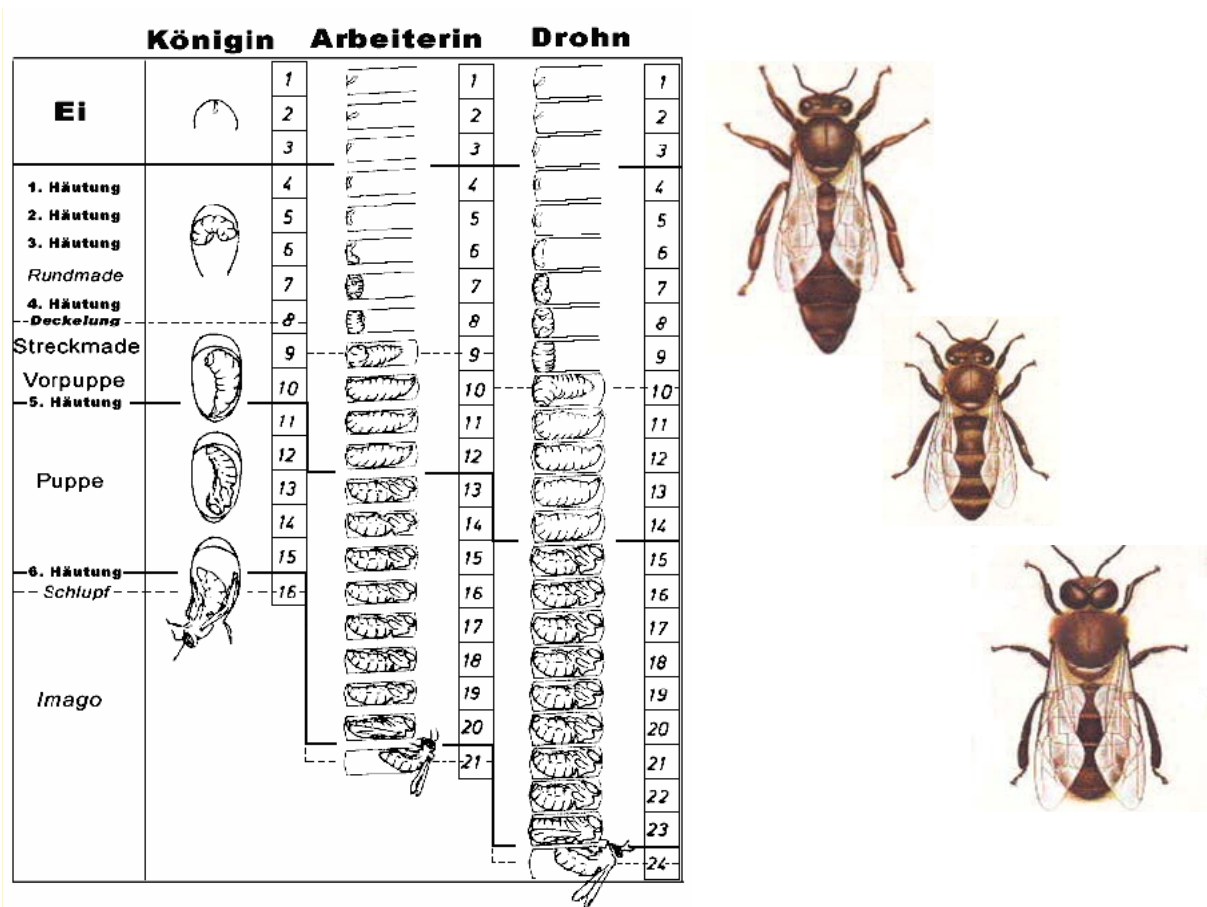
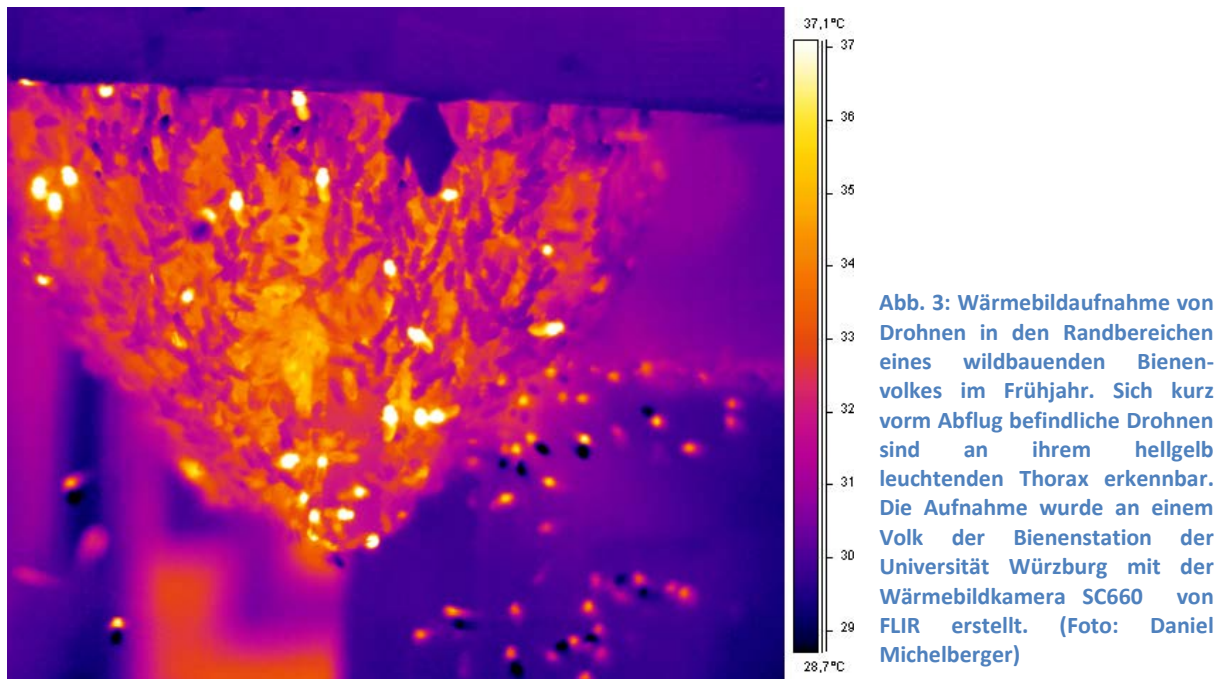


Abb. 2: Entwicklung der Honigbiene *Apis mellifera* vom Ei bis zur adulten Biene. Von links nach rechts Königin, Arbeiterin und Drohn.

Königinnen und Arbeiterinnen entwickeln sich aus befruchteten Eiern und sind diploid. Ob sich aus einem Ei eine Arbeiterin oder eine Königin entwickelt, wird über die Futterzusammensetzung des Larvenfutters geregelt. Spätere Königinnen erhalten über die gesamte Larvalentwicklung reines Gelee Royal. Bis zu drei Tage alte Larven können sich noch in Arbeiterinnen und Königinnen entwickeln, was danach aufgrund des unterschiedlichen Futters und hier vor allem des Gehaltes an Gelee Royal nicht mehr möglich ist (Gullan und Cranston, 1994).

Aus nicht befruchteten Eiern entwickeln sich die Drohnen, die daher haploid sind. Drohnenlarven erhalten in der ersten Hälfte ihrer Entwicklung dasselbe Futter wie Arbeiterinnenlarven und erst später enthält ihr Futter mehr Kohlenhydrate aber weniger Proteine und Fette (Winston, 1995; Hrassnigg und Crailsheim, 2005) durch die Beimengung von Honig und Pollen. Die Futterzusammensetzung des Larvenfutters wird bei Arbeiterinnen nach 84 Stunden und bei Drohnen nach 108 Stunden geändert (Brouwers, 1987).

Drohnen sind an ihre Hauptaufgabe das Begatten von Jungköniginnen optimal angepasst. Strukturen, die zur Orientierung, dem Flug oder der Paarung wichtig sind, sind stark entwickelt. So bestehen ihre größeren Augen aus 8600 Facettenaugen, während Arbeiterinnen nur 6900 haben (Winston, 1987). Im Gegensatz dazu haben sie verkümmerte Kopfdrüsen, einen kurzen Proboscis, keine Wachsdrüsen, Nasanovdrüsen oder Hypopharynxdrüsen, kleinere Mandibeln, einen kleinen Honigmagen, keine Pollensammelvorrichtung an den Hinterbeinen und keinen Stachel (Winston, 1987; Hrassnigg und Crailsheim, 2005). Obwohl die Drohnen nahezu doppelt so groß und schwer sind wie die Arbeiterinnen können sie hervorragend fliegen.



Im Gegensatz zu Arbeiterinnen fehlen adulten Drohnen einige Verdauungsenzyme (Hrassnigg und Crailsheim, 2005). In den ersten sechs Tagen werden sie von Arbeiterinnen gefüttert, bevor sie eigenständig Honig aus den Waben zu sich nehmen (Free, 1956; Hirtz, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Drohnen aktiv zur Thermoregulation des Bienenstockes beitragen indem sie heizen. Dies machen sie allerdings nicht aufgrund von Stimuli durch die Brut, wie dies bei den Arbeiterinnen der Fall ist, sondern nur aus Eigennutz (Kovac et al., 2009). Junge Drohnen halten sich bevorzugt im Brutnestbereich auf, während ältere eher in den Randbereichen zu finden sind (Harrison, 1987).

Pheromone spielen in der Kommunikation innerhalb der Kolonie eine bedeutende Rolle. So unterdrückt die Königin durch das Königinnenpheromon ((E)-9-oxodec-2-enoic acid (9-ODA)) die Entwicklung der Ovarien der Arbeiterinnen. Andererseits nutzt sie es auch zum Anlocken

von Drohnen (Winston, 1995) Andere Pheromone dienen der Kolonierkennung, als Alarmpheromone oder zur Orientierung, wie das Nasanovdrüsensekret. Für die Erhaltung des Staates ist die altersabhängige Arbeitsteilung der Arbeiterinnen essentiell. Die Übergänge zwischen den einzelnen Arbeitsaufgaben sind fließend und falls z.B. durch Krankheiten nicht mehr genug Ammenbienen vorhanden wären, können sich Sammlerinnen wieder in Ammenbienen zurückwandeln.

Der Körper der Honigbiene ist in drei anatomische Abschnitte unterteilt und zwar dem Kopf mit Mundwerkzeugen und Sinnesorganen, wie den Augen und Antennen, dem Thorax, der fast vollständig mit Muskulatur gefüllt ist, die die beiden häutigen Flügelpaare und die sechs gegliederten Beine bewegen, und dem Abdomen, das neben den Verdauungsorganen, den Fettkörper, das Tracheensystem, den Stachelapparat und bei der Königin und den Drohnen vor allem die Geschlechtsorgane enthält (Seeley, 1995). Die Ovarien sind bei normalen Arbeiterinnen im Vergleich zu denen der Königinnen unterentwickelt. Zudem fehlen den Arbeiterinnen die Strukturen die für die Begattung notwendig sind und ihre Spermatheka ist rudimentär und ohne Funktion (Winston, 1995).

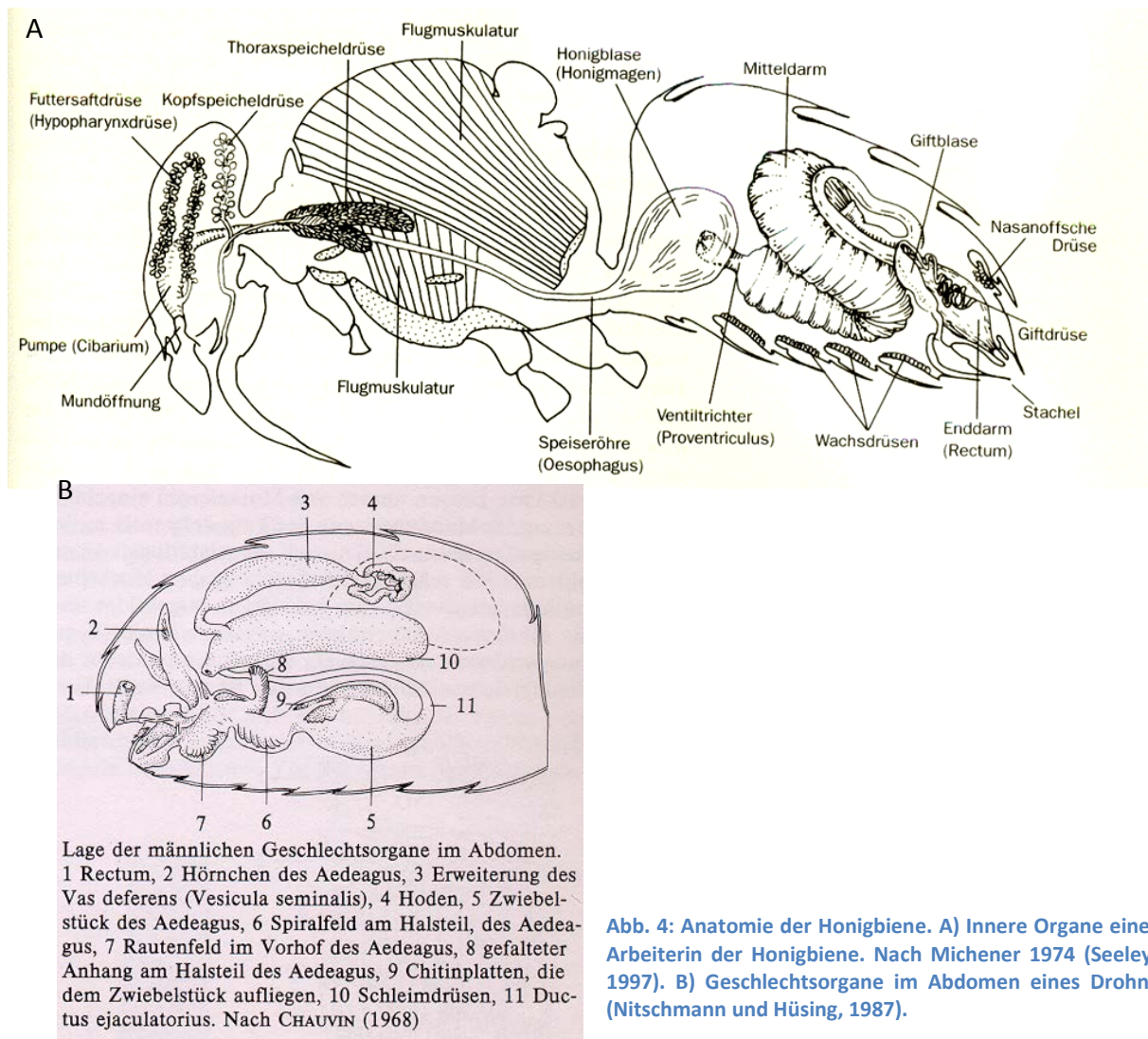


Abb. 4: Anatomie der Honigbiene. A) Innere Organe einer Arbeiterin der Honigbiene. Nach Michener 1974 (Seeley, 1997). B) Geschlechtsorgane im Abdomen eines Drohns (Nitschmann und Hüsing, 1987).



## 1.2 Krankheiten und Pathogene der Honigbiene

Pathogenabwehr auf Ebene der Kolonie bei der Honigbiene funktioniert über das Hygieneverhalten, die antimikrobiellen Eigenschaften von Honig, Pollen und Gelee Royale, sowie das Sammeln und Benutzen von Propolis (Fries und Camazine, 2001; Simone et al., 2009). Außer dem Sozialverhalten tragen auf individueller Ebene physikalische Barrieren, wie die Kutikula und das Darmepithel, sowie das angeborene Immunsystem zur Pathogenabwehr bei (Randolt et al., 2008). Bakterien, Pilze, Viren, Protozoen, Milben, Fliegen, Käfer und Nematoden sind Pathogene der Honigbiene (Wilson-Rich et al., 2008).

### 1.2.1 *Varroa destructor*

Die Varroamilbe befällt sowohl die Brut, in der sie sich vermehrt, als auch adulte Bienen. Die Symptome eines Varroabefalles sind nicht immer gleich, da es auf die Stärke des Befalles und von Sekundärinfektionen durch Viren ankommt, wie sich diese auswirken. *Varroa* fungiert oftmals als Vektor für Bienenviren. Für das Kashmir Bienenvirus (KBV), das Israelische Akute Paralysevirus (IAPV) und das Deformed Wing Virus (DWV) konnte nachgewiesen werden, dass *Varroa* als Vektor zur Verbreitung dient. Es sollen aber auch Akute Bienen Paralysevirus (ABPV) Infektionen mit *Varroa* im Zusammenhang stehen (Genersch und Aubert, 2010). Auf jeden Fall wird ein Bienenvolk durch einen Befall mit *Varroa* geschwächt und ist nicht mehr so widerstandsfähig bei widrigen Umwelteinflüssen oder weiterem Pathogenbefall. Die Varroose verursacht mehr ökonomischen Schaden und Kosten als andere bekannte Bienenkrankheiten (Genersch, 2010a). Daher wurde die Kontrolle und Bekämpfung von *Varroa* ein wichtiger Teil der Imkerlichen Praxis, wie das Ausschneiden der Drohnenbrut, die aufgrund der längeren Entwicklungsdauer der Drohnen und dem längeren Zeitfenster für das Einwandern der Milbe in die Brutzelle (Boot et al., 1992) achtmal häufiger befallen wird als Arbeiterinnenbrut (Fuchs, 1990). Die Attraktivität einer Brutzelle mit Larve hängt von der Zellgröße, dem Geschlecht der Larve und den Kolonieinteraktionen ab. Hierbei sind Drohnenzellen mit Drohnenlarven am attraktivsten für weibliche Varroen (Calderone und Kuenen, 2001). Im Durchschnitt entwickeln sich auf Drohnenbrut 2,2-2,6 und auf Arbeiterinnenbrut 1,3-1,4 Tochtervarroen (Calderone und Kuenen, 2001). Versuche die Varroamilbe zu bekämpfen indem man die Honigbiene durch die Vorgabe mit Mittelwänden zwang, Zellen mit kleinerem Zelldurchmesser

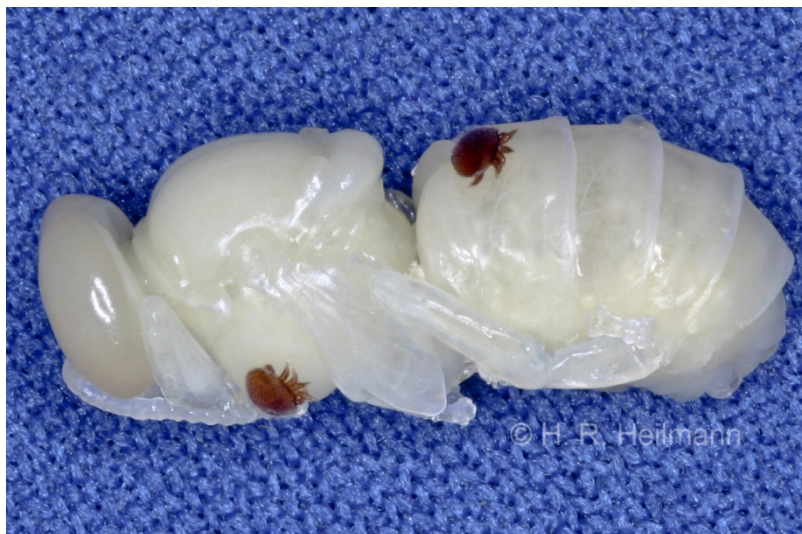


Abb. 5: Drohnenpuppe mit zwei Varroamilben. Foto: Helga R. Heilmann

(4,9 mm statt der standardisierten 5,4 mm) zu bauen, haben sich als nicht erfolgreich erwiesen. Die Hoffnung die Vermehrung der Milbe so zu unterbinden wurde nicht erfüllt, da es teilweise sogar zu einer Vermehrung kam (Coffey et al., 2010).

Die Varroamilbe ist nicht nur auf den adulten Arbeiterinnen, sondern auch auf adulten Drohnen zu finden. Die Milben sind zumeist zwischen den Tergiten am Hinterleib zu finden, da die Intersegmentalhäute zwischen den Tergiten leichter zu durchstechen sind.

### 1.2.2 Bienenviren

Bailey und Ball (1991) beschreiben 17 verschiedene Viren, die spezifisch für Honigbienen sind. Die Bienenviren DWV (Iflaviridae) und ABPV (Dicistroviridae) kamen durch die Varroamilbe mehr und mehr in den Fokus der Aufmerksamkeit. Vor der Einschleppung der Varroamilbe verursachte DWV nicht sichtbare und symptomlose Infektionen. Durch die Übertragung von DWV durch die Milbe kam es zu einer sichtbaren Infektion mit verkrüppelten Flügeln bei den Bienen. Die Replikation des Virus in der Milbe und ein damit verbundener hoher Virustiter sind notwendige Bedingungen für eine offene DWV Infektion bei der sich entwickelnden Biene (Gisder et al., 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Varroamilbe die Immunantwort der Honigbiene unterdrückt indem sie die Transkription von Genen, die antimikrobielle Peptide sowie weitere Immunfaktoren codieren, reduziert (Yang und Cox-Foster, 2005). Auch ABPV hat im Zusammenspiel mit der Varroamilbe stark an Virulenz hinzugewonnen, wobei der Mechanismus hier noch nicht bekannt ist (Genersch, 2010a).

### 1.2.3 Bakterielle Pathogene der Honigbiene

Die Europäische Faulbrut (EFB) und die Amerikanische Faulbrut (AFB) sind die wichtigsten bakteriellen Infektionen der Honigbiene. Beide sind auf das Larvenstadium der Honigbiene beschränkt, wobei aber die adulten Arbeiterinnen als Überträger dienen (Pohl, 1995).

Bei der Amerikanischen Faulbrut (Bösartige Faulbrut) handelt es sich um eine meldepflichtige Erkrankung der Brut, die durch den Streichholztest bei verdeckelter Brut diagnostiziert wird. Die Infektion findet in 12-36 Stunden alten Larven statt (Genersch, 2010b). *Paenibacillus larvae* Bakterien (Gram-positiv) vermehren sich in befallenen Larven und töten diese ab. Die dabei entstandenen Sporen sind hochinfektiös. Hierbei wird aus der weißen Bienenlarve eine braune, fadenziehende Masse, die Millionen von Sporen enthält. Als sogenannter Faulbrutschorf (eingetrockneter Zustand) ist sie kaum aus der Zelle zu entfernen. Weitere Symptome der Amerikanischen Faulbrut sind löchrige, eingesunkene Zelldeckel und ein lückiges Brutnest (Pohl, 1995). Es sind vier Subtypen von *P. larvae* bekannt, die sich im Phänotyp und ihrer Virulenz unterscheiden (Genersch, 2010b).

Die Europäische Faulbrut (Gutartige Faulbrut, Sauerbrut oder „Stinkbrut“) wird von *Melisococcus plutonius* (Gram-positiv) hervorgerufen. Dadurch, dass meist Sekundärinfektionen vorliegen, ist das Krankheitsbild uneinheitlich. Die Infektion findet zumeist in jüngeren Larvenstadien statt. Die Larven werden gelblich, dann braun und

schließlich gräulich schwarz. Bei einem starken Befall ist das Brutnest sehr lückenhaft und manchmal begleitet durch einen säuerlich, stinkenden Geruch. Sind die Larven nicht schon vor dem Verdeckeln gestorben, kommt es zu eingesunkenen Zelldeckeln, die an die Amerikanische Faulbrut erinnern. Da sich *M. plutonius* nur im Larvendarm vermehren kann, ist das Bakterium darauf angewiesen, dass infizierte Larven solange überleben bis sie abkoten. Im Kot überlebt *M. plutonius* längere Zeitspannen. Adulte Bienen übertragen den Erreger nicht nur innerhalb der Kolonie sondern auch zwischen Kolonien und Bienenständen. Desweiteren tragen imkerliche Routinearbeiten zur Verbreitung bei. (Forsgren, 2010) In der Schweiz wurde die Europäische Faulbrut in den letzten Jahren zunehmend zu einem Problem (Genersch, 2010a). Die unterschiedlich stark auftretende EFB hier besonders in Großbritannien und der Schweiz könnte auf die klimatischen Bedingungen, die Nahrungsqualität als auch auf genetische Varianzen, sowohl bei der Honigbiene als auch beim Pathogen selbst, zurückzuführen sein (Forsgren, 2010).

### 1.2.4 Nosema

Als Erreger der Nosemose bei der Honigbiene *Apis mellifera* in Europa kommt nicht nur *Nosema apis*, sondern auch *Nosema ceranae* in Frage (Higes, 2006). Bei *Nosema ceranae* handelt es sich um ein Mikrosporidium, das zuerst bei *Apis cerana* entdeckt wurde und Lichtmikroskopisch nicht von *Nosema apis* zu unterscheiden ist. In den letzten Jahren wurde *Nosema apis* zunehmend von *Nosema ceranae* verdrängt. Die Nosemainfektion ist mit *Nosema ceranae* nicht mehr so leicht zu diagnostizieren, da der Krankheitsverlauf kontinuierlicher über das gesamte Jahr ist und auch die typischerweise stark verkoteten Waben, wie nach einer starken *Nosama apis* Infektion, nicht zu beobachten sind. Am stärksten sind Arbeiterinnen befallen, weniger die Drohnen. Die Übertragung der Erreger erfolgt durch Gerätschaften des Imkers, kontaminierte Waben, durch Räuberei oder das Verfliegen einzelner Bienen. Typische Symptome der Nosemose sind Krabber, verstärktes Abkoten im und am Stock und ein erhöhter Abgang von infizierten Bienen verbunden mit einer verminderten Aufzucht von Jungbienen. Bei *Nosema ceranae* ist meist nur letzteres zu beobachten (Genersch, 2010a). Weitere Effekte der Nosemose auf die Honigbiene sind vorzeitiges Altern und damit verbunden eine verkürzte Lebensdauer, eine Verschiebung der Tätigkeiten der Arbeitsteilung innerhalb des Stockes, vermehrte Sammeltätigkeit bei Schlechtwetterbedingungen, Verlängerung der Flugzeiten, die wahrscheinlich mit einer verschlechterten Orientierung bzw. einem verminderten Heimfindevermögen zusammenhängen (Kralj und Fuchs, 2010).

### 1.2.5 Die Kalkbrut – eine Pilzkrankung der Honigbiene

Kalkbrut wird durch *Ascosphaera apis* hervorgerufen und ist weltweit verbreitet. Sie tritt meist im Frühjahr auf und wird durch kühle und feuchte Bienenstöcke begünstigt. Obwohl die Kalkbrut für die einzelne Larve tödlich ist, geht normalerweise nicht das gesamte Volk zugrunde. Aber die Anzahl der Bienen ist reduziert und damit verbunden die Produktivität des Volkes. Die konsumierten Sporen von *Ascosphaera apis* keimen im Darm aus. Die infizierte Larve stellt die Nahrungsaufnahme ein und der Pilz dringt vom Darm aus in andere Bereiche des Körpers ein. Der Tod ist Folge von mechanischen und enzymatischen Schädigungen der Larve. Da sich die Pilzsporen auf allen Dingen in einem Bienenstock und seinen Produkten (z.B. Wachs) ansammeln können und für 15 Jahre lebensfähig bleiben, können alle kontaminierten Gerätschaften als Langzeitquelle für Infektionen dienen. Die toten Larven sind meist ausgestreckt in aufrechter Position, auf Zellgröße angeschwollen und mit Pilzmycel bedeckt. Typisch sind aber die eingetrockneten Kalkbrutmumien (Arronstein und Murray, 2010).

Eine weitere Pilzkrankung der Bienenbrut ist die Steinbrut, die durch *Aspergillus flavus* hervorgerufen wird (Pohl, 1995).

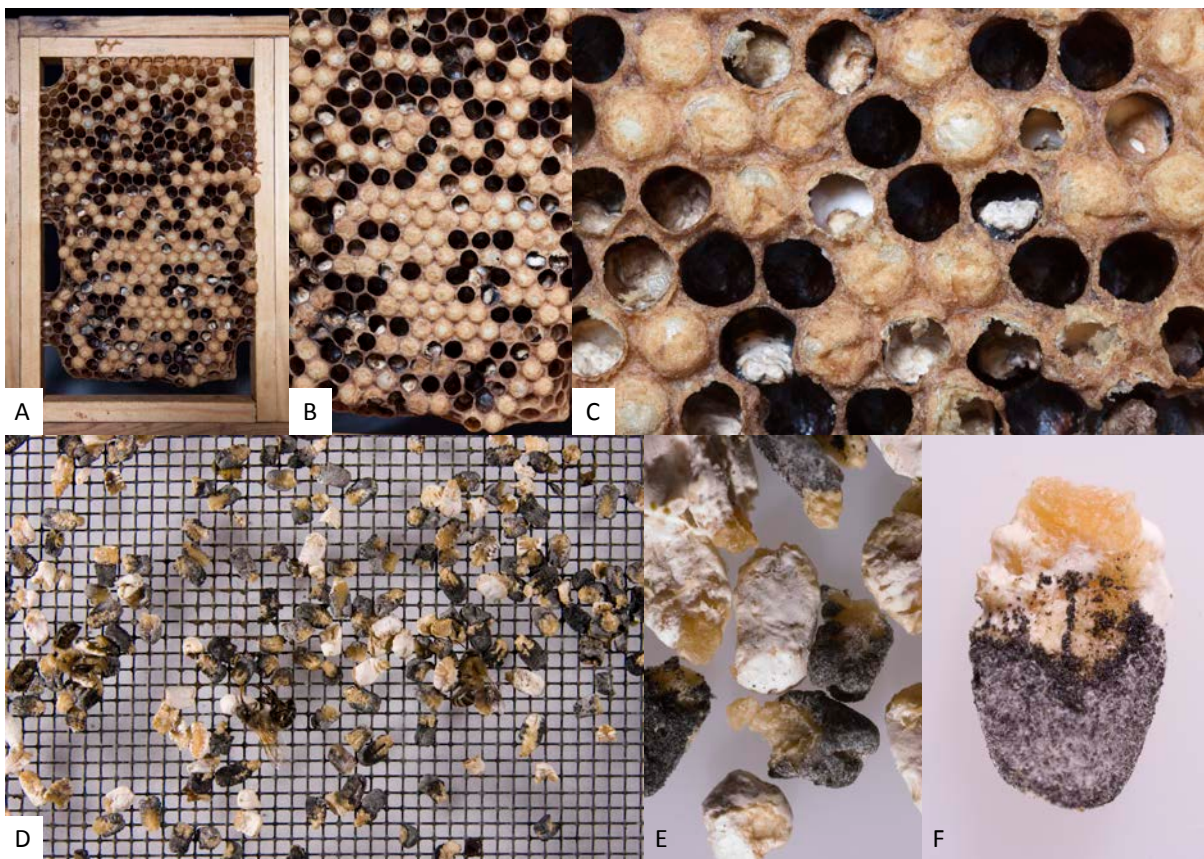
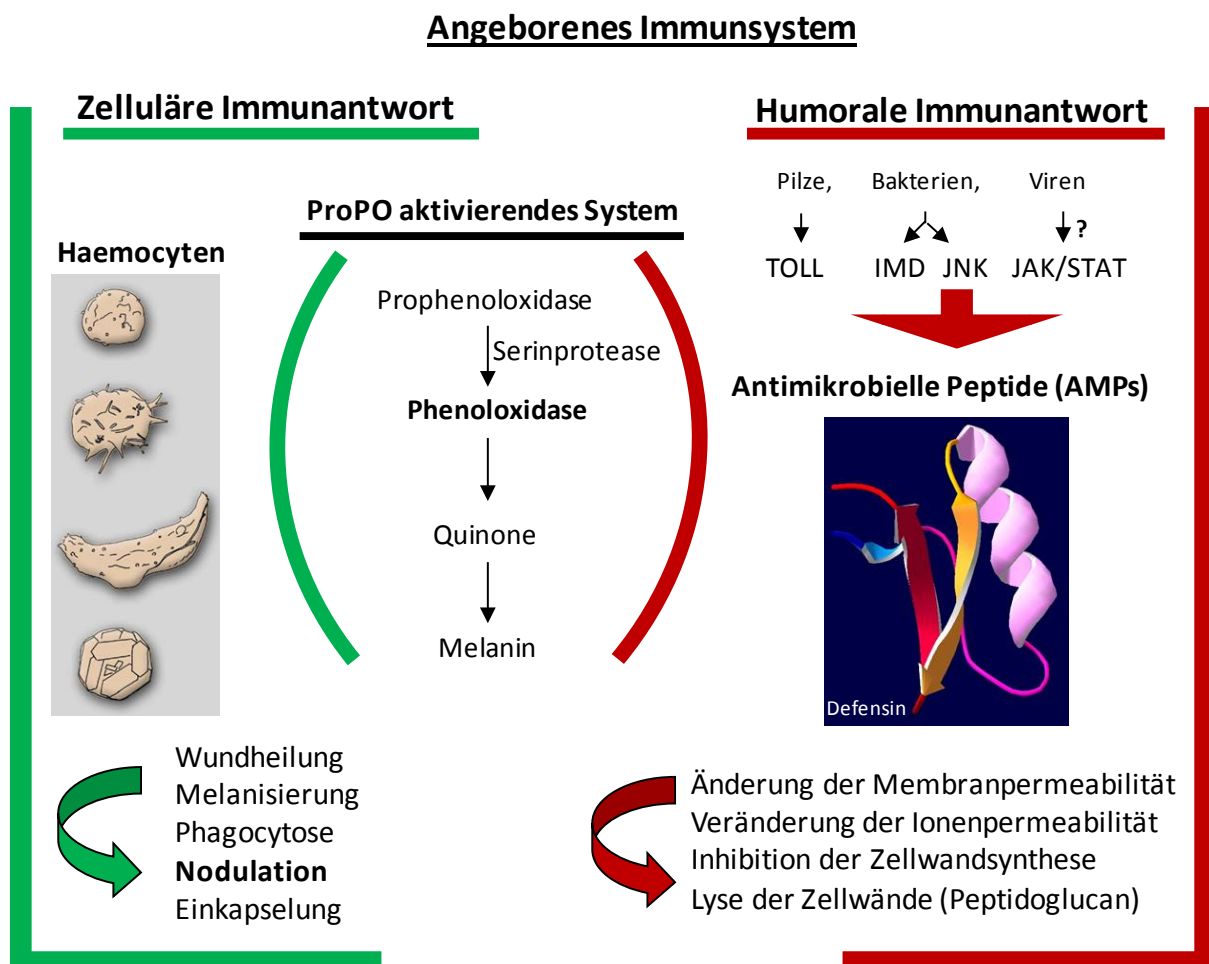


Abb. 6: Kalkbrut. A) Drahndrittel mit Kalkbrut infizierter Drahnenbrut. B+ C) Ausschnitte einer Wabe mit Kalkbrut infizierter Drahnenbrut. D) Bodengitter mit Kalkbrutmumien und toten Bienen. E) mehrere Kalkbrutmumien. F) Kalkbrutmumie mit Pilzmycel überzogen (weis) und schon teilweise mit Sporen besetzt (schwarz). Fotos: Helga R.Heilmann.

### 1.3 Das Immunsystem der Honigbiene

Die Honigbiene besitzt wie alle anderen Insekten ein angeborenes Immunsystem. Der Mensch hat zusätzlich zum angeborenen Immunsystem ein adaptives Immunsystem mit B- und T-Zellen. Das angeborene Immunsystem der Insekten teilt sich in die humorale (Synthese von AMPs) und die zelluläre Immunantwort (Phagozytose und Bildung von Noduli) auf. Diese Aufteilung ist eher willkürlich, da viele Prozesse der Immunantwort an beiden Immunantworten beteiligt sind. So regulieren humorale Immunfaktoren die Haemozytenaktivität, wobei die Haemocyten gleichzeitig Quelle einiger Abwehrmoleküle sind (Strand, 2008). Auch das ProPhenoloxidase aktivierende System ist beteiligt und verbindet gleichermaßen humorale und zelluläre Abwehrreaktionen wie die Melanisierung, Wundheilung, cytotoxische Reaktionen, Phagozytose, Einkapselung, Nodulation sowie das Aushärten und Färben der Kutikula (Marmaras und Lampropoulou, 2009).



### 1.3.1 Das humorale Immunsystem

Die humorale Immunantwort wird durch eine der vier Signalkaskaden TOLL, IMD, JNK, und JAK/STAT vermittelt an deren Ende die Antimikrobiellen Peptide stehen. Diese bewirken Änderungen in der Permeabilität von Membranzellwänden und/oder Ionen, inhibieren die Zellwandsynthese eingedrungener Mikroorganismen oder verursachen gar die Zellwandlyse bei Gram-positiven Bakterien. Es wurden in Insekten bislang mehr als 170 AMPs gefunden (Prusko, 2006), die mit wenigen Ausnahmen basische Moleküle von kleiner Größe sind und entsprechend ihrer biochemischen Zusammensetzung in drei Gruppen unterteilt werden können: (1) Lineare Peptide ohne Cystein, wie z.B. das Cecropin, (2) Lineare Peptide, die mit einer Aminosäure angereichert sind wie Glycin oder Prolin und (3) Peptide mit einer geraden Zahl an Cysteinresten resultierend in Innermolekularen Disulfidbrücken (Randolt et al., 2008). Die Signalkaskaden werden durch Zellwandbestandteile von Mikroben wie Lipopolysaccharide (LPS)(Gram-negativ), Peptidoglycane (PGN) (Gram-positive und Gram-negativ) und  $\beta$ -1,3 Glucane (Pilzzellwände) induziert (Marmaras, 1996; Randolt et al., 2008). Diese werden von PGRPs (Peptidoglycan Recognition Protein) und GNBP (Gram-negativ-binding Protein) erkannt, die an der Initiierung der Signalkaskaden beteiligt sind (Hoffmann, 2003) Für die Honigbiene konnten die vier AMPs Apidaecin (Casteels et al., 1989), Abaecin (Casteels et al., 1990), Hymenoptacin (Casteels et al., 1993) und Defensin 1 (Casteels-Josson et al., 1994) nachgewiesen werden.

### 1.3.2 Das ProPhenoloxidase aktivierende System

In der Haemolymphe von Invertebraten liegt die Phenoloxidase (PO) in der inaktiven Vorläuferform der ProPhenoloxidase (ProPO) vor und wird durch Serinproteinasen aktiviert (Söderhäll und Cerenius, 1998). Pathogen assoziierte Molekulare Muster (PAMPS) z.B. LPS (Gram-negative Bakterien), PGN (Gram-positive Bakterien) oder  $\beta$ -1,3 Glucan (Pilze) werden unter anderem durch PGRPs gebunden. Hierdurch wird die Serinproteinasen Kaskade initiiert und ProPO in das katalytisch aktive PO umgewandelt. Dadurch werden Cytotoxische Stoffe und die Melaninproduktion generiert. Zelluläre Abwehrmechanismen wie die Einkapsulierung von Pathogenen werden unterstützt (Cerenius et al., 2008). Die Phenoloxidase der Honigbiene wird wie die anderer Insekten auch durch Proteaseinhibitoren und Phenylthiourea (PTU) gehemmt und durch Trypsin aktiviert (Zufelato et al., 2004). Die Phenoloxidase ist nicht nur an der Immunantwort, sondern auch an der Melanisierung und dem Aushärten der Cuticula beteiligt (Zufelato et al., 2004; Lourenço et al., 2005).

### 1.3.3 Das zelluläre Immunsystem

Wundheilung, Melanisierung, Einkapselung, Phagozytose und Nodulation sind die Hauptkomponenten des zellulären Immunsystems. Zelluläre Abwehrmechanismen sind durch die direkte Interaktion der Haemozyten mit den Eindringlingen (Pathogene) gekennzeichnet. Kleine Pathogene wie Bakterien werden durch Phagozytose oder Nodulation eliminiert und große Pathogene wie Parasiten durch Einkapsulierung, indem diese in mehrere Zellschichten eingeschlossen werden (Pech und Strand, 1995). An der Einkapsulierung sind mehrere Zelltypen beteiligt (Plasmatozyten und Granulozyten), die in einem hoch koordinierten Prozess miteinander interagieren (Trenczek, 1998). Die Nodulation beginnt mit einer Mikroaggregation, die an einem Bakterium haftet, anwächst und zuletzt von Plasmatozyten umschlossen und melaniert wird durch das Aktivieren des ProPhenoloxidase Systems (Stanley, 2011). Nodulation und Einkapsulierung sehen von außen nahezu gleich aus, da sie im Gegensatz zur Phagozytose aus überlappenden Zellschichten bestehen, die in manchen Insekten melanisieren, aber unterschiedlich große Pathogene als Ziel haben (Lavine und Strand, 2002). Einige Faktoren wie Ersticken, Produkte der ProPhenoloxidase Kaskade und AMPs werden als tötende Agenzien bei der Einkapsulierung angesehen (Nappi und Christensen, 2005; Strand, 2008). Die Melanisierung scheint aber nicht nur cytotoxische Funktion zu haben, sondern schützt auch den Wirt vor Schädigungen, die durch das Abtöten des Pathogens entstehen können (Nappi und Christensen, 2005). Die Plasmatozyten, die *in vitro* stark adhaesiv sind, stellen 90-95% aller Haemocyten und fungieren als Phagocyten, die Pathogene, tote Zellen und anderes einschließen (Strand, 2008).

Die Haemozyten der Insekten erkennen eine Vielzahl von Fremdstoffen und Organismen als Fremd. Sowohl humorale, als auch Zelloberflächenrezeptoren sind an dieser Erkennung von Fremd und Selbst beteiligt (Lavine und Strand, 2002). Einige Studien deuten darauf hin, dass sich die Zahl der frei zirkulierenden Haemozyten stark ändern kann als Antwort auf Stress, Verletzung oder Infektion (Strand, 2008). Während AMPs der humoralen Immunantwort erst 6-12 Stunden nach Infektion in der Haemolymphe auftauchen, beginnt die zelluläre Immunantwort sofort nach Kontakt. Hierbei werden in den ersten zwei Stunden nach bakterieller Infektion die meisten Bakterien eliminiert (Stanley, 2011).

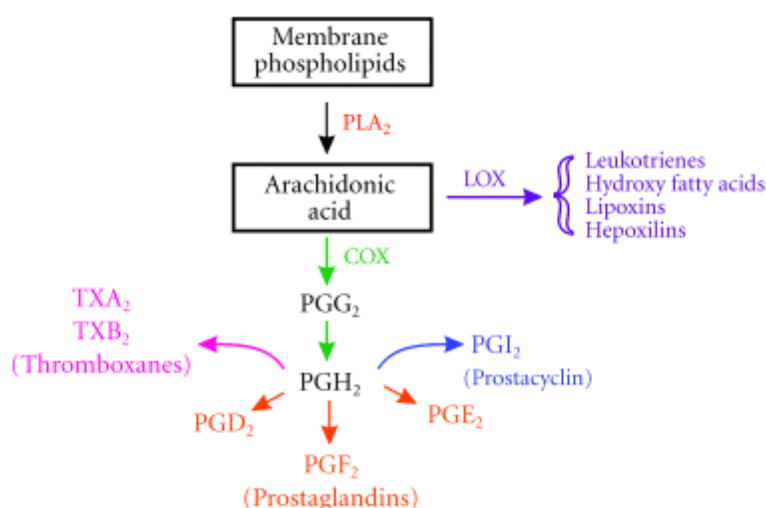


Abb. 8: Eicosanoid-Biosynthese.

Die Membranphospholipide werden nach einer Zellstimulierung entlassen. Die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) katalysiert die Hydrolyse der Membranphospholipide zu Arachidonsäure. Diese wird auf dem COX Pfad zu Prostaglandinen oder auf dem LOX Pfad zu oxygenierten Produkten. Der Epoxygenase Pfad über cytochrom-p450-epoxygenase wurde bisher nicht in Insekten gefunden und wird daher hier nicht gezeigt. TX = Thromboxan; PG= Prostaglandin;

Eicosanoide sind Metabolite der Arachidonsäure und zweier anderer ungesättigter C20 Fettsäuren, die an einigen zellulären Abwehrmechanismen, wie der Phagozytose, Mikroaggregationen, der Nodulation, der Einkapsulierung, der Zelladhäsion, der Haemozytenwanderung, der Entlassung von Prophenoloxidasen aus Oenozytoiden oder der Elongation von Plasmatozyten beteiligt sind (Stanley, 2011). Es sind drei Gruppen von Eicosanoiden bekannt und zwar die Prostaglandine (Cyclooxygenase (COX) Produkte), die Lipoxygenase (LOX) Metabolite und die Epoxyeicosatriene (bisher nicht in Insekten) (Stanley und Miller, 2006). Einige pathogene Bakterien unterdrücken die Wirtsantwort indem sie eine Schlüsselstelle der Eicosanoid-Biosynthese, nämlich die Phospholipase A<sub>2</sub> hemmen (Stanley, 2011).

## 1.4 Wespen

Das Kennzeichen der Hautflügler mit 11000 Arten in Mitteleuropa sind die vier häutigen Flügel. Fast alle Gruppen innerhalb dieser Insektenordnung tragen den Begriff „Wespen“ in ihrem Namen, unabhängig von dem Vorhandensein einer sogenannten „Wespentaille“. Zu ihnen gehören unter anderem die Pflanzenwespen, Schlupfwespen, Gallwespen, Dolchwespen, Wegwespen und Faltenwespen (Westrich, 2011).

Tabelle 1: Wespenarten und ihre Charakteristika zusammengestellt nach Witt (2009) und Westrich (2011)

| Unterfamilie<br>Vespinae                           | Art   | Volksstärke                  | Aktivität                   | Höhlen-<br>nister | Freinister     | Größe                                   |
|--|---|------------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------|---|
| Gattung<br><i>Vespa</i>                            | <i>Vespa crabro</i><br><b>Hornisse</b>                                    | 100 – 700<br>max. 1700       | ca. Mitte<br>IV<br>- Ende X | ja<br>o<br>u      | ja<br>(selten) | K: 25-35 mm<br>D: 21-28mm<br>A: 18-25mm |
| Gattung<br><i>Dolichovespula</i><br>Langkopfwespen | <i>D. media</i><br>(RETZIUS, 1783)<br><b>Mittlere Wespe</b>               | 150-500<br>max. 900-<br>1700 | Ende IV -<br>Mitte IX       | nein              | ja             | K: 18-22mm<br>D + A:<br>15-19mm         |
|  | <i>D. norwegica</i><br>(FABRICIOUS, 1781)<br><b>Norwegische<br/>Wespe</b> | 200-300<br>max. 1500         | Ende IV -<br>Ende VIII      | nein              | ja             | K: 15-18mm<br>D: 13-15mm<br>A: 11-14mm  |
|  | <i>D. saxonica</i><br>(FABRICIOUS, 1793)<br><b>Sächsische Wespe</b>       | 100 – 300<br>max. 1000       | Ende IV -<br>Ende VIII      | ja<br>o           | ja             | K: 15-18mm<br>D: 13-15mm<br>A: 11-14mm  |
|  | <i>D. sylvestris</i><br>(SCOPOLI, 1763)<br><b>Waldwespe</b>               | 300 – 800                    | Ende IV -<br>Ende VIII      | ja<br>o<br>u      | ja             | K: 15-19mm<br>D: 14-16mm<br>A: 13-15mm  |
| Gattung<br><i>Vespula</i><br>Kurzkopfwespen        | <i>Vespula rufa</i><br>(LINNAEUS, 1758)<br><b>Rote Wespe</b>              | 100 – 350<br>Max. 700        | Ende IV -<br>Ende VIII      | ja<br>u           | nein           | K: 16-20mm<br>D: 13-16mm<br>A: 10-14mm  |
|  | <i>V. germanica</i><br>(THOMSON, 1869)<br><b>Deutsche Wespe</b>           | 1000 - 10000                 | Anf. V -<br>Mitte XI        | ja<br>o<br>u      | nein           | K: 17-20mm<br>D: 13-17mm<br>A: 12-16mm  |
|  | <i>V. vulgaris</i><br>(LINNAEUS, 1758)<br><b>Gemeine Wespe</b>            | 1000 - 10000<br>max. 12000   | Anf. V -<br>Mitte XI        | ja<br>o<br>u      | nein           | K: 16-19mm<br>D: 13-17mm<br>A: 11-14mm  |
| -Erläuterungen:                                    | o = oberirdischer Neststandort<br>u = unterirdischer Neststandort         |                              |                             |                   |                | K= Königin<br>D=Drohne<br>A=Arbeiterin  |



Eine eusoziale Lebensweise kommt bei Wespen in Deutschland ausschließlich bei den Faltenwespen (Vespidae) vor, deren charakteristisches Merkmal in Deutschland die Längsfaltung der Vorderflügel ist. Die betreffenden 12 Vertreter gehören den Unterfamilien der Echten Wespe (Vespinae) und Feldwespen (Polistinae) an. Außerhalb Europas sind auch eusoziale Grabwespenarten bekannt (Witt, 2009).

Wespen der Art *Dolichovespula saxonica* sind primitiv eusozial, da sie ein Volk mit zwei Generationen (Mutter Töchter Gesellschaft), ausgeprägte Arbeitsteilung und Kastenbildung mit unfruchtbaren Arbeiterinnen und einer sich fortpflanzenden Königin und einjährige Staaten in einem Nest aufweisen.

Die Deutsche Wespe *Vespula germanica* kann schon zu den hoch eusozialen Arten gerechnet werden, da die Königinnen in wärmeren Klimazonen mehrjährige Nester und Staaten bilden können. Selbst soziale Nestgründungen, bei denen eine junge Königin mit einem Teil der Arbeiterinnen einen neuen Staat bildet, sollen partiell auftreten. (Witt, 2009)

Auf molekularbiologischer Ebene wurde bei Wespen bisher meist mit der parasitischen Wespe *Nasonia vitripennis* gearbeitet, die leicht in Laboren gehalten werden können.

Das gesamte Genom und die Proteinzusammensetzung der Haemolymphe sind bei *Nasonia vitripennis* bekannt. Die Haplo-Diploidie, die auch bei der Honigbiene *Apis mellifera* vorliegt, kann bei diesem Modellorganismus zudem sehr gut untersucht werden (Werren und Loehlin, 2009).

Bei Bienenwölfen, die zu den Grabwespen (Crabronidae) gehören, wurde gefunden, dass sie eine Symbiose mit Bakterien (*Streptomyces* spp.) eingehen, mit denen sie ihre Nisthöhle auskleiden. Diese befinden sich dann später auf dem Kokon der Puppe und schützen diese z.B. vor Pilzbefall. In der adulten Grabwespe sind diese Bakterien in den Antennen in speziellen Drüsen zu finden (Kroiss et al., 2010; Kaltenpoth et al., 2010).



Abb. 9: Nest von *Dolichovespula saxonica* an der Bienenstation der Universität Würzburg (Foto: Heike Gätschenberger).

## 1.5 Wildbienen – Solitärbienen

Die Honigbiene ist nur eine von über 550 allein in Deutschland nachgewiesenen Bienenarten, von etwa 580 in der Schweiz und von 690 Arten in Österreich. Weltweit sind bislang über 16000 verschiedenen Arten beschrieben worden (Westrich, 2011). Sie weisen eine außerordentliche Vielfalt an Farben und Körperformen. Die Wildbienen, die in Deutschland heimisch sind, gehören zu den Familien der Ur- und Seidenbienen (Colletidae) mit 38 Arten in 2 Gattungen, den Sand- oder Erdbienen (Andrenidae) mit 113 Arten in 4 Gattungen, den Furchen- oder Schmalbienen (Halictidae) mit 116 Arten in 9 Gattungen, den Sägehorn-, Hosen- und Schenkelbienen (Melittidae) mit 11 Arten in 3 Gattungen, den Mauer-, Mörtel- und Blattschneiderbienen (Megachilidae) mit 96 Arten in 11 Gattungen und den Echten Bienen (Apidae) mit 137 Arten in 16 Gattungen (Hintermeier und Hintermeier, 2009).

Die genaue Bestimmung der einzelnen Arten (Größe von 0,2- 3cm) ist schwierig und oft nur durch winzige, häufig verborgene Merkmale mit dem Stereomikroskop anhand eines Bestimmungsschlüssels möglich. Viele Arten, wie z.B. *Osmia bicornis* (aktuell) und *Osmia rufa* (alt) wurden im Laufe der Zeit mehrfach beschrieben und es waren bzw. sind mehrere Namen in Gebrauch. Die gehörnte Mauerbiene und die Rostrote Mauerbiene sind in Deutschland häufig und werden im Obstbau als Blütenbestäuber eingesetzt.

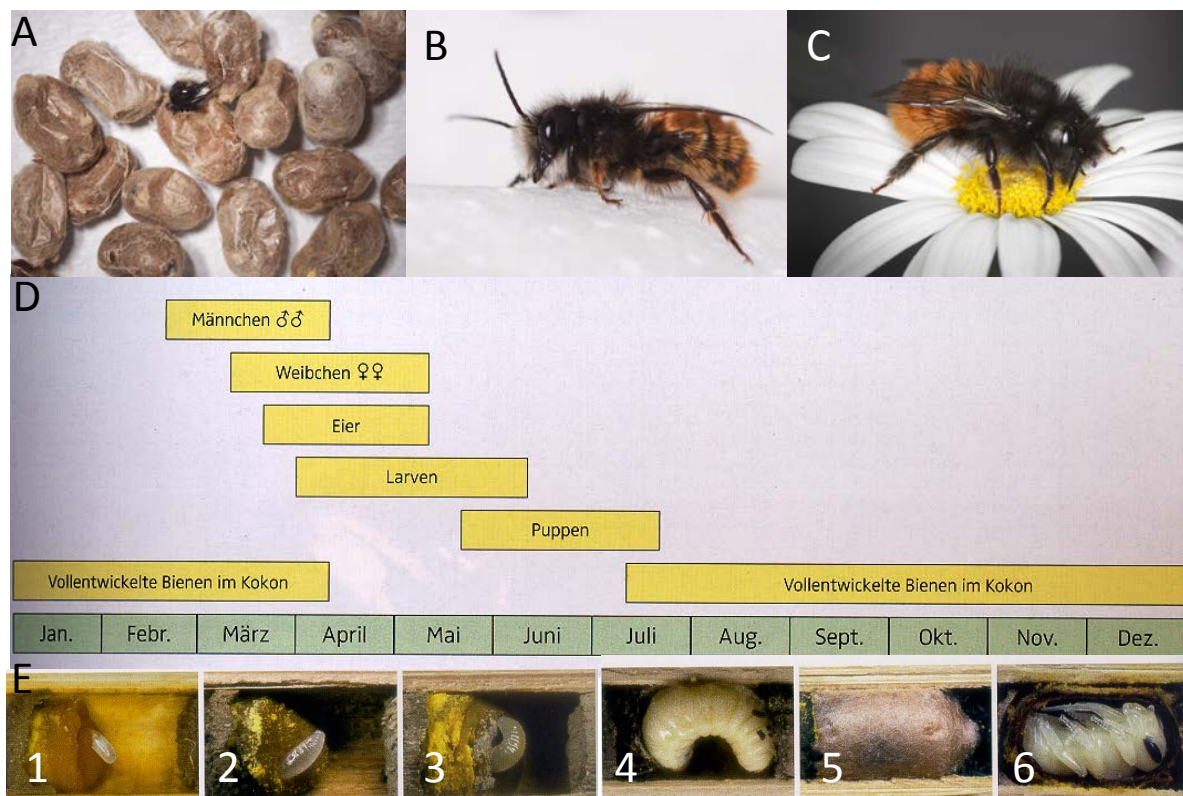


Abb. 10: Entwicklungsstadien der gehörnten Mauerbiene *Osmia cornuta*. A) Kokons von *Osmia cornuta*, wie man sie von der WAB Mauerbienenzucht erhält. Männchen beim Schlüpfen aus dem Kokon. Die Mauerbienen überwintern vollentwickelt im Kokon bis ins Frühjahr. B) Männchen nach dem Schlupf und C) Weibchen von *Osmia cornuta* auf einer Chrysanthenblüte. Fotos: H.R. Heilmann und Heike Gätschenberger D) Der Entwicklungszyklus von *Osmia cornuta* (Westrich, 2011 S.25). E) Die Entwicklung vom Ei bis zur Imago (Westrich, 2001, S.24). 1) Zelle mit Ei, 2) Frisch geschlüpfte Larve, 3) Drei Tage alte Larve, die mit ihrem Hinterleib am Pollenvorrat „klebt“ und nach und nach den Vorrat verzehrt, 4) Ausgewachsene Larve, die den gesamten Vorrat verzehrt und den Darm entleert hat und nun bereit ist sich in einem Kokon einzuspinnen, 5) Kokon mit Larve im Inneren, 6) Puppe im Kokon.

Die gehörnte Mauerbiene *Osmia cornuta* (Latreille, 1805) und die rostrote Mauerbiene *Osmia bicornis (rufa)* gehören wie die Honigbiene zu den polylektischen Arten, d.h. zu den Pollengeneralisten. Es sind beides typische Solitärbiene, bei denen es keinen Kontakt zwischen den Generationen gibt, was auch für das Larvenstadium zutrifft. Jedes Weibchen baut für sich über vier bis sechs Wochen Brutzelle für Brutzelle an seinem Nest, bei dem es sich zumeist um Linienbauten handelt. Jede Brutzelle wird mit einem Pollen und Nektarvorrat ausgestattet auf den das Ei gelegt wird (Abb. 10 E 1). Die Eier von *Osmia bicornis* sind im Gegensatz zu den Eiern von *Osmia cornuta* mit Pollen bestäubt. Eine Brutzelle wird zur nächsten durch eine dünne Wand aus Lehm abgeteilt. Zuerst werden die Brutzellen mit den befruchteten Eiern aus denen die Weibchen schlüpfen mit einer größeren Verproviantierung angelegt und dann die mit den unbefruchteten Eiern, aus denen die Männchen entstehen, da diese vor den Weibchen schlüpfen und so der Weg aus dem Nest dann für die Weibchen frei ist.



Abb. 11: Die rostrote Mauerbiene *Osmia bicornis*. A) Weibchen B) Kokons von *Osmia bicornis*, wie sie von der WAB-Mauerbienenzucht geliefert wurden. C) Weibchen beim Pollen und Nektarsammeln. Es ist deutlich gelber Pollen in der Bauchbürste zu erkennen (roter Pfeil). Mauerbienen gehören zu den Bauchsammlern. Manche Parasiten entwickeln sich schwer von außen erkennbar innerhalb der Bienenkokons wie z.B. die Erzwespe *Monodontomerus obsoletus* (WAB-Mauerbienenzucht, 2009). D) Ein mit Parasiten befallener Kokon von *Osmia bicornis*, der geöffnet wurde. Fotos: H.R. Heilmann und Heike Gätschenberger.

Die Weibchen von *Osmia cornuta* (12-16 mm) legen bis zu 12 Brutzellen hintereinander an und die von *Osmia bicornis* (10-12mm) Nester mit bis zu 20 Brutzellen. Die kleineren Männchen der beiden Arten sind durch ihre weiße Gesichtsbehaarung und die längeren Fühler (13 Glieder) leicht von den Weibchen (12 Fühlerglieder) zu unterscheiden. Sowohl *Osmia cornuta* und *Osmia bicornis*, die in ihrer Entwicklung sehr ähnlich sind, weisen eine hohe Flexibilität bei der Wahl ihres Nistplatzes auf. *Osmia cornuta* sind von Februar/März bis Anfang Mai aktiv. Die adulten Tiere von *Osmia bicornis* sind dahingegen erst von Anfang April bis Mitte Juni anzutreffen. (Westrich, 2011)

Sowohl Kuckucksbienen, Fruchtfliegen, Schlupfwespen als auch die Goldwespe gehören zu den Parasiten der Mauerbienen. Zu diesen Brutparasiten kommen noch verschiedene Vogelarten, Mäuse, Maulwürfe sowie Dachse und Igel zu den Feinden der Mauerbienen hinzu je nach Standort ihres Nestes (Hintermeier und Hintermeier, 2009).

## 1.5 Hummeln

Es gibt über 250 Hummelarten auf der Welt, deren Hauptverbreitungsgebiet die gemäßigten Klimazonen der nördlichen Breiten sind. In Mitteleuropa sind etwa 30 Hummelarten heimisch. Die Identifizierung der einzelnen Hummelarten kann mitunter sehr schwierig sein, da sie nicht leicht zu unterscheiden sind oder wie im Fall der Veränderlichen Hummel *Bombus*



Abb. 12: *Bombus terrestris* (Foto: H.R.Heilmann).

*humilis* unterschiedlich gefärbte Arbeiterinnen und Drohnen hat. Anhand der Kopflänge werden die Hummeln in Langkopfhummeln (z.B. *B. hortorum*) mit einer Rüssellänge von bis zu 20 mm und die Kurzkopfhummeln unterteilt. Zu den Kurzkopfhummeln gehört die Erdhummel (*B. terrestris*) mit einer Rüssellänge von ca. 10mm. Im Hummelvolk ist die Arbeitsteilung, nicht wie bei den Honigbienen altersabhängig, sondern von der Größe der Hummel. Die Größe wird durch die Lage der Larve im Nest determiniert (Couvillon und Dornhaus, 2009). Große Arbeiterinnen sind eher Sammlerinnen und kleine Arbeiterinnen führen tendenziell eher Arbeiten im Nest aus. Wobei größere Sammlerinnen wiederum eine höhere Sammelrate aufweisen als kleine (Spaethe und Weidenmüller, 2002). Hummeln besitzen einen haplodiploiden Erbgang mit einer einfach verpaarten Königin, die als einzige überwintert. Drohnen sind am Ende der Hummelsaison im Nest anzutreffen, wenn auch die Jungköniginnen fürs kommende Jahr da sind. Hummeldrohnen helfen beim Wärmen der Brut mit, wobei sie nicht in der Lage sind die Nesttemperatur zu regulieren. Sie haben mit 13 Gliedern statt 12, längere Antennen und ihnen fehlt der Pollensammelapparat im Gegensatz zu den Arbeiterinnen. Ihre Hauptaufgabe ist die Begattung junger Königinnen (Röseler, 2005). Der Körperbau der Hummeln unterscheidet sich kaum von dem der Honigbiene *Apis mellifera*. Durch unterschiedliche Schwellenwerte bezüglich Temperatur und CO<sub>2</sub> gelingt es den Hummelarbeiterinnen das Nest kollektiv zu klimatisieren (Weidenmüller, 2004)

Die dunkle Erdhummel *Bombus terrestris* ist eusozial mit einjährigen Kolonien von 50 - 500 Tieren bei denen nur die Königin überwintert (Röseler, 2001). Sie weist einen starken Größenpolimorphismus zwischen den einzelnen Arbeiterinnen auf (Goulson, 2010). Den Erfolg einer Hummelkolonie bestimmt nicht allein das Angebot an Futter und dessen Verfügbarkeit, sondern auch dass jede einzelne Hummel Wirt für viele Parasiten (z.B. *Critithidia bombi*) und Krankheiten sein kann, die ihr Leben und die Reproduktion der Kolonie beeinflussen (Schmid-Hempel und Schmid-Hempel, 1998).

## 1.6 Aufgabenstellung der Arbeit

Hauptaspekt dieser Arbeit ist die Aufklärung der Immunantworten von Drohnen, die im Gegensatz zu denen der Arbeiterinnen der Honigbiene kaum bekannt sind. Bei Drohnen wurde meist die Physiologie, ihr Flugverhalten, ihre Thermoregulation oder aber die Samenqualität untersucht.

Aufgrund der relativ kurzen Zeitspanne, die Drohnen während des Frühsommers anwesend sind und ihrer eingeschränkten Aufgaben (Begattung von Jungköniginnen) im Bienenvolk, stellte sich die Frage, ob Drohnen überhaupt das Potential für energieaufwendige Immunantworten besitzen. Deshalb werde ich ein breites Spektrum von Abwehrreaktionen untersuchen, die sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems umfassen. Ein besonderes Anliegen wird sein, die Immunreaktionen aller drei Entwicklungsstadien (Larve, Puppe und Imago) zu vergleichen.

Als Voraussetzung für die Untersuchung konstitutiver und induzierbarer Abwehrreaktionen in Larven soll eine Methode zur künstlichen Aufzucht von Drohnenlarven etabliert werden. Infektionen werden durch die artifizielle Injektion des Gram-negativen Bakteriums *E.coli* und bakterieller Zellwandbestandteile simuliert.

Die Endprodukte der humoralen Immunreaktionen sind antimikrobielle Peptide (AMPs), die von Fettkörperzellen oder Haemozyten in die Haemolymphe abgegeben werden. Daher werde ich hauptsächlich Haemolymphproteine/-peptide mittels ein- und zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließender nano HPLC/MS analysieren.

Bei den zellulären Abwehrreaktionen werde ich mich vor allem auf die Etablierung und den Nachweis von Nodulationsreaktionen konzentrieren.

Schließlich sollen auch noch mögliche Immunreaktionen von verwandten eusozialen Insekten (z.B. *Bombus terrestris*) und von solitären Wildbienen untersucht und mit denen der Honigbiene verglichen werden.

## 2. Materialien

### 2.1 Verwendete Bienen und andere Hymenopteren

#### ***Apis mellifera carnica***

Standort: Bienenstation Universität Würzburg am Hubland

Völker im Freiland in Zander Holzbeuten mit zehn Waben im Kaltbau und offenem Gitterboden → Kontrollvölker Würzburg

3 „Gotlandvölker“

Die Königinnen dieser Völker sind Nachkommen von Völkern, die auf Gotland einer natürlichen Selektion für Varroatoleranz ausgesetzt waren (Fries et al., 2006).

#### ***Osmia rufa* und *Osmia cornuta***

von der WAB-Mauerbienenzucht

#### ***Vespula germanica***

Freiland Bienenstation Universität Würzburg

#### ***Dolichovespula saxonica***

Nest, Bienenstation Universität Würzburg

#### ***Bombus terrestris***

Völker Zoologie II Universität Würzburg

### 2.2 Bakterienstämme und Medien für die Bakterienkultur

*Escherichia coli* 682, DSM-Nr. 682

Deutsche Sammlungen von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DMSZ)

*Micrococcus flavus*

Institut für Mikrobiologie, Universität Würzburg

#### **LB (lysogeny broth) – Medium (flüssig)**

10 g Bacto Trypton

5 g Yeast Extract

10 g NaCl

mit deion H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen und unter Rühren lösen

Medium danach autoklavieren

#### **LB – Agar – Platten**

Grundrezept LB – Medium flüssig

10 g Bacto Agar

mit deion H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen und unter Rühren lösen

→ 1 % Platten

Autoklavieren und hinterher auf ca. 60°C abkühlen lassen, auf Petrischalen gleichmäßig verteilen und vollständig auskühlen lassen

**NB (nutrient broth)-Medium (flüssig)**

5g Bacto Peptone

5g Nutrient Broth

10g NaCl

mit deion H<sub>2</sub>O auf 1l auffüllen und unter Rühren lösen

Medium danach autoklavieren

**2.3 Chemikalienliste**

|  |  |
|--|--|
| Albumin Fraktion V Proteasefrei (BSA)          | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. T844.2                   |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS)                    | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 9592.2                   |
| Apiinvert                                      | Südzucker AG, Mannheim                             |
| Aprotinin                                      | Sigma-Aldrich, Taufkirchen;<br>Art.-Nr. A4529-10MG |
| Arachidonsäure                                 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen;<br>Art.-Nr. A3555-50mg |
| Bacto Peptone                                  | BD GmbH, Heidelberg; Art.-Nr. 0118-17-0            |
| Bacto™ Agar                                    | BD GmbH, Heidelberg; Art.-Nr. 214010               |
| Bacto Yeast Extract                            | BD GmbH, Heidelberg; Art.-Nr. 212750               |
| Bacto™ Tryptone                                | BD GmbH, Heidelberg; Art.-Nr. 211705               |
| Bromphenolblau                                 | Riedel-deHaën, Seelze; Art.-Nr. 32712              |
| Chlor-Reinigungs-und<br>Desinfektionstabletten | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. C787.1                   |
| D(-)-Fructose                                  | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 4981.1                   |
| DeStreak Rehydration Solution                  | GE Healthcare, München; Art.-Nr. 17-6003-19        |
| Dexamethasone crystalline                      | Sigma, München; Art.-Nr. D1756-25MG                |
| di-Natriumhydrogenphosphat                     | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. P030.1                   |
| DTT (1,4-Dithiothreit)                         | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 6908.3                   |
| ECL™ Western Blotting Detection Reagents       | GE Healthcare, München; Art.-Nr. RPN2209           |
| Essigsäure                                     | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 3738.2                   |
| Ethanol 96 %, vergällt                         | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. T171.3                   |
| Ethanol 99,8 % p.a.                            | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 9065.1                   |
| Gelee-Royale 100 % rein                        | Werner Seip Bienenzuchtbedarf                      |
| Glycerin 86 % p.a.                             | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 4043.1                   |
| Glycin   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 3908.2                   |
| IEF Marker 3-10, Liquid mix                    | Serva, Heidelberg; Art.-Nr. 39212.01               |
| Indomethacin crystalline                       | Sigma, München; Art.-Nr. I7378-5G                  |
| Insulin β                                      | Sigma, München Art.-Nr. I6383-5MG                  |
| Iodacetamid                                    | GE Healthcare, München; Art.-Nr. RPN6302           |
| IPG Buffer pH 3-11 NL                          | GE Healthcare, München; Art.-Nr. 17-6004-40        |
| Kaliumchlorid                                  | Merck, Darmstadt; Art.-Nr. 4936                    |
| Kaliumdihydrogenphosphat                       | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 618.1                    |

|  |   |
|--|---|
| Kaliumhydroxid   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr.6751.1                   |
| Kanamycinsulfat  | Sigma, München; Art.-Nr. K1876                    |
| Laminarin ( <i>Laminaria digitata</i> )  | Sigma, München; Art.-Nr. L9634                    |
| L-DOPA (3,4-Dihydroxy-L-Phenyl-Alanin)   | Sigma, München; Art.-Nr. D9628-5G                 |
| Lipopolysaccharid ( <i>E.coli</i> 0111:B4),<br>via Phenolextraktion aufgereinigt             | Sigma, München; Art.-Nr. L2630-25MG               |
| Lipopolysaccharid ( <i>E.coli</i> 0111:B4),via<br>Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt | Sigma, München; Art.-Nr. L3012-5MG                |
| Lysozym  | Roche, Mannheim; Art.-Nr. 1243004                 |
| 2 (β)- Mercaptoethanol   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 4227.1                  |
| Methanol   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 4627.5                  |
| Milchpulver Blotting Grade   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr.T145.2                   |
| Natriumchlorid   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr.3957.2                   |
| Natriumhydroxid  | Merck, Darmstadt; Art.-Nr.1.06462.1000            |
| Nutrient Broth   | BD GmbH, Heidelberg; Art.-Nr. 234000              |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder   | Fermentas, St. Leon Rot; Art.-Nr. SM0671          |
| PageRuler™ Unstained Protein Ladder  | Fermentas, St.Leon Rot; Art.-Nr. SM0661           |
| Peptidoglycan from <i>M.Luteus</i>   | Sigma, München; Art.-Nr. 53243-10MG-F             |
| Phenidone (1-phenyl-3-pyrozolidinon)   | Sigma, München Art.-Nr. 127914-25G                |
| Phenylthiourea (PTU)   | Sigma, München; Art.-Nr. P 7629-10G               |
| Phosphorsäure 85 %   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 6366.1                  |
| Protein Test Mischung 4  | Serva, Heidelberg; Art.-Nr. 39208                 |
| Protein Test Mischung 5  | Serva, Heidelberg; Art.-Nr. 39209                 |
| RNAlater   | Applied Biosystems, Darmstadt;<br>Art.-Nr. AM7020 |
| Roti-Blue x 5  | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. A152.1                  |
| Rotiphorese Gel A (Acrylamid)  | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 3037.1                  |
| Rotiphorese Gel B (Bisacrylamid)   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 3039.1                  |
| 32 % Salzsäure   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr.P074.1                   |
| SDS ultra pure   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 2326.2                  |
| Serva Blau G250  | Serva, Heidelberg; Art.-Nr. 35050                 |
| Serva Blau R250  | Serva, Heidelberg; Art.-Nr. 35051                 |
| Temed  | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 2367.3                  |
| Thiourea   | GE Healthcare, München; Art.-Nr. RPN6301V         |
| Tricine  | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 37195                   |
| Tris   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 5429.3                  |
| Tween 20   | Appllichem, Darmstadt; Art.-Nr. A1389,0500        |
| Unstained Protein Molecular weight Marker  | Fermentas, St. Leon Rot; Art.-Nr. SM0431          |
| Unstained SDS PAGE Protein Marker<br>6, 5-200 KDa, Liquid Mix                                | Serva, Heidelberg; Art.-Nr. 39215.01              |
| Vaseline   | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr.E746.1                   |
| A-D(+)-Glucose Monohydrat  | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 6780.1                  |



## 2.4 Puffer und molekulare Längenstandards

### PBS (0,15M pH7,2)

|           |                                  |
|-----------|----------------------------------|
| 4 g       | NaCl                             |
| 0,1 g     | KCl                              |
| 0,72 g    | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
| 0,12 g    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |
| pro 500ml |                                  |

⇒ pH 7,5 (ohne Zugabe von HCl)

### Tris – Puffer

|                  |       |
|------------------|-------|
| Tris-HCl, pH 8,8 | 1,5 M |
| Tris-HCl, pH 6,8 | 0,5 M |

### Molekulare Längenstandards:

Protein Test Mischung mit der Konzentration 1mg/ml in Dissoziationspuffer (Tabelle 5) lösen.

### Protein Test Mischung 4 → M high (Serva, Art.-Nr. 39208)

| <u>Proteinkomponenten</u> | <u>Molekulargewicht in kDa</u> |
|---------------------------|--------------------------------|
| Phosphorylase B           | 97,4                           |
| Rinder-Albumin            | 67                             |
| Albumin aus dem Ei        | 45                             |
| Carboanhydrase            | 29                             |

### Protein Test Mischung 5 → M low (Serva, Art.-Nr. 39209)

| <u>Proteinkomponenten</u>        | <u>Molekulargewicht in kDa</u> |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Carboanhydrase                   | 29                             |
| Trypsininhibitor der Sojabohne   | 21                             |
| Cytochrom C                      | 12,5                           |
| Trypsininhibitor der Rinderlunge | 6,5                            |
| <b>Insulin β-Kette</b>           | 3,5                            |
| (Sigma, Art.-Nr. I6383-5MG)      |                                |

**Serva Unstained SDS PAGE Protein Längenstandard 6.5 – 200 kDa, „Liquid Mix“**

(Serva, Art.-Nr. 39215.01)

| <u>Proteinkomponenten</u>                     | <u>Molekulargewicht in kDa</u> |
|---|--------------------------------|
| Myosin, Rindermuskel                          | 200                            |
| β-Galaktosidase, <i>E. coli</i> , rekombinant | 116                            |
| Serumalbumin, Rind                            | 68                             |
| Ovalbumin, Hühnereiweiß                       | 45                             |
| Carboanhydrase, Erythrocyten, Rind            | 29                             |
| Trypsin inhibitor, Sojabohne                  | 21                             |
| Lysozym, Hühnerei                             | 14,3                           |
| Aprotinin, Rinderlunge                        | 6,5                            |

**Fermentas Unstained Protein Längenstandard 14,4-116 kDa, „Liquid Mix“**

(Fermentas, Art.-Nr. SM0671)

| <u>Proteinkomponenten</u>                     | <u>Molekulargewicht in kDa</u> |
|---|--------------------------------|
| β-Galaktosidase, <i>E. coli</i> , rekombinant | 116                            |
| Bovine Serumalbumin, Rind                     | 68                             |
| Ovalbumin, Hühnereiweiß                       | 45                             |
| Lactate dehydrogenase, Schwein Muskel         | 35                             |
| REase Bsp981, <i>E. coli</i>                  | 25                             |
| β-lactoglobulin, Milch, Rind                  | 18,4                           |
| Lysozym, Hühnerei                             | 14,4                           |

**PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) 10-170 kDa**

(Fermentas, Art.-NR. SM0431)

Dreifarbiger Längenstandard mit 10 Proteinbestandteilen, wobei die 70 kDa Bande orange und die 10 kDa Bande grün ist.

**2.5 Geräte und sonstige Materialien**

- Immobiline™ DryStrip pH 3-11 NL, 18 cm; GE Healthcare
- Apparaturen für die Gel – Elektrophorese: Werkstatt Universität Würzburg
- Imm. Drystrip pH 3-11 NL, 18 cm, GE Healthcare
- Silikonschlauch, Laborhaus Scheller und Hartenstein, Würzburg
- Edding 750; Edeioning 751
- Thermolux-Wärmematte, Witte + Sutor GmbH, Murrhad
- Kaltlichtlampe KL1500, Schott, St. Gallen Schweiz
- ACCU-CHECK® Aviva, Roche diagnostics GmbH
- ACCU-CHECK® Aviva Teststreifen, Roche diagnostics GmbH
- Binokular: Typ 355110, Wild Heerbrugg (Schweiz)

- Binokular SZX7, Olympus
- Kamera UC30, Olympus
- Programm: cell<sup>A</sup>, Olympus
- Fotoapparat Panasonic Lumix DC Vario MEGA O.I.S.
- Petrischalen: Greiner bio-one, Frickenhausen
- Gerät zum Kapillaren ziehen: Sutter Instrument Company, Model P-2000, Micropipette Puller
- Kapillaren: Mikrokapillare 5/10 µl, PMS 1, Hartenstein Würzburg
- Holzkästchen für Bienen 8 cm x 6 cm x 4 cm mit Metallgitter oben zum Verschließen und seitlicher Öffnung rund, Bienenstation der Universität Würzburg
- Holzkästchen oder Plexiglastkästchen für Bienen 8 cm x 7 cm x 5 cm mit Metallgitter hinten und Plexiglas oder Glasscheibe zum Verschließen vorn, runde Öffnung zum Einhängen eines Futtergefäßes oben in der Mitte, Bienenstation der Universität Würzburg und Werkstatt Biozentrum Universität Würzburg
- Holzkästchen für Bienen 9,5 cm x 7 cm x 9 cm mit Metallgitter zum Verschließen vorn, runde Öffnung zum Einhängen eines Futtergefäßes oben in der Mitte, Bienenstation der Universität Würzburg und Werkstatt Biozentrum Universität Würzburg
- Metallkästchen aus Lochstahlblech für Bienen 10,5 cm x 6 cm x 4 cm, Werkstatt Biozentrum Universität Würzburg
- Color-Control Dia-Leuchtplatte; Just Normlicht, Weilheim
- Magnetrührer, Janke & Kunkel, Staufen
- Mikroskop: Zeiss, Standard 20
- Schüttler: IKA KS 250 basic, Hartenstein, Würzburg  
Biometra WT16
- pH-Meter: pH 532 WTW Hartenstein Würzburg
- Minishaker MS1 IKA; Janke & Kunkel, Staufen
- Spectro - Photometer: Pharmacia Biotech, Novaspec II
- Plexiglasgefäße mit Schaumstoffstopfen
- Eppendorf Zentrifuge 5417R
- Waagen:
  - Kern KB 5000-1 Ser.No: WO 21301; d = 0,1 g; Max 5100 g; DC 9V
  - Feinwaage Sauter K1200; Volkmar Gatzki, Niederkalbach
- Wärmeschränke:
  - Memmert; Typ: IPP 500; 230 V~ 1, 5 A 50/60 Hz 350W
  - Memmert; Typ: B80; 990 V, 50 Hz 800 W
  - Memmert; Typ:HCP108; 230 V, 4,4A, 50/60 Hz 1000 W
  - Bachhofer Laboratoriumsgeräte Brutschrank mit Wippe; Typ: BE200; 230 V, 440 W, 1,9 A
  - Ehret GmbH Typ: KT2; 220 V, 50 Hz, 900 W, 0-80°C

- Spannungsgerät: LKB ECPS 3000/150
- Spannungsgerät: Voltcraft NG 15 mit HandlötKolben
- Kaltlichtquelle KL1500 LCD, Olympus
- Thermoschüttelinkubator, Infors AG, Bottmingen
- Wasserbad: Ges. f. Laboratoriumsgeräte, Burgwedel
- Objektträger und Deckgläßchen
- Rasierklingen
- Klingenthaler, Fine Science Tools No. 100153.09
- Mikroskopier-Pinzetten, Nr.5, DUMONT, 110 mm gerade, PZ14, A. Hartenstein
- Federstahlpinzetten 100 mm, stumpf, PZ20, A. Hartenstein
- Mikroskopierschere seitlich gebogen (Vannas-Tübingen), Fine Science Tools No. 15008-08
- Wachsmalstifte wasserfest, Office
- Insektennadeln 00, Fiebig Lehrmittel
- Mikroskopierschere, Typ NOYES, 120 mm gebogen, gefedert, SN04, A. Hartenstein
- Gewebekulturplatte 24 Well steril mit Abdeckplatte, Laborhaus Scheller
- Transfermembran Bogen, Roth
- Millipore Immobilon P, 26,5 cm x 3,75 M
- Umlarvnadel aus Edelstahl-Rostfrei, C.Fritz
- Schweizer Umlarvlöffel, C.Fritz; Bienen Meier, Künten
- Microlöffelspatel, A. Hartenstein
- Gefrierschrank -20°C, Privileg de luxe
- Gefrierschrank -70°C, Thermo Fisher Scientific
- Computer, Drucker, Scanner, Kopierer
- Wachsschalen, Eigenbau
- Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-4 LSC; Christ, Osterode
- Vakuumpumpe ONF 25L (Gefriertrocknung); Pfeiffer Vacuum, Asslar
- Speed Vac RVC 2-18; Christ, Osterode
- Werktschlampe, Buran GmbH, Hohenwarsleben
- CEA, Röntgen Blaufilm, Typ RP New, 13x18; Ernst Christiansen GmbH, Planegg
- Proxxon Micromot 40/E<sup>+</sup>
- Microspin FV-2400
- Reinstwassersystem TKA-GenPure; TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert
- Oppalithblättchen; Carl Fritz Imkereitechnik, Mellrichstadt

## 2.6 Antikörper

### **$\alpha$ - Phenoloxidase (GenScript)**

Affinitätsaufgereinigter polyklonaler Antikörper (anti-Rabbit) gegen spezifische Peptidsequenz des Proteins Phenoloxidase

Peptidsequenz: CQPGKNTIEQKSTKS

Konzentration 0,6 mg/ml

→aliquotiert à 20  $\mu$ l

### **$\alpha$ -Rabbit**

→Anti-Rabbit IgG horseradish peroxidase (Sigma, A6154)

→aliquotiert à 10  $\mu$ l

### **$\alpha$ -IRp30 (immunoGlobe Antikörpertechnik GmbH, Himmelstadt)**

Fusionsprotein aus IRp30 und GST (Š. Albert)

Kloniert in pGEX-TT, in *E.coli* exprimiert und aus Inklusionskörperchen isoliert

Immuneserum durch Kaninchen-Immunsierung

Serumantikörper affinitätsaufgereinigt auf einer His6-IRp30-Sepharose-Säule (von nicht-spezifischen und GST-Antikörpern befreit)

→aliquotiert à 20  $\mu$ l

### **$\alpha$ -Carboxylesterase 1 (immunoGlobe Antikörpertechnik GmbH, Himmelstadt)**

Fusionsprotein aus CE 1 und GST (Š. Albert)

Kloniert in pGEX-TT, in *E.coli* exprimiert und aus Inklusionskörperchen isoliert

Immuneserum durch Kaninchen-Immunsierung

Serumantikörper nicht affinitätsaufgereinigt

→aliquotiert à 20  $\mu$ l

### 3. Methoden

#### 3.1 *In Vitro* Aufzucht von Bienenlarven

Um möglichst viele Larven des gleichen Alters zu erhalten, wird eine Königin für 1-2 Tage auf einer Wabe „gekäfigt“. Die Arbeiterinnen können den „Käfig“ durch das Gitter verlassen, nur die etwas größere Königin nicht. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die Königin nur diese Wabe bestiftet und gleichzeitig in ihrem Volk versorgt wird. Die markierte Wabe wird nach dem Schlupf der Bienenlarven aus dem Stock genommen zum Absammeln der höchstens einen Tag alten Larven. Diese werden mit einem Schweizer Umlarvlöffel vorsichtig aus der Wabenzelle in einen Napf mit 300 µl angewärmtes Futter überführt. Die 24-Näpfchen-Platte steht auf einer Heizmatte, die das Futter auf ca. 35°C erwärmt, so dass die Larven nicht durch zu kühle Temperaturen geschädigt werden. Um die Larven in den Zellen erkennen zu können, wird beim Umlarven eine Werktaischlampe mit Lupe verwendet. Pro Napf werden 10 Larven aus den Zellen entnommen bis die gewünschte Anzahl an Larven erreicht ist und die Wabe wieder in den Stock zurückgebracht werden kann.

Die 24-Näpfchen-Platte mit den Larven wird bei ca. 65 % Luftfeuchtigkeit und 35°C in einen Thermoschrank gestellt. Alle 24 Stunden werden die Larven vorsichtig auf einer Wärmeplatte in eine 24-Näpfchen-Platte mit neuem Futter übertragen. Dabei werden die Larven ihrer Größe entsprechend immer mehr vereinzelt, Tote und retardierte Larven entfernt.

Ist das Larvalstadium abgeschlossen und das Vorpuppenstadium beginnt, so kommt es zur Defäkation. Die Streckmade wird nun in einen mit Tüchern ausgelegten Napf überführt. Dazu werden 1,5 cm breite und 3 cm lange Papierstreifen über Kreuz gelegt und mit einem dicken Stift in den Napf gedrückt, damit der Boden und die Wand mit Papier ausgekleidet sind. Diese Papierauskleidung wird nach 24 h noch einmal ausgetauscht, aber bis zum Schlupf der adulten Biene nicht mehr, um die Entwicklung möglichst wenig zu stören.

**Tabelle 2: Zusammensetzung des Larvenfutters (Peng et al.1992; Randolt et al. 2008)**

| Komponente    | Menge                            |
|---------------|----------------------------------|
| Gelee Royal   | 4,2 g gefriergetrocknet 21 % w/v |
| deion Wasser  | 14,4 ml 72 %                     |
| Fructose      | 0,6 g 3 %                        |
| Glucose       | 0,6 g 3 %                        |
| Yeast Extract | 0,2 g 1 %                        |

Das Larvenfutter wird etwa 20 Minuten lang gerührt bis eine homogene blass gelbe Lösung entstanden ist. Die Futterlösung hat einen pH-Wert von ~4 und ist im Kühlschrank bei 6°C drei Tage haltbar. Das hoch viskose Gelée Royale wurde durch Gefrier Trocknung (Lyophilisation) und anschließendes Mörsern zu einem feinen, trockenen Pulver verarbeitet,

das sich besser dosieren lässt. Die Gefriertrocknung ermöglicht eine schonende Trocknung, bei der die natürlichen Eigenschaften des Ausgangsmaterials nicht verändert werden.

Bevor das Gelée Royal mit Hilfe der Gefriertrocknungsanlage getrocknet wird, muss es im Gefrierschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Petrischalen (Schichtdicke  $>1\text{cm}$ ) gefroren werden und danach so gebogen werden, dass das Gelée Royale von allen Seiten dem Gefriertrocknungsprozess zugänglich ist. Nachdem mit flüssigem Stickstoff die angetauten Oberflächen wieder gefroren wurden, wird die Petrischale mit dem Gelée Royale in die vorbereitete Gefriertrocknungsanlage gestellt. Diese wird verschlossen, Vakuum angelegt und die Programme „Haupttrocknen“ und dann „Nachtrocknen“ zu einem späteren Zeitpunkt gestartet. Sobald das Nachtrocknen abgeschlossen ist, wird das Vakuum gelöst und das getrocknete Gelée Royale entnommen und sofort durch Mörsern zu einem feinen Pulver verarbeitet.

## 3.2 Injektion immunstimulierender Substanzen bei Larven, Arbeiterinnen und Drohnen

### 3.2.1 Vorbereiten von Bakterien für die Infektion

In 50ml frisches vorgewärmtes Medium werden am Tag vor der Infektion 0,3ml von einer Stammlösung des gewünschten Bakterienstamms gegeben und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Für *M.flavus* ist es LB-Medium und Für *E.coli* 682 ist es das NB-Medium. Am nächsten Morgen wird von dieser Kultur 3-4 ml in 50 ml frisches vorgewärmtes Medium gegeben und nochmals bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter schütteln für etwa 2 h inkubiert, bis bei einer Absorption von 550 nm der Wert von 0,5 erreicht ist. Die Bakterienlösung befindet sich in der logarithmischen Wachstumsphase und die Zellzahl liegt ungefähr bei  $10^8$  Z/ml. Von dieser Lösung wird 1 ml entnommen und bei 5200 UpM für 8 min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417R). Nach der Zentrifugation wird der Überstand sofort abgegossen und das Sediment in 1 ml PBS suspendiert. Daraufhin wird noch zweimal für 8 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Sediment in PBS aufgenommen. Die fertige Bakterienlösung mit  $10^5$  Z/ $\mu\text{l}$  ist nun bereit für Infektionszwecke.

### 3.2.2 Die Injektion immunstimulierender Substanzen

Vor der Nutzung müssen die Glaskapillaren mit dem Micropipette puller P-2000 gezogen werden. Dazu werden die Kapillaren in das Gerät eingespannt, automatisch mithilfe eines Lasers an einer Stelle erhitzt, auseinandergezogen bis das Glas reißt und somit die für die Injektion benötigte Spitze entsteht. Zur Injektion werden 5  $\mu\text{l}$ - Glaskapillaren verwendet bei denen die Skala 1  $\mu\text{l}$  Schritte zeigt.

Die Injektion von Larven findet auf einer Wärmeplatte statt, damit die Larven während des Injizierens nicht unterkühlen und so das Experiment nicht negativ beeinflusst wird. Am nicht ausgezogenen Ende der Glaskapillare wird ein Silikonschlauch aufgesteckt mit einer Pipettenspitze als Mundstück und dann die Spitze der Glaskapillare so abgebrochen, dass die

Injektionslösung langsam angesaugt werden kann. Ist die Injektionslösung aufgezogen wird die Spitze der Kapillare kurz in Phenylthioharnstoff (PTU) (10 µg/ml) getaucht, um das Prozessieren der Pro-Phenoloxidase zur aktiven Phenoloxidase als Antwort auf das Anstechen zu verhindern. Um den Stress für die Larven möglichst gering zu halten, werden die Larven in neues angewärmtes Futter überführt, bevor die Injektion stattfindet. Die Larven werden dorsal in der Körpermitte angestochen und 1 µl Flüssigkeit injiziert.

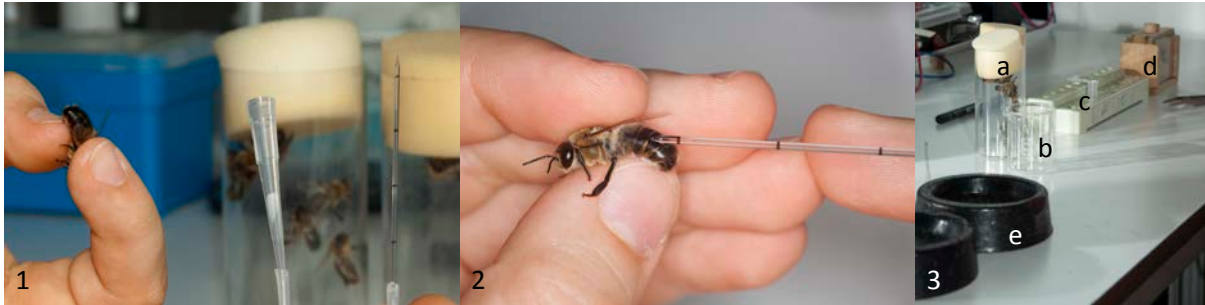


Abb. 13: Das Injizieren immunstimulierender Substanzen bei adulten Drohnen. 1) Drohn wird zwischen den Fingern gehalten. Daneben sind das Mundstück und die ausgezogene Kapillare zu sehen, die schon auf den Silikonschlauch aufgesteckt sind. 2) Injektion einer Lösung mit der Kapillare bei einem adulten Drohn. Zwischen zwei schwarzen Markierungen der Kapillare befinden sich 1 µl Injektionslösung. 3) Versuchsaufbau a) Plexiglasgefäß mit Drohnen b) Becherglas mit ausgezogenen Kapillaren c) Reaktionsgefäß mit der Injektionslösung d) Holzkäfig in dem die infizierten Drohnen dann bei 30°C gehalten wurden mit Arbeiterinnen, die erst nach dem Infizieren der Drohnen zugesetzt wurden. e) Wachsschale für die spätere Haemolymphe entnahme. Fotos Helga R. Heilmann

Bei adulten Bienen werden die Glaskapillaren auf die gleiche Art und Weise, wie bei den Larven verwendet. Für die Injektion von Arbeiterinnen werden diese auf Eis herunter gekühlt bis sie sich nicht mehr bewegen. Danach wird eine Biene so zwischen die Finger genommen, dass der Thorax fixiert ist und das Abdomen frei in der Luft ist und von der Hand weg weist. Mit der anderen Hand wird vorsichtig seitlich zwischen das zweite und dritte Tergit dorsal, nicht zu tief eingestochen und 1 µl der Injektionslösung injiziert. Drohnen müssen für die Injektion (Abb. 13.2) nicht herunter gekühlt werden, da sie nicht stechen können. Ansonsten ist das Vorgehen identisch zu dem bei Arbeiterinnen.



### 3.3 Die Entnahme von Haemolymphe bei Larven, Arbeiterinnen und Drohnen

Eine bestimmte Stundenzahl nach der Infektion wird den Larven Haemolymphe entnommen. Dazu werden die Larven auf der Wärmeplatte aus dem Futternapf entnommen, kurz in Wasser getaucht, auf einem Tuch trockengetupft und anschließend auf ein Stück Parafilm gelegt. Hier wird die Larve mit einer stumpf abgebrochenen Kapillare, die mit einem Silikonschlauch mit Mundstück versehen ist angestochen, so dass Haemolymphe austritt. Die Haemolymphe wird nun mit der Kapillare aufgesaugt und in ein Reaktionsgefäß, das auf Eis gekühlt wird, überführt. Nach vollständiger Entnahme wird der Haemolymphe eine 1:1 Mischung aus PTU und Aprotinin (je 100 µg/ml) zugegeben. Auf 10 µl Haemolymphe kommt 1 µl der Mischung. So kann die Haemolympheprobe bei -20°C gelagert werden.

Die Arbeiterinnen werden ventral mit zwei Präpariernadeln zwischen Thorax und Abdomen auf einer Wachsplatte fixiert. Danach wird dorsal mittig in der Herzschlauchgegend zwischen dem zweiten und dritten Tergit mit einer stumpf abgebrochenen Glaskapillare flach eingestochen. Die austretende Haemolymphe wird mit der Glaskapillare aufgesaugt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Haemolymphe wird genauso wie bei den Larven behandelt.



Abb. 14: Haemolymphentnahme bei Drohnen. A) Mit drei Nadeln fixierter Drohn B) Das Entfernen des vordersten Beinpaares C) Haemolymphentnahme mit einer stumpf abgebrochenen Kapillare. Fotos: Helga R. Heilmann.

Die Drohnen werden einzeln auf einer Wachsplatte dorsal fixiert. Bevor die hinteren Beinpaare der Drohne mit zwei überkreuzten Präpariernadeln festgesteckt worden sind, wurde eine Nadel durch den Kopf ins Wachs gestochen (Abb. 14A). Von dem so fixierten Drohn werden nun die Beine des vorderen Beinpaares in der Mitte der Coxa mit einer Präparierschere abgeschnitten, so dass eine genügend große Wunde entsteht (Abb. 14B). Mit einer stumpf abgebrochenen Mikrokapillare wird die austretende Hämolymphe aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt (Abb. 14C). Mit der Haemolymphe wird auf die gleiche Art und Weise, wie bei den Larven und Arbeiterinnen verfahren.

### 3.4 Versuche mit Drohnenpuppen

Es wurde eine verdeckelte Brutwabe aus einem Volk entnommen. Zuvor wurde durch das Öffnen einzelner Brutzellen überprüft, ob sich Puppen im für den Versuch benötigten Entwicklungsstadium auf der Brutwabe befinden. Diese Brutwabe wurde in einen warmen

Raum gebracht, auf eine Wärmeplatte gestellt und dann so schnell als möglich so viele Puppen entnommen, wie für den Versuch nötig, bevor die Wabe wieder in den Stock überführt wurde.

Die Brutzellen wurden mittels einer Uhrmacherpinzette vorsichtig so weit geöffnet, dass mit einer Federstahlpinzette die Puppe ohne Verletzung aus der Brutzelle entnommen werden kann. Die so sorgfältig entnommene Puppe wurde vorsichtig in eine 24-Näpfchen-Platte gelegt, die sich ebenfalls auf der Wärmeplatte befand. Waren alle Näpfchen mit einer Puppe belegt, wurde die 24-Näpfchen-Platte in einen Wärmeschrank mit 35°C und 65 % Luftfeuchtigkeit gestellt.

Die Injektion der Drohnenpuppen erfolgte am Thorax, da die Puppen aufgrund der Verletzung an dieser Stelle nicht sofort ausliefen. Die Haemolymphentnahme erfolgte auf einer Wärmeplatte auf Parafilm, indem die Puppe an 2-3 Stellen angestochen wurde. Die auslaufende Lymphe wurde dann mit einer Kapillare aufgesaugt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgt das gleiche Prozedere wie bei den Larven und adulten Bienen.

### 3.5 Die Haltung von Bienen während eines Versuches

Bienen können für Versuche in kleinen Kästchen gehalten werden. Die Fütterung geschieht mit Apilinvert oder einer selbst hergestellten Zuckerlösung mit einem Gefäß mit kleinem Loch aus dem sich die Bienen die Zuckerlösung holen können. Hier wurden vorwiegend Reaktionsgefäße verwendet, in die am unteren Ende in einem geringen Abstand zwei Löcher gestochen worden sind oder 15 ml Röhrchen in die am unteren Ende ein kleines Loch gemacht wurde. In die kleinen Reaktionsgefäße wurden zwei kleine Löcher gestochen, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden aufgrund derer die Bienen nicht mehr ans Futter herankämen. Diese Futtergefäße wurden in die Kästchen gehängt, so dass die Bienen jederzeit ans Futter konnten. Da Drohnen längere Zeit nicht ohne Arbeiterinnen überleben obwohl Futter im Überfluss vorhanden ist, wird ihnen immer eine genügend große Menge an Arbeiterinnen zugesetzt, damit diese die Drohnen füttern können. Die Drohnen wurden bei 30°C während der Versuche in Kästchen gehalten.

Für Langzeitversuche mit Drohnen und Arbeiterinnen wurden diese markiert und wieder in das gleiche Bienenvolk gegeben aus dem sie geholt wurden. Bei frisch geschlüpften Bienen musste dies nicht beachtet werden, da sie noch keinen Stockgeruch an sich haben. Es wurden Waben mit verdeckelter Brut, Drohnen oder Arbeiterinnen je nach Versuch, die kurz vor dem Schlupf stand aus einem Volk entnommen und in einem Gitterkasten in einen Wärmeschrank mit 35°C gestellt. Die frisch geschlüpften Bienen wurden dann mit einem Edding 750 auf dem Thorax mittig mit einem Farbpunkt markiert. Die so markierten Bienen wurden in ein Bienenvolk verbracht. Aus diesem Bienenvolk konnte man nun Bienen zu einem späteren Zeitpunkt aus dem Volk sammeln, die ein genau definiertes Alter haben.

## 3.6 Versuche mit Hummeln, Mauerbienen und Wespen

### 3.6.1 Hummeln (*Bombus terrestris*)

Die Hummeln wurden in Kästchen gehalten bei 22-26°C und die Fütterung erfolgte mit Zuckerlösung über 15 ml Röhrchen mit einem kleinen Loch am unteren Ende. Überschritt die Versuchsdauer 24 Stunden, so wurde in einem kleinen Gefäß Pollenpaste (Zuckerwasser vermischt mit Pollen) angeboten.

Die Infektion von Hummeln wurde genauso wie bei den Honigbienen durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass den Hummeln statt 1 µl ganze 5 µl Infektionslösung injiziert wurden. Die Abnahme der Haemolymphe wurde, wie bei den Arbeiterinnen der Honigbienen beschrieben, durchgeführt. Auch hier gibt es bei den Erdhummeln eine Besonderheit. Diese besteht darin, dass bei ihnen von ein und derselben Hummel mehrfach Haemolymphe abgenommen werden kann. Allerdings nur, wenn etwa 24 Stunden zwischen den Abnahmezeitpunkten liegen und bei der ersten und zweiten Abnahme darauf geachtet wurde, dass nicht die gesamte Haemolymphe entnommen wurde.

### 3.6.2 Wespen (*Vespidae*)

Die Wespen wurden in Metall- oder Plexiglkästchen bei Raumtemperatur (~21°C) gehalten, da sie aufgrund ihrer starken Mandibeln und ihrer Art Nester zu bauen die Holzkästchen zu stark beschädigten und auch eine Flucht aus ihnen möglich gewesen wäre. Sie wurden mit reifen, aufgeschnittenen Früchten und Futterteig gefüttert.

Die Infektion und die Haemolympfabnahme erfolgten wie bei den Arbeiterinnen der Honigbiene.

### 3.6.3 Mauerbienen (*Osmia*)

Die Mauerbienen wurden in einem Terrarium gehalten, in dem zwei Blühpflanzen (Chrysanthemen und Blaukissen), die in voller Blüte waren, als Nahrungsquelle dienten (Abb. 15). Versuche, die Mauerbienen mit Zuckerlösung zu füttern, waren bei Vorversuchen fehlgeschlagen. Alle Versuche mit Mauerbienen fanden bei Raumtemperatur (~21°C) statt.



Abb. 15: *Osmia cornuta* im Terrarium. Fotos: Heike Gätschenberger.

Die Mauerbienen wurden für die Infektion und die Abnahme der Haemolymphe, die ebenso wie bei den Arbeiterinnen der Honigbienen erfolgte, nicht auf Eis betäubt. Bei der Infektion wurden sie mit einer Federstahlpinzette so fixiert, dass sie sich nicht mehr bewegen

konnten. Die Haemolymphabnahme erfolgte, wie bei den Arbeiterinnen der Honigbienen am Abdomen.

### 3.7 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es handelt sich hierbei um eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen mit Hilfe eines elektrischen Feldes. SDS (sodium dodecylsulfate) ist ein anionisches Detergenz (1,4 g SDS binden pro g Protein), das an die hydrophoben Seitenketten der Proteine bindet und Ladungsunterschiede ausgleicht indem somit alle Proteine negativ geladen sind, so dass sie im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Auftrennung bei der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese ist aufgrund dessen nur vom Molekulargewicht des Proteins abhängig. Die Größe der Proteine bestimmt die Laufgeschwindigkeit in der Gelmatrix

#### 3.7.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese passieren die Proben zuerst ein weitporiges Sammelgel (pH 6,8), in dem die Proben auf ein Niveau konzentriert werden. Danach werden die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes im engmaschigeren Trenngel bei pH 8,8 aufgetrennt. Die aus Acrylamidmonomeren bestehende Gelmatrix bildet mit dem quervernetzenden Bisacrylamid ein dreidimensionales Netzwerk. APS und TEMED lösen durch den Start einer Radikalkettenreaktion die Vernetzung der Monomere aus. Sie werden erst nach dem Evakuieren der Lösung (Sauerstoff führt zum Abbruch der Reaktion) zusammen mit dem SDS zugegeben, so dass die Lösung sofort zwischen zwei Glasplatten, die durch 1mm starke Silikonabstandshalter separiert und mit Vaseline abgedichtet sind, gegossen werden kann bis zur zuvor angebrachten Markierung. Damit eine glatte Oberfläche entsteht, wird das noch flüssige Trenngel vorsichtig mit Wasser überschichtet.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der Trenngel-Lösungen (Gesamtvolumen 30ml)**

| Komponenten            | 10 %<br>Tennigel | 15%<br>Trenngel |
|------------------------|------------------|-----------------|
| 30 % Acrylamid         | 10,0 ml          | 15,0 ml         |
| 2 % Bisacrylamid       | 4,0 ml           | 6,0 ml          |
| 1,5 M Tris-HCL, pH 8,8 | 7,5 ml           | 7,5 ml          |
| deion H <sub>2</sub> O | 8 ml             | 1,0 ml          |
| 10 % SDS               | 300 µl           | 300 µl          |
| 10 % APS (0,1 g/ml)    | 200 µl           | 200 µl          |
| TEMED                  | 20 µl            | 20 µl           |

Durch die Acrylamidkonzentration kann die Porengröße im Trenngel verändert werden. Je größer die Poren desto schneller wandern die Proteine durchs Gel und umgekehrt. Will man nun Proteine im hochmolekularen Bereich gut auftrennen, so verwendet man niederprozentige Gele bis 10 % und im niedermolekularen Bereich eher hochprozentige Gele um die 15 %. Nachdem das Trenngel nach etwa ca. 15 min polymerisiert ist, wird das Wasser abgegossen und mit einem saugfähigen Papiertuch nachgetrocknet. Unmittelbar darauf wird das Sammelgel auf das Trenngel gegossen, in das sofort der Taschenformer luftblasenfrei eingesetzt wird.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Sammelgel-Lösung (Gesamtvolumen 15ml)

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

Das Sammelgel ist nach ca. 10 Minuten polymerisiert und der Taschenformer muss vorsichtig herausgenommen werden. Um die Bildung von dünnen Häutchen in den Zwischenräumen zu vermeiden, werden diese mit Elektrophoresepuffer ausgespült. Die Glasplatten mit dem Gel dazwischen werden nun nach Entfernen der Klemmen und des unteren Abstandhalters in die Gelapparatur eingebracht. Um ein eventuelles seitliches Durchfließen des Puffers erkennen zu können, das Ganze abzudichten und damit später einen kontinuierlichen Stromfluß zu gewährleisten wird zuerst das obere Reservoir mit Elektrophoresepuffer befüllt. Nachdem dies erfolgt ist, wird auch das untere Reservoir befüllt, so dass das Gel vollständig in Kontakt mit dem Elektrophoresepuffer (Laufpuffer) ist. Als Elektrophoresepuffer und Trenngel-Puffer wird standardmäßig der Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) verwendet. Es können aber auch andere Puffersysteme zum Einsatz kommen, je nachdem in welchem Bereich eine bessere Auflösung gewünscht ist. Dies hängt von der Proteinzusammensetzung der Probe, aber auch stark von dem gesuchten Protein und dessen Molekulargewicht ab.

Tabelle 5: Dissoziationspuffer (2xSP)

|                        |        |
|------------------------|--------|
| 0,5M Tris-HCl, pH 6,8  | 1,0 ml |
| 10 % SDS               | 2,0 ml |
| 86 % Glycerin          | 1,0 ml |
| 14 M β-Mercaptoethanol | 0,5 ml |
| 10 % Bromphenolblau    | 50 µl  |
| deion H <sub>2</sub> O | ad 5ml |

Bei der Probenvorbereitung werden die Proben für 5 min bei 95°C mit einem SDS- Überschuss erhitzt, so dass die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst werden. Der Dissoziationspuffer (2xSP) (Tabelle 5) mit dem die Proben vor dem Erhitzen gut gemischt worden sind, enthält außer SDS zudem β-Mercaptoethanol, das in hohen Konzentrationen auf die Disulfidbrücken der zu analysierenden Proben

reduzierend wirkt.

Die abgekühlten, denaturierten Proben können in die Taschen des Sammelgels, das ca. 1,5cm hoch ist, aufgetragen werden. Daneben wird ein geeigneter Protein Längenstandard, der unterschiedliche Proteinbestandteile mit bekanntem Molekulargewicht enthält neben den zu analysierenden Proben aufgetragen. Hierdurch kann die Größe der nicht bekannten Proteine abgeschätzt werden. Es werden standardmäßig Polyacrylamidgele von 1 mm Dicke und den Trenngelmaßen 8,5 x 16 cm bzw. 14 x 20 cm verwendet.

Die Elektrophorese wird zunächst bei 60 Volt durchgeführt, bis die sichtbare Bromphenolblaubande das Trenngel erreicht hat. Sobald dies der Fall ist, wird die Elektrophorese bei 120 Volt fortgeführt. Hat die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Gels erreicht oder ist gerade aus dem Gel gelaufen, wird abgeschaltet und das Gel aus der Apparatur entnommen. Nachdem das Sammelgel entfernt und links oben eine kleine

Ecke entfernt wurde, kann das Gel mit Coomassie Blau G250 angefärbt werden oder im Western Blot weiter verwendet werden.

### 3.7.2 Das Laemmli Puffersystem (Laemmli, 1970)

Das Laemmli-Puffersystem, mit dem Proteine im Bereich von etwa 14 bis 200 kDa gut separiert werden, wird standardmäßig bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE verwendet. Bei diesem System befindet sich im oberen und unteren Reservoir der gleiche Puffer. Das im Puffer enthaltene Glycin liegt aufgrund des niedrigen pH Wertes des Sammelgels mehrheitlich als ungeladene Form vor. Deshalb besitzen die Folgeionen nur eine geringe elektrophoretische Mobilität im Gegensatz zu den Leitonen, die aufgrund der im Puffer enthaltenen Chloridionen sehr mobil sind. Im Feldgradienten zwischen Leit- und Folgeionen ordnet sich das aufgetragene Proteingemisch ein bis sie am Übergang zum Trenngel konzentriert werden. Durch den höheren pH Wert des Trenngels erhöht sich die negative Ladung der Glycinionen und sie bilden zusammen mit den Chloridionen die Leitonenfront.

**Tabelle 6: Zusammensetzung des Laemmli-Elektrophoresepuffers**

| Komponenten            | Laemmli-Elektrophoresepuffer<br>(pH~8,6) |
|------------------------|--|
| Glycin                 | 15 g                                     |
| Tris                   | 5 g                                      |
| 10 % SDS               | 15 ml                                    |
| deion H <sub>2</sub> O | ad 1000 ml                               |

### 3.7.3 Tricine-Puffersystem (Schägger und Jagow, 1987)

Das Tricine-Puffersystem sieht die Verwendung von zwei unterschiedlichen Puffern vor. Diese Puffer unterteilen sich in Kathoden- und Anodenpuffer (Tabelle 7). Das Puffersystem ermöglicht eine bessere Auflösung im niedermolekularen Bereich von etwa 1 bis 12 kDa aufgrund der höheren Wandergeschwindigkeit der Tricin-Ionen, die hier anstelle der Glycin-Ionen (Laemmli) als Folge-Ionen dienen.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der Tricinepuffer**

| Komponenten            | Laufpuffer oberes Reservoir<br>(= Kathodenpuffer) | Laufpuffer unteres Reservoir<br>(= Anodenpuffer) |
|------------------------|---|--|
| Tris                   | 12,1 g  | 24,2 g   |
| Tricine                | 17,9 g  | -  |
| 10% SDS                | 10 ml   | -  |
| deion H <sub>2</sub> O | ad 1000 ml  | ad 1000 ml                                       |
| pH                     | 8,3 ( ohne Einstellung)                           | 8,9 (mit ca. 5-7 ml 32 % HCl einstellen)         |

Beim Tricine-Puffersystem wird die Elektrophorese zunächst bei 60 Volt durchgeführt. Diese wird bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA fortgesetzt nachdem das Trenngel von der Bromphenolblaubande erreicht wurde.

### 3.7.4 Färbemethoden

Die im Gel aufgetrennten Proteinbanden müssen nun durch unterschiedlich sensitive Methoden angefärbt werden. Hier kommen die Coomassie-Blau R250-Färbung und eine Kolloidale Coomassie-Färbung zum Einsatz.

#### 3.7.4.1 Coomassie-Blau R250-Färbung

Die irreversible und unspezifische Anfärbung der Proteine durch die Coomassie-Blau R250-Färbung (ca. 100 ng Protein pro Bande oder mehr) kommt beim Anfärben von Membranen für die Western Blot Analyse zum Einsatz.

Zunächst wird der Farbstoff in Methanol unter Rühren gelöst. Anschließend werden 100 % Essigsäure und deionisiertes H<sub>2</sub>O hinzugegeben.

Diese Lösung wird dann nach 30 min rühren durch zwei Lagen angefeuchtetes Filterpapier filtriert. Die zu färbende Membran wird bei Raumtemperatur gut mit Färbelösung bedeckt und auf einem Schüttler ca. 2 min langsam geschwenkt.

Tabelle 8: Zusammensetzung Färbelösung R250

| Komponenten            | Färbelösung R250 |
|------------------------|------------------|
| Methanol               | 250 ml           |
| Coomassie Blau R250    | 500 mg           |
| Essigsäure (7 %)       | 35 ml            |
| deion H <sub>2</sub> O | ad 500 ml        |

#### 3.7.4.2 Kolloidale Coomassie-Blau G250 - Färbung

Roti<sup>®</sup>-Blue ist eine CBBG-250 Färbung für Proteine in Polyacrylamidgelen. Der Farbstoff bindet durch seine kolloidalen Eigenschaften mit hoher Spezifität an Proteine. Dies führt dazu, dass die Gelmatrix nur minimale Bindungen mit dem Farbstoff aufweist und somit ausgedehnte Waschschrte zur Hintergrundentfärbung entfallen. Die Sensitivität dieser Färbung ist mit ca. 30 ng Protein pro Bande hoch und mit der von Silberfärbungen vergleichbar.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Fixier-, Roti<sup>®</sup>-Blue Färb- und Waschlösung

| Komponenten  | Fixierlösung | Roti <sup>®</sup> -Blue Färbelösung | Waschlösung |
|--|--------------|-------------------------------------|-------------|
| ortho-Phosphorsäure 85%  | 4,5 ml       | -                                   | -           |
| Methanol   | 90 ml        | 30 ml                               | 25ml        |
| Roti <sup>®</sup> -Blue (5x-Konz.)<br>(unter rühren zugeben, 2-3 h rühren) | -            | 30 ml                               |             |
| deion H <sub>2</sub> O   | ad 450 ml    | ad 150 ml                           | ad 100 ml   |

Das Gel wird für 30 min in einer Fixierlösung geschüttelt. Danach werden über Nacht in der Roti<sup>®</sup>-Blue Färbelösung die Proteinbanden unter moderatem Schütteln angefärbt. Das Gel wird anschließend in einer Waschlösung entfärbt.

### 3.8 Western Blot (Immunoblot)

Mit Hilfe des Western Blot Verfahren werden Proteine, die zuvor durch eine SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, auf eine Immobilon P Transfer Membran (PVDF) transferiert und die zu untersuchenden Proteine anschließend durch spezifische Antikörper detektiert. Auf diese Weise lassen sich Aussagen über das Vorhandensein, das Molekulargewicht und die Expressionsstärke des gesuchten Proteins treffen.

#### 3.8.1 Übertragen von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Semi-Dry Western Blot)

Das SDS Gel, das geblottet werden soll, wird zugeschnitten und für 15 min in Kathodenpuffer leicht geschwenkt. Whatman-Filterpapier und die PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) werden auf exakt dieselbe Größe, wie das Gel zugeschnitten, da es durch überstehende Filterpapier- oder Membranränder zu einem Kurzschluss kommen kann. Für 15 s wird die Membran in 100 % Methanol geschwenkt, dann zwei min in MilliQ Wasser gewaschen und anschließend in Anodenpuffer II fünf min geschüttelt.

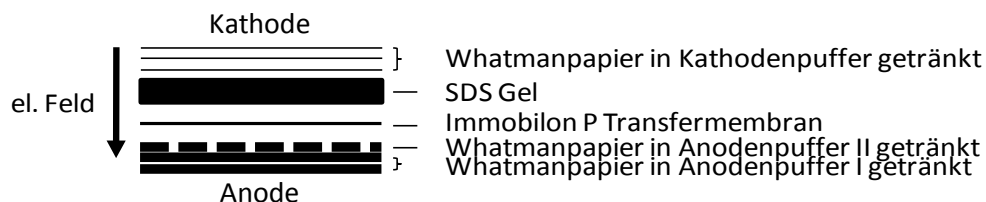


Abb. 16: Zusammenbau des Semi-Dry Blots

Der Zusammenbau des Semi-Dry Blots (siehe Abb. 16) in der Apparatur muss luftblasenfrei sein, weshalb Luftblasen mit einem Stab aus Glas nach dem Zusammenbau durch vorsichtiges Rollen entfernt wurden. Überschüssigen Puffer vorsichtig mit einem Filtertuch aufsaugen. Es wird 1 h bei 20 V (anfänglich ca. 400 mA, Am Ende ca. 110 mA) geblottet. Um die Effizienz des Blottingvorganges zu überprüfen, kann das SDS Gel anschließend noch mit Coomassie Blau G250 angefärbt werden.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Immobilon P Transferpuffer ( vor der Zugabe von Methanol pH einstellen!)

|                            | Komponenten   | Reaktionsansatz |
|----------------------------|---------------|-----------------|
| Anodenpuffer I<br>pH 10,4  | 0,3 M Tris    | 36,34 g/l       |
|                            | 10 % Methanol | 100 ml/l        |
| Anodenpuffer II<br>pH 10,4 | 25 mM Tris    | 3,03 g/l        |
|                            | 10 % Methanol | 100 ml/l        |
| Kathodenpuffer<br>pH 9,4   | 25 mM Tris    | 3,03 g/l        |
|                            | 40 mM Glycin  | 3 g/l           |
|                            | 10 % Methanol | 100 ml/l        |

Die Membran wird nach dem Blotten eine Minute in 100 % Methanol geschwenkt, danach gut mit MilliQ Wasser gewaschen und für 2 Minuten in Coomassie R250 Färbelösung (Tabelle 8) gegeben. Zum Entfernen des nicht gebundenen Farbstoffes wird die Membran eine Minute in deion H<sub>2</sub>O, zehn Minuten in 50 % Methanol mit 7 % Essigsäure und darauf zwei Minuten in 90 % Methanol mit 10 % Essigsäure geschwenkt. Nach anschließendem Lufttrocknen wird die Membran fotografiert.



Tabelle 11: Zusammensetzung 1x TBST

|                         | Komponenten            | Reaktionsansatz |
|-------------------------|------------------------|-----------------|
| 10x TBS<br>pH 7,5 (HCl) | 100mM Tris             | 12,1g           |
|                         | NaCl (9%)              | 90g             |
|                         | deion H <sub>2</sub> O | Ad 1l           |
| 1x TBST                 | 10 x TBS               | 50ml            |
|                         | deion H <sub>2</sub> O | 450ml           |
|                         | Tween 20               | 250µl           |

Die Membran wird nun über Nacht in 5 % Blocking-Puffer (100 ml TBST + 5 g Milchpulver) bei 15°C geschüttelt (Schüttler: Biometra WT16), um alle unspezifischen Bindungen zu blockieren. Dies ist nötig, da so der Hintergrund durch unspezifische Bindungen reduziert und gleichzeitig die Sensitivität des Western Blots erhöht wird.

### 3.8.2 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine mittels Antikörperfärbung

Der Blot wird nun nacheinander mit zwei unterschiedlichen Antikörpern (AK) inkubiert. Hierbei ist der erste Antikörper (Primärantikörper) gegen das gesuchte Protein gerichtet und der zweite Antikörper (Sekundärantikörper) bindet spezifisch an den ersten und ermöglicht somit durch eine an ihn gekoppelte Meerrettich-Peroxidase die Detektion des Proteins. Diese indirekte Markierung führt zu einer Signalverstärkung, da an einen Primärantikörper mehrere Sekundärantikörper binden können. Der Versuch wird wie in Tabelle 12 zu sehen bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln durchgeführt.

Tabelle 12: Antikörperbindung

| Schritt       | Lösung  | Inkubationszeit |
|---------------|---|-----------------|
| Waschen       | 1x TBST                                       | 1 min           |
| 1. Antikörper | 1:1000 Verdünnung<br>→ 20 µl AK auf 20ml TBST | 1 h             |
| Waschen       | 1x TBST                                       | 3x 5 min        |
| 2. Antikörper | 1:5000 Verdünnung<br>→ 10 µl AK auf 50ml TBST | 30 min          |
| Waschen       | 1x TBST                                       | 3x 5 min        |

Direkt im Anschluss erfolgt die „Enhanced Chemiluminescence-Detektion“ (ECL-Detektionssystem), durch die die Proteine auf der PVDF-Membran nachgewiesen werden können. Dazu werden die beiden ECL-Detergenzien (RPN 22209, GEHealthcare Amersham) im 1:1 Verhältnis (je 0,6 ml) gemischt unter Ausschluss von weißem Licht. Mit der Mischung wird die Membran vorsichtig überschichtet und mit einer Klarsichtfolie abgedeckt. Durch die an den zweiten Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase wird eine Reaktion initiiert bei der Chemilumineszenz entsteht. Die Umsetzung von Luminol in die oxidierte Form wird katalysiert, wobei die durch die Reaktion hervorgerufene Energie als Licht freigesetzt wird. Das emittierte Licht kann durch das Auflegen eines Filmes nachgewiesen werden. Die Expositionszeit beträgt zunächst 30 s bevor der Film abgenommen und entwickelt wird. Ist

keine oder nur eine geringe Reaktion nachweisbar, so werden bei weiteren Expositionen von Röntgenfilmen die Zeiten gesteigert.

### 3.8.3 „Stripping“ von Western Blot Membranen

Um eine Western Blot Membran einer weiteren Detektion mit einem anderen Antikörper zu unterziehen, müssen zunächst die auf der Membran gebundenen Proteine entfernt werden. Die an Proteine gebundenen Antikörper und Nachweisreagenzien werden durch eine Inkubation der Membran von einer Stunde bei 55°C in einem Stripping-Puffer unter leichtem schütteln entfernt. Dieser Prozess wird als „Stripping“ bezeichnet. Zur Herstellung des Stripping-Puffers werden in 80 ml 100 mM NaOH zunächst 500 mg DTT gelöst und dann 20 ml 10 % SDS zugegeben. Der Stripping-Puffer entfernt auch die R250 Färbung vollständig. Nach dem Stripping wird die Membran nun über Nacht in 5 % Blocking-Puffer (100 ml TBST + 5 g Milchpulver) bei niedriger Temperatur geschüttelt. Jetzt kann eine erneute Antikörperfärbung wie in Kap. 3.7.2 beschrieben anschließen.

### 3.9 Hemmhoftest (durch Agardiffusion)

Es handelt sich hierbei um eine Methode zur Feststellung ob antimikrobielle Peptide in Testlösungen vorhanden sind. Vor dem Auftropfen der Proben wird ein Schema erstellt und die Orientierung der Hemmhoftplatte festgelegt (Markierungen mit Edding an der Petrischale), zur Erleichterung der späteren Auswertung. Als Positivkontrolle dienen Kanamycin, das sich gegen gram-negative Bakterien, wie z.B. *E.coli* richtet und Lysozym, das gegen gram-positive Bakterien (*M. flavus*) gerichtet ist. Es werden 0,2 ml einer Übernachtskultur eines Bakteriums mit einer Glaspipette auf eine Agarplatte ausgestrichen. Nach dem Antrocknen werden je 1,5 µl der Probe aufgetropft. Die Inkubation erfolgt bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht. Die Hemmhoftplatten werden anschließend entsprechend der festgelegten Orientierung vor schwarzem Hintergrund fotografiert. Die Platten werden zunächst im Original angeschaut und dann mit den Aufnahmen verglichen, um Dinge, die auf den Fotografien nicht zu sehen sind, wie Braunfärbungen auf den zugehörigen Schemata zu notieren.

## 3.10 Zweidimensionale-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine Methode bei der die Isoelektrische Fokussierung und die SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteingemischen kombiniert werden. Diese Methode wurde von O'Farrell (1975) und J. Klose (1975) eingeführt. Vor der 2D-Gelelektrophorese ist es wichtig die Proteinkonzentration via Bradford zu bestimmen, damit immer die gleiche Proteinmenge eingesetzt werden kann. Zudem muss eine bestimmte Proteinmenge pro Probenstreifen aufgebracht werden. Dies hängt von der Länge und dem pH-Gradienten des IPG Streifens ab.

### 3.10.1 Die Isoelektrische Fokussierung (Erste Dimension)

Bei der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) wandert ein Protein im elektrischen Feld zu der Stelle im pH-Gradienten, an der seine Nettoladung gleich Null ist, das heißt zu seinem isoelektrischen Punkt. An dieser Stelle bleibt das Protein, da ein elektrisches Feld nur auf geladenene Moleküle wirken kann. So wird also das Protein an seinem isoelektrischen Punkt (pI) konzentriert bzw. fokussiert. Damit der pH-Gradient stabil bleibt, wird hier ein Immobiline™ DryStrip verwendet. Die Ergebnisse sind besser reproduzierbar und es kann länger und bei höherer Spannung fokussiert werden.

Als erstes muss der IPG (Immobilisierter pH-Gradient) Streifen rehydriert werden. Hierzu wird eine Lösung aus DeStreak Rehydrationslösung und 0,5 % IPG Buffer und der Probe mit einem Gesamtvolumen von 340 µl bei 18 cm Streifen in den Streifenhalter vorgelegt. Es ist wichtig, dass sich die Lösung zwischen den Elektroden befindet, da sie sonst nicht mit dem Streifen in Kontakt kommt. Die DeStreak Rehydrationslösung enthält optimierte Konzentrationen an Harnstoff, Thioharnstoff und Chaps (Seife, solubilisiert z.B. integrale Membranproteine). Jetzt muss die Schutzfolie des Streifens vorsichtig von der positiven Seite beginnend abgezogen werden. Der Gelstreifen wird nun mit der Gelseite nach unten mit der Plusseite startend luftblasenfrei in der richtigen Orientierung aufgebracht, so dass die Lösung unter dem Streifen gleichmäßig verteilt ist. Nachdem sichergestellt ist, dass die Elektrodenenden des IPG Streifens mit den Elektroden Kontakt haben, wird das Ganze mit je 950 ml Silikonöl von außen her langsam überschichtet bis der gesamte Streifen vollständig bedeckt ist. Danach den Deckel aufsetzen und entsprechend der Elektroden in die Apparatur (ETTAN IPGphor 3) einlegen. Jetzt kann das Programm (siehe S. 68; 2-D Electrophoresis Principles and Methods, GE Healthcare), bei dem die Rehydratisierung (aktive Rehydratisierung (20-120 V) als erster Schritt vorangestellt ist, gestartet werden. Es läuft für etwa 18,5 Stunden.

### 3.10.2 Äquilibrierung

Die Äquilibrierung wird entweder direkt nach der ersten Dimension durchgeführt oder aber es wird der IPG Streifen bei -70°C gelagert. Wichtig ist, dass die Äquilibrierung immer direkt vor der 2. Dimension und niemals vor dem Einfrieren durchgeführt wird. Das SDS Gel für die 2. Dimension muss vor der Äquilibrierung fertig gegossen sein.

Die Proteine im IPG- Gelstreifen müssen nach der IEF mit SDS gesättigt werden. Hierzu wird er für 15 min in Puffer 1 (10 ml SDS-Äquilibriumspuffer + 100 mg DTT) unter leichtem schwenken inkubiert. Anschließend werden durch Inkubation (15 min) in Puffer 2 (10 ml SDS-Äquilibriumspuffer + 250 mg Iodacetamid) die freien –SH Gruppen alkyliert, so dass sie nicht reoxidieren können. Nun sind die Proteine bereit für die Auftrennung in der 2. Dimension. (Rehm und Letzel, 2010)

**Tabelle 13: Zusammensetzung des SDS-Äquilibriumspuffer**

| Komponente             | Menge          |
|------------------------|----------------|
| Harnstoff (FW 60.06)   | 72,1 g         |
| Tris-HCl 1,5M pH 8,8   | 10 ml          |
| Glycerol               | 69 ml (84,2 g) |
| SDS                    | 4 g            |
| BPB 1%                 | 400 µl         |
| deion H <sub>2</sub> O | ad 200 ml      |

### 3.10.3 Zweite Dimension (SDS-PAGE)

Für die 2D-Gelelektrophorese wird eine große Apparatur verwendet, daher wird der dreifache Ansatz der Trenngellösung (Tabelle 3) gebraucht. Das Gel der Größe 24 x 20 cm benötigt etwa 45 min zum Festwerden.

Nach der Äquilibriumierung wird der Streifen kurz in den Laufpuffer (Tabelle 6) getaucht, auf der Plastikseite abgestreift und oben direkt ohne Luftblasen über dem SDS-Gel mit der Plastikseite auf die Glasplatte aufgelegt (Position: acidisch links – basisch rechts). Die Elektodenenden werden nun mit einem Skalpell abgeschnitten.

**Tabelle 14: Zusammensetzung der Agaroselösung**

| Komponenten                              | Menge  |
|--|--------|
| Laemmli-Elektrophoresepuffer (Tabelle 6) | 100 ml |
| Agarose                                  | 0,5 g  |
| BPB 1%                                   | 200 µl |

Nachdem alles so vorbereitet ist, wird die Agaroselösung bei 95°C erhitzt. Die auf 60°C abgekühlte Agaroselösung wird nun auf das SDS Gel gegossen, so dass der Streifen gerade bedeckt ist. Den Streifen bis zum Trenngel nach unten schieben, damit ein guter Kontakt zur Gelschicht entsteht (ohne Luftblasen). Zusätzlich werden noch kleine Gelstreifen aufgebracht, die entweder die Probe oder den Längenstandard enthalten. Hierzu wurden 8 µl Längenstandard oder 1 µl + 7 µl 2xSP (5 min denaturiert bei 95°C) auf jeweils 1 cm große Gelstreifenstücke aufgebracht, mit Silikonöl überschichtet und über Nacht inkubiert. Für diese Gelstücke werden rechts und links vom Probenstreifen kleine Taschen in die feste Agarose gemacht, in die diese eingesetzt und nochmals mit etwas Agarose fixiert werden. Die SDS-PAGE bei 60 V ca. 1 Stunde einlaufen lassen und danach auf 180 V hochstellen. Die Apparatur auf mA Anzeige umstellen. Diese zeigt am Anfang rund 50 mA an und sinkt dann langsam ab. Ist die Anzeige auf 35 mA abgesunken, wird die Apparatur auf konstant 35 mA gestellt.

Aufgrund der Größe der Gele braucht man für die Fixierung und die anschließende Coomassie Färbung jeweils einen zweieinhalbfachen Ansatz (Tabelle 9).

### 3.10.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford (1976)

Zur Proteinbestimmung wird als erstes vor jeder neuen Messung eine Eichgerade erstellt. Nachdem die Lösungen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert worden sind, werden sie bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Bradfordlösung

| Komponente             | Menge |
|------------------------|-------|
| Coomassie Blau G250    | 10 mg |
| Ethanol 96 %           | 5 ml  |
| Phosphorsäure 85 %     | 10 ml |
| deion H <sub>2</sub> O | 85 ml |

vollständig lösen

→ 15 min rühren  
→ durch 2 Lagen Filterpapier filtrieren

Ist die Eichgerade erstellt, so kann die Probe mit unbekanntem Proteingehalt gemessen werden. Hierzu werden 4 µl einer 1/20 Verdünnung von Haemolymphe im Bradfordtest eingesetzt (4 µl Probe + 16 µl H<sub>2</sub>O + 1 ml Bradfordlösung). Die Errechnung des Proteingehaltes (µg/µl) in der Hämolymphe erfolgt dann wie folgt.

$$\left( \frac{\text{Absortion A595} \times \text{Wert auf dazugehöriger Eichgerade}}{4} \right) \times 20 = \text{Proteingehalt der Haemolymphe}$$

Eichgerade: BSA (1 mg/ml)

- 1 µl BSA + 19 ml deion H<sub>2</sub>O + 1 ml Bradfordlösung
- 2 µl BSA + 18 ml deion H<sub>2</sub>O + 1 ml Bradfordlösung
- 3 µl BSA + 17 µl deion H<sub>2</sub>O + 1 ml Bradfordlösung
- 5 µl BSA + 15 µl deion H<sub>2</sub>O + 1 ml Bradfordlösung
- 7 µl BSA + 13 µl deion H<sub>2</sub>O + 1 ml Bradfordlösung
- 10 µl BSA + 10 µl deion H<sub>2</sub>O + 1 ml Bradfordlösung
- 15 µl BSA + 5 µl deion H<sub>2</sub>O + 1 ml Bradfordlösung
- 20 µl BSA + 1 ml Bradfordlösung
- 20 µl deion H<sub>2</sub>O + 1 ml Bradfordlösung (= Referenzlösung)

Tabelle 16: Beispiel einer Eichgerade

| µl BSA | II A595 |
|--------|---------|
| 1      | 0,012   |
| 2      | 0,045   |
| 3      | 0,127   |
| 5      | 0,238   |
| 7      | 0,330   |
| 10     | 0,403   |
| 15     | 0,612   |
| 20     | 0,899   |

### 3.11 Nachweis von Noduli bei infizierten Larven und adulten Bienen

#### 3.11.1 Präparation von Larven

Die Larven werden auf der Wärmeplatte aus der 24 Napf-Platte entnommen, kurz in einem Wasserbad gewaschen und danach trockengetupft. Die von Futterresten gesäuberte Larve wird auf Parafilm überführt, der auf einer dunklen Wachsplatte liegt.

Am cranialen und caudalen Ende der Larve wird diese nun dorsal fixiert (Abb. 17A). Auf der ventralen Seite wird die Larve komplett aufgeschnitten, die Haut auseinandergeklappt und mit 4 Präpariernadeln fixiert (Abb. 17B). Anschließend wird das Präparat durch das

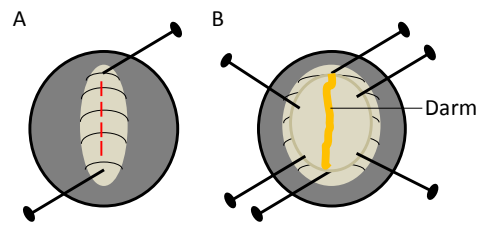


Abb. 17: Schema der Präparation einer Larve. A) Fixierung der Larve. Schnittlinie in rot. B) Fixierung nach dem auseinanderziehen der Haut der Larve am Schnitt, so dass das Innenleben der Larve und der Darm sichtbar werden.

Stereomikroskop Olympus SZX7 mit der Olympuskamera UC30 fotografiert. Um Spiegelungen aufgrund der Haemolymphe herabzusetzen wurde ein Polarisationsfilter verwendet. Wenn Noduli vorhanden sind werden diese gezählt.

#### 3.11.2 Präparation von adulten Bienen

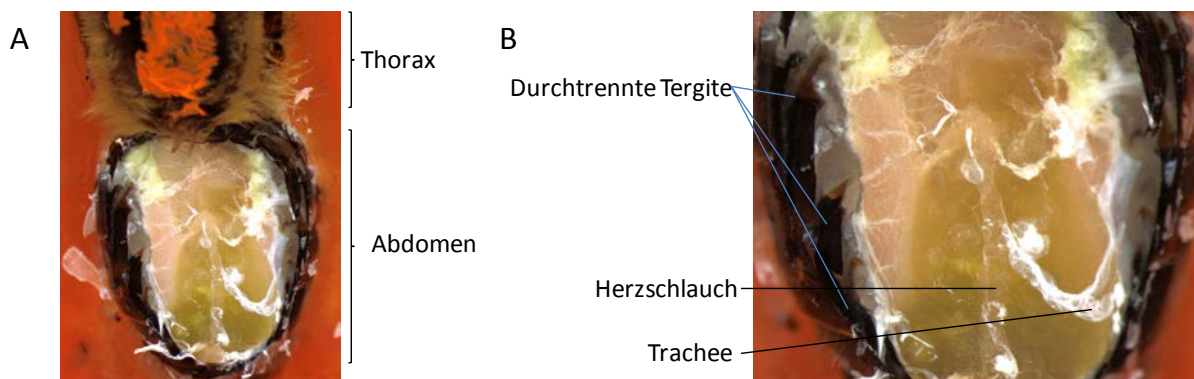


Abb. 18: Präparation eines adulten Drohns. A) In Wachs eingebetteter Drohn, dem die Tergite schon entfernt worden sind. B) Vergrößerung des Abdomens auf dem die bei der Präparation durchtrennten Tergite erkennbar sind, sowie der Herzschlauch und die Tracheen.

Die Bienen werden auf Eis gekühlt bis sie bewegungsunfähig sind. Zur Präparation werden den Bienen der Kopf, die Beine und die Flügel entfernt. Thorax und Abdomen werden danach auf einer Wachsplatte ventral in Wachs eingebettet (Abb. 18). Der Thorax bleibt zur Stabilisation am Abdomen, dies erleichtert die weiteren Schritte der Präparation. Am Abdomen werden nun seitlich die Tergite mit einem kleinen Skalpell durchtrennt. Die Tergite werden von einer Seite zur anderen vorsichtig vom Abdomen gelöst, so dass an den Tergiten nichts von den Tracheen, dem Herzschlauch und dem Fettkörper hängen bleibt. Auf diese Weise erhält man eine Aufsicht auf das Innere des Abdomens und kann sehen, ob Noduli vorhanden sind. Bei der Präparation von Noduli bei Drohnen ist zu beachten, dass die Tergite härter sind und somit mit einer gebogenen Mikroschere durchtrennt werden sollten. Ist das Abdomen aufpräpariert, so ist der pumpende Herzschlauch relativ mittig zu sehen.

Tracheen sind über das gesamte Abdomen verteilt (Abb. 18B). Im zum Thorax hin liegenden Bereich ist als erstes der Honigmagen zu sehen, der je nach Fütterungszustand der Biene in seiner Größe variiert. Anschließend daran kommen der Mitteldarm und dann der Enddarm, der fast das gesamte Abdomen ausfüllt. Aufgrund der Füllung des Enddarmes können Sommer und Winterbienen unterschieden werden. Auch sind Pollensammlerinnen leicht von Nektarsammlerinnen zu unterscheiden anhand der intensiven Färbung des Enddarmes durch die Farbe des Pollens.

### 3.12 Abnahme Koloniebildender Einheiten nach einer bakteriellen Infektion

Den Bienen wird 1 µl ( $2 \times 10^8$  KBE/ml) *E.coli* injiziert, dies entspricht  $\sim 2 \times 10^5$  Zellen und nach bestimmten Zeitwerten die Haemolymphe entnommen. Es wird immer von zwei Bienen die Haemolymphe entnommen pro Zeitpunkt nach der Infektion (30 min, 1, 2, 4, 6, 20, 24 und 30 h). Die Haemolymphe wird nicht mit PTU/Aprotinin versetzt, um die Bakterien nicht zu schädigen, sondern auf Eis gekühlt und eine Verdünnung hergestellt ( $10^{-2} \rightarrow 3 \mu\text{l}/300 \mu\text{l}$ ;  $10^{-1} \rightarrow 50 \mu\text{l}/450 \mu\text{l}$ ), bei der die Kolonienanzahl möglichst leicht zählbar sein könnte ausgehend von der Anfangskonzentration, die der Biene injiziert wurde. Pro Biene wird eine Verdünnung gemacht. Je 100 µl dieser Verdünnung werden auf zwei NB-Agarplatten ausplattiert und für 12-24 Stunden bei 37°C in den Wärmeschrank gestellt. Als Anfangswert wird die ursprüngliche Bakterienkultur genommen, die injiziert wurde, und um den Faktor  $10^7$  verdünnt mit PBS. Je 100 µl dieser Verdünnung werden auf zwei NB-Agarplatten ausplattiert. Der Verdünnungsfaktor wird mit der Zeit reduziert, da die Zellzahl in der Haemolymphe abnimmt bei Larven und adulten Bienen. Bei Puppen wird der Verdünnungsfaktor nach dem sechs Stundenwert so angepasst (erhöht), dass die resultierenden Kolonienanzahlen gut zählbar sind.

Die auf den Platten gewachsenen Kolonien werden ausgezählt und zwischen den beiden Platten für eine Biene ein Mittelwert gebildet. Den Mittelwert multipliziert man nun mit dem Verdünnungsfaktor, dann wird er durch 1000 geteilt und mit der entnommenen Haemolymphe multipliziert. Auf diese Weise erhält man die Bakterienanzahl pro Biene. Nun wird wiederum ein Mittelwert aus den beiden Parallelproben (immer zwei Bienen pro Zeitwert) gebildet.

### 3.13 Die Infektion mit Nosema

Es wurden frisch geschlüpfte Arbeiterinnen von einer Wabe abgesammelt und für 6 Tage in Käfigen gehalten. Sie erhielten Zuckerlösung ad libitum und eine Pollenpaste, die zum Abtöten eventueller Nosemasporen erhitzt worden war. Nach 6

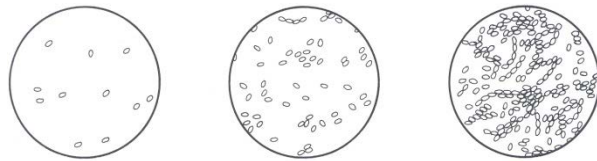


Abb. 19: Lichtmikroskopisches Bild zur Abschätzung des Nosemabefalles.

Tagen wurden die Arbeiterinnen so auf Käfige aufgeteilt, dass es zwei Kontrollgruppen gab und zwei Gruppen denen Nosemasporen gefüttert wurden. Die Infektionslösung war eine Mischung aus Apiinvert, Wasser und einer Sporenlösung, von der pro Käfig 6 ml verfüttert wurde. Es wurde eine *Nosema ceranae* – Infektionslösung von Daniel Michelberger verwendet. Nachdem diese Lösung komplett verfüttert worden war, wurde bis zum Versuchsende reines Apiinvert verfüttert. Vier Tage nach der Fütterung der Infektionslösung wurde kontrolliert ob die Infektion erfolgreich war, indem mehrere Bienen auf Nosemasporen untersucht wurden. Dazu wurden die Abdomen der Bienen mit ca. 5-10 ml Wasser zermörsert. Ein Teil der so entstandenen Suspension wurde nun Lichtmikroskopisch auf Sporen hin untersucht. Bei der Untersuchung einzelner Bienen auf Nosema wurde der Darm verwendet, der durch ziehen am Stachelapparat herauspräpariert wurde. Dann wurde nur der Darminhalt mit etwas Wasser verdünnt lichtmikroskopisch untersucht. Der Befall wurde anschließend in die vier Kategorien: kein Befall, leichter, mittlerer und starker Befall eingeteilt (Abb. 19).

Für die gelelektrophoretische Untersuchung wurde zu jedem restlichen Bienendarm 10 µl 2xSP gegeben und das Ganze eingefroren. Nach kräftigem Vermischen nach dem Auftauen und anschließendem Zentrifugieren, wurden die Darmproben für 3 min bei 80°C erhitzt. Danach wieder zentrifugiert und abermals kräftig vermischt bevor sie für 5 min bei 95°C stark erhitzt wurden. Von der so entstandenen Suspension wurde 3 µl mit 14 µl 2xSP vermischt und ein Teil davon auf 10 oder 15 % PAA/0,1 % SDS Gele aufgetragen.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 *In vitro* Aufzucht von Drohnenlarven

Die Entwicklung von Drohnenlarven unterscheidet sich von der Entwicklung der Arbeiterinnenlarven nicht nur in der Zellgröße, in denen diese herangezogen werden. Bei den Arbeiterinnen dauert es 21 Tage und bei Drohnen 24 Tage bis zum Schlupf (Abb. 2). Die Drohnenlarven erreichen ein Frischgewicht von 262-419 mg vor der Verdeckung im Gegensatz zu Arbeiterinnenlarven mit ca. 150 mg (Hrassnigg und Crailsheim, 2005). Am Beginn des Vorpuppenstadiums haben im Labor aufgezogene Arbeiterinnenlarven ein Gewicht von  $136,6 \pm 8,4$  mg und Drohnenlarven ein Gewicht von  $350,7 \pm 18,1$  mg (Jay, 1963).

#### 4.1.1 Etablierung der Larvenaufzucht für Drohnenlarven

Tabelle 17: Diäten zur Aufzucht von Arbeiterinnen- und Drohnenlarven

| frisches Gelee Royale            |  |                                    |                                    |  |
|----------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|--|
|                                  | A<br><i>Genersch et al.</i><br>2005                        | A<br><i>Aupinel et al.</i><br>2005 | A<br><i>Behrens et al.</i><br>2007 | D<br><i>Wegener und</i><br><i>Bienefeld 2008</i> |
| Gelee Royal                      | 66 % v/v   | 50 % v/v                           | 66 % v/v                           | 51 % v/v   |
| deion Wasser                     | 28 %   | 30 %                               | 28 %                               | 29,1 %   |
| Fructose                         | 3 % w/v  | 9 % w/v                            | 3 % w/v                            | 5,8 % w/v  |
| Glucose                          | 3 % w/v  | 9 % w/v                            | 3 % w/v                            | 14,1 % w/v                                       |
| Yeast Extract                    | -  | 2 % w/v                            | -                                  | -  |
| gefriergetrocknetes Gelee Royale |  |                                    |                                    |  |
|                                  | A<br><i>Randolt et al. 2008</i><br><i>Peng et al. 1992</i> |                                    | D<br><i>Heike Gätschenberger</i>   |  |
| Gelee Royal                      | 4,2 g  | 26,25 % w/v                        | 3,4 g                              | 22,66 % w/v                                      |
| Fructose                         | 0,6 g  | 3,75 % w/v                         | 0,6 g                              | 4,00 % w/v                                       |
| Glucose                          | 0,6 g  | 3,75 % w/v                         | 1,4 g                              | 9,33 % w/v                                       |
| Yeast Extract                    | 0,2 g  | 1,25 % w/v                         | -                                  | 0 % w/v  |
| ad H <sub>2</sub> O              | 16ml   | 65 %                               | 15ml                               | 64 %   |

A = Arbeiterinnendiät; D = Drohnen diät ab Tag 5; Frisches Gelee Royale = flüssiges Gelee Royale; gefriergetrocknetes Gelee Royale = Pulverförmiges Gelee Royale

Bei der *in vitro* Aufzucht von Drohnenlarven wurden diese zunächst genauso wie die Arbeiterinnenlarven gefüttert. Dabei wurde festgestellt, dass die Larven sich nach Tag 5-6 nicht mehr weiter normal entwickelten oder starben.

Im Stock erhalten Drohnen während der zweiten Hälfte der Larvalentwicklung ein stärker mit Kohlenhydraten angereichertes Futter (Hrassnigg und Crailsheim, 2005). Daher wurden

zuerst jeweils 0,7 g Fructose und Glucose statt der 0,6 g eingesetzt. Bei dieser Abänderung der Diät überlebten die Drohnenlarven. Da hier immer noch ein relativ hoher Anteil an Larven starb, wurde das Futter angelehnt an Wegener und Bienefeld (2008) geändert. Drohnenlarven werden zuerst mit dem gleichen Futter wie Arbeiterinnen gefüttert, danach enthält das Futter weniger Proteine und Fett und mehr Kohlenhydrate. Das heißt Hefeextrakt wird ab Tag 5 vollständig weggelassen, das Gelée Royale etwas reduziert und die Menge an Glucose mehr als verdoppelt. So konnte die Sterberate von 18,2 % auf 7,3 % ab Tag 5 gesenkt werden.

#### 4.1.2 Aufzucht der Drohnenlarven bis zum adulten Drohn

13 von 30 ins Puppenstadium gegangene Drohnen haben sich bis zur Imago entwickelt, wiesen aber Verkrüppelungen oder leichte Bewegungsstörungen auf und waren mit einem Durchschnittsgewicht von 191,4 mg sehr leicht (normal ~ 277 – 290 mg).



Abb. 21: Drohn, der *in vitro* aufgezogen wurde, bei Laufversuchen. An der Beinhaltung sind die motorischen Störungen gut erkennbar.

Bei weiteren Aufzuchtreihen konnte das Durchschnittsgewicht beim Schlupf auf 204,6 mg bzw. 232,3 mg gesteigert werden. Auch haben sich hier 2/3 der Drohnenpuppen bis zur Imago entwickelt. Aber auch bei diesen Reihen waren Verkrüppelungen und Störungen in der Motorik zu beobachten. Die *in vitro* Aufzucht von Drohnen dauert mit rund 25 Tagen ca. 1 Tag länger als die Aufzucht von Drohnen im Stock unter natürlichen Bedingungen dauert.

Die Aufzucht der Puppen wurde zunächst noch mit „Windeln“ aus Papierstreifen durchgeführt. Bei späteren Aufzuchtreihen wurde darauf verzichtet, da das Papier sich durch seinen Faltenschlag negativ auf die Entwicklung der Drohne auswirkte. Auch hatten Futterreste und das Abkoten beim Übergang vom Larval ins Vorpuppen und Puppenstadium keinen Einfluss auf die Entwicklung der Puppen zum adulten Drohn. Durch das Weglassen der „Windel“ musste auch ab dem Zeitpunkt an dem die Larve zuletzt gefüttert worden ist, nicht mehr auf irgendeine Weise eingegriffen werden.



Abb. 20: Ein *in vitro* aufgezogener Drohn beim Schlupf.

#### 4.1.3 Wachstumskurve von Drohnenlarven während der *in vitro* Aufzucht

Drohnenlarven brauchen eine längere Entwicklungszeit als Arbeiterinnenlarven und sind fast doppelt so schwer, wenn sie verdeckelt werden. Bei *in vitro* aufgezogenen Larven haben Arbeiterinnenlarven am Ende etwa 151,5 mg und Drohnenlarven haben durchschnittlich 350 mg. Von anfänglichen 0,39 mg nehmen Drohnenlarven konstant an Gewicht zu und haben es am Ende der Larvalentwicklung nahezu vertausendfacht.

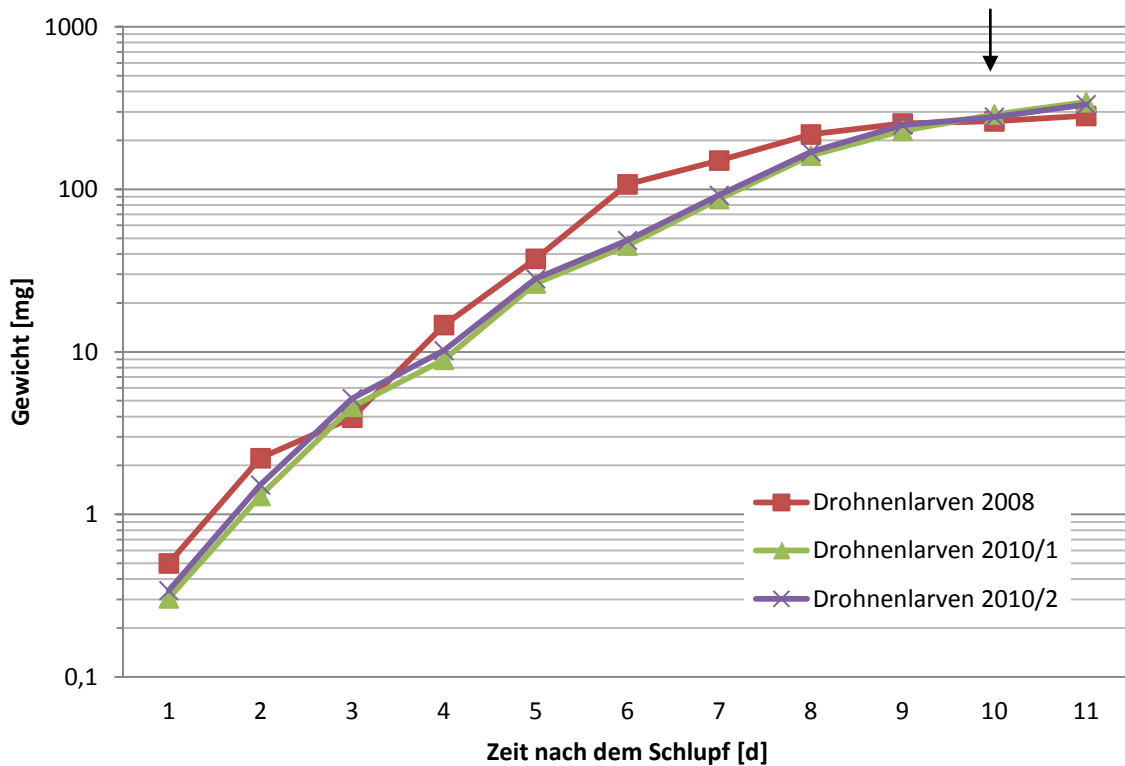


Abb. 22: Gewichtszunahme von *in vitro* aufgezogenen Drohnenlarven. Drohnergewichte aus den Aufzuchtzeihen 2008, 2010/1 und 2010/2. Der Pfeil markiert den Beginn des Vorpuppenstadiums bei den Drohnen.

Anhand der Wachstumskurve kann auf das larvale Entwicklungsalter rückgeschlossen werden und somit für spätere Versuche das Alter genauer bestimmt werden. Abweichungen vom normalen Wachstum von Larven können so leichter erkannt werden. Es kam z.B. 2009 bei einer *in vitro* Aufzucht zu einer Stagnation der Gewichtszunahme der Drohnenlarven, so dass der Versuch abgebrochen werden musste.

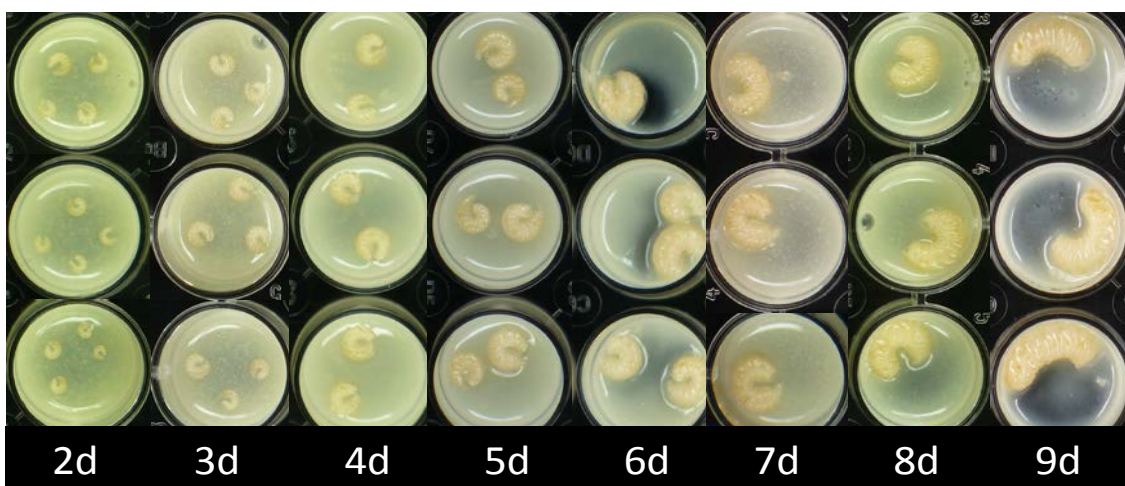


Abb. 23: Drohnenlarven während der *in vitro* Aufzucht in Nöpfen mit Larvenfutter von Tag 2 bis 9. Ab Tag 5 bekamen die Larven Drohnenfutter, das aufgrund der geringeren Menge an Gelée Royal heller und weniger viskos war. Aufgrund der exponentiellen Gewichtszunahme wurden die Larven ihrer Größe entsprechend vereinzelt.

Das Gewicht kann aber nicht allein zur Bestimmung des Larvalstadiums herangezogen werden, da es immer leichte Abweichungen nach oben oder unten gibt. Der zeitliche Verlauf der *in vitro* Aufzucht wurde daher als zweiter Faktor mit einbezogen.

**Tabelle 18: Gewichtsreihen *in vitro* aufzogener Drohnenlarven von 2008 und 2010.**

| Tag | Drohnenlarven<br>2008<br>[mg] | Drohnenlarven<br>2010/1<br>[mg] | Drohnenlarven<br>2010/2<br>[mg] | Arbeiterinnen<br>(Randolt et al., 2008)<br>[mg] |
|-----|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
| 1   | 0,5                           | 0,305                           | 0,34                            | 0,28  |
| 2   | 2,22                          | 1,3                             | 1,52                            | 1,03  |
| 3   | 3,94                          | 4,6                             | 5,16                            | 7,36  |
| 4   | 14,64                         | 8,95                            | 10,2                            | 29  |
| 5   | 37,42                         | 26,38                           | 28,18                           | 80,66   |
| 6   | 107,44                        | 45,18                           | 48,55                           | 151,5   |
| 7   | 150,62                        | 87,31                           | 92,02                           |   |
| 8   | 217,82                        | 161,6                           | 169,86                          |   |
| 9   | 254,5                         | 229,2                           | 248,7                           |   |
| 10  | 262,1                         | 289,1                           | 278,9                           |   |
| 11  | 283,1                         | 344,08                          | 332,5                           |   |
| 12  | 375,2                         |                                 |                                 |   |

An Tag 1 und 2 wurde von je 20 Larven, vom 3.-7. Tag von je 5 Larven und vom 8.-12. Tag von je 3 Larven das Gewicht ermittelt. Die Werte für Arbeiterinnen sind Durchschnittswerte aus 4 Gewichtskurven.

#### 4.1.4 Die Proteinzusammensetzung der Haemolymphe von Drohnenlarven während der Larvalentwicklung

Während der Larvalentwicklung von Drohnenlarven kommt es zu großen qualitativen und quantitativen Änderungen in der Zusammensetzung der Proteine in der Haemolymphe.

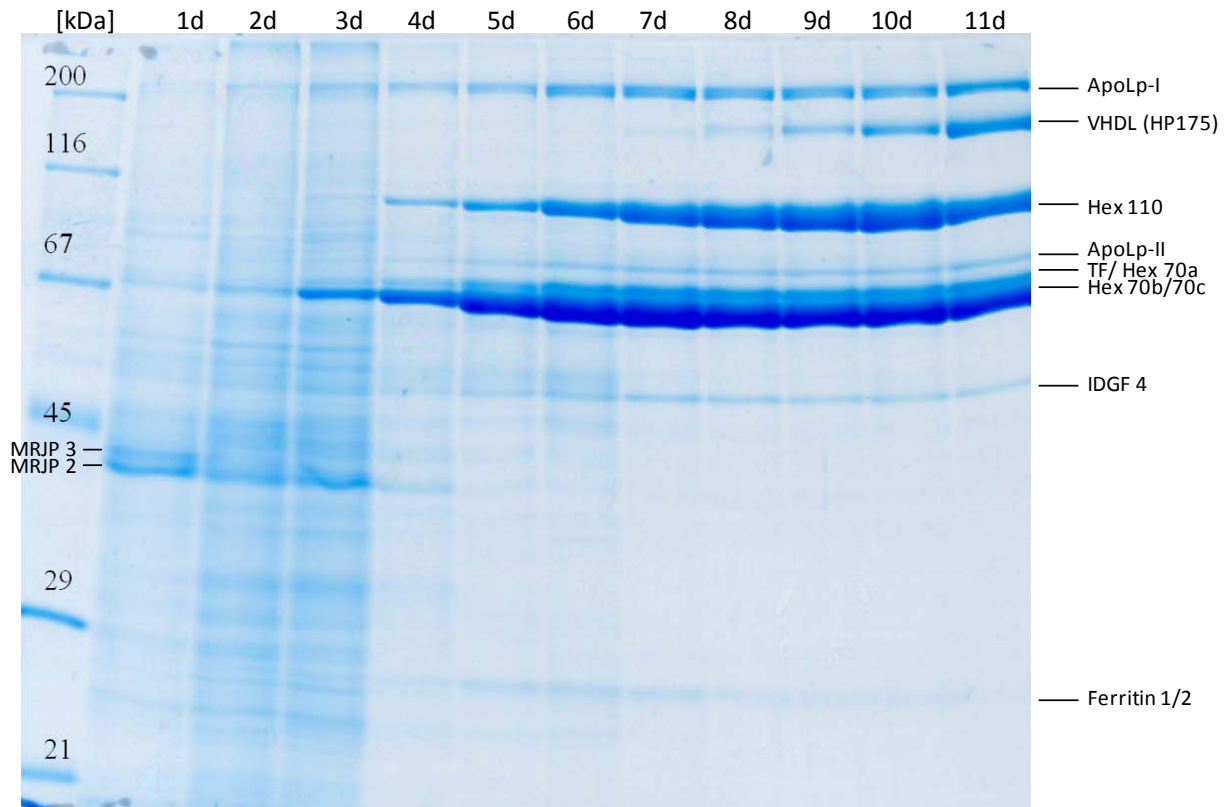


Abb. 24: Proteinmuster während der Larvalentwicklung der Drohnen von der frisch geschlüpften Larve bis zur Streckmade. Proteinauftrennung im hochmolekularen Bereich; 10% PAA/0,1% SDS, Laemmli, 8,5 cm, Coomassie Blue G250. Tag 1: 20 Larven + 5 µl PTU/Aprotinin + 10 µl PBS, mörsern, zentrifugieren, Überstand abnehmen; Tag 2: 20 Larven + 5 µl PTU/Aprotinin, mörsern, zentrifugieren, Überstand abnehmen; Tag 3: Haemolymphe von 5 Larven mit Kapillare entnehmen und in 3 µl vorgelegtes PTU/Aprotinin; Tag 4-7: Haemolymphe von je 5 Larven; Tag 8-9: Haemolymphe von je 3 Larven; Tag 10-11: Haemolymphe von je 2 Larven. Von Tag 4-11 wurde der Haemolympfmenge entsprechend PTU/Aprotinin zugefügt(1/10). Hex =Hexamerin; ApoLp = Apolipoporphin; TF = Transferrin; VHDL= very high density lipophorin; MRJP = Major royal jelly protein; IDGF = imaginal disc growth factor.

Sind in den ersten Tagen noch die MRJPs (Major Royal Jelly Proteine) dominante Bestandteile des Larvenextraktes, so ändert sich dies ab Tag 3. Das MRJP 2 ist aber bis zum Tag 6 in der Haemolymphe sichtbar. Speicherproteine, wie die Apolipoporphine und die Hexamerine werden nun ab Tag 3 und 4 zu Hauptbestandteilen der Haemolymphe. Hierbei ist auch zu beachten, dass an den ersten beiden Tagen ein Gesamtlarvenextrakt und erst ab Tag 3 ausschließlich Haemolymphe verwendet wurde, da in der frühen Phase der Larvalentwicklung eine Haemolymphentnahme in ausreichender Menge nicht möglich war. Es ist aber dennoch zu sehen, dass die Menge des Apolipoporphin I von Beginn der Larvalentwicklung an stetig zunimmt. Dasselbe gilt auch für die Hexamerine 70a, 70b, 70c und das Transferrin. Das Apolipoporphin II und das Hexamerin 110 sind erst ab Tag 4 sichtbar, erfahren aber eine starke Zunahme bis zum Ende der Larvalentwicklung. VHDL (very high

density lipophorin) ist erst ab Tag 7 in der Haemolymphe zu sehen. Dieses späte Auftreten von VHDL in der Larvalentwicklung deutet auf eine Rolle im Lipidtransport, sowie im Speichermetabolismus während der Metamorphose hin (Shipman et al., 1987). IDGF 4 (imaginal disc growth factor) und Ferritin sind über die gesamte Larvalentwicklung Bestandteil der Haemolymphe.

Bei Ferritin 1/2 handelt es sich um ein segregiertes Eisenspeicherprotein, das aus 24 Untereinheiten besteht die eine Hohlkugel bilden. Es gibt zwei Typen von Untereinheiten und zwar die schwere und die leichte Untereinheit (Nichol et al., 2002).

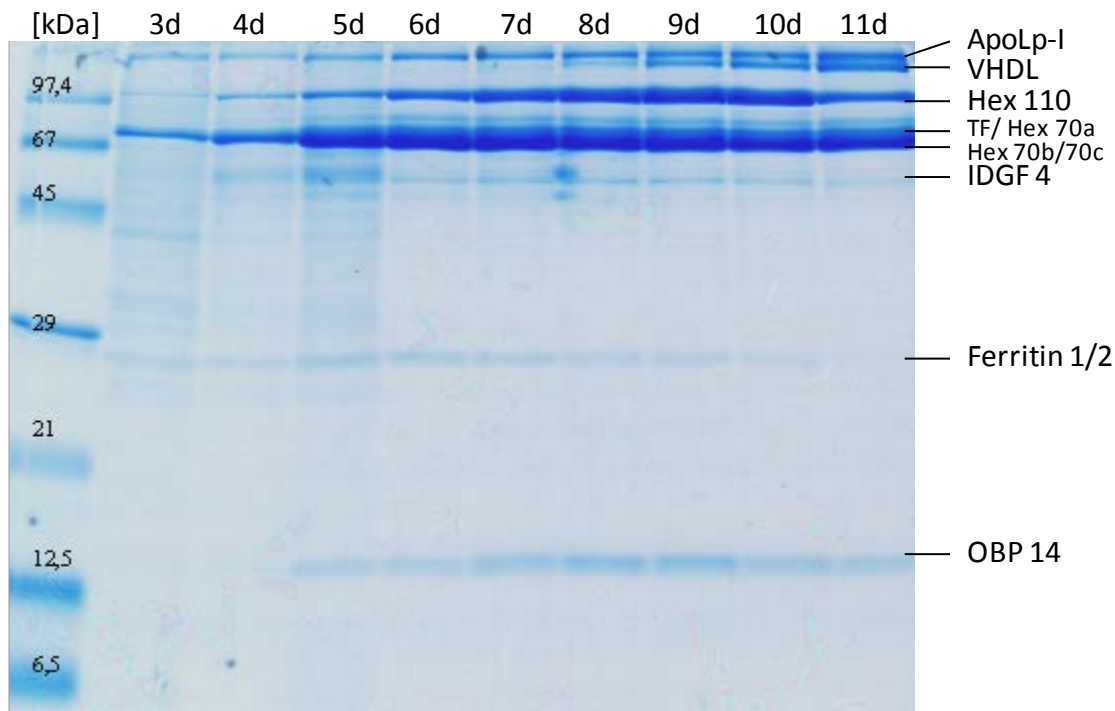


Abb. 25: Haemolymphproteine von Drohnenlarven während der Larvalentwicklung von Tag drei bis Tag elf. Proteinauftrennung im niedermolekularen Bereich: 15% PAA/0,1% SDS, Laemmli, 8,5 cm, Coomassie Blue G250. ApoLp = Apolipoporphin; IDGF = imaginal disc growth factor; OBP = odorant binding protein; TF = Transferrin; VHDL= very high density lipophorin; Hex = Hexamerin.

Für eine bessere Auftrennung der Proteine im niedermolekularen Bereich wurden Haemolymphproben im 15 %PAA/0,1% SDS Gel aufgetrennt. In diesem Bereich der Haemolymphe von Drohnenlarven sind nur wenige Proteine in einem eindimensionalen SDS-Gel zu sehen. Das OBP14 (odorant binding protein) ist am markantesten zu erkennen und taucht erst zwischen Tag 4 und 5 in der Haemolymphe der Drohnenlarven auf.

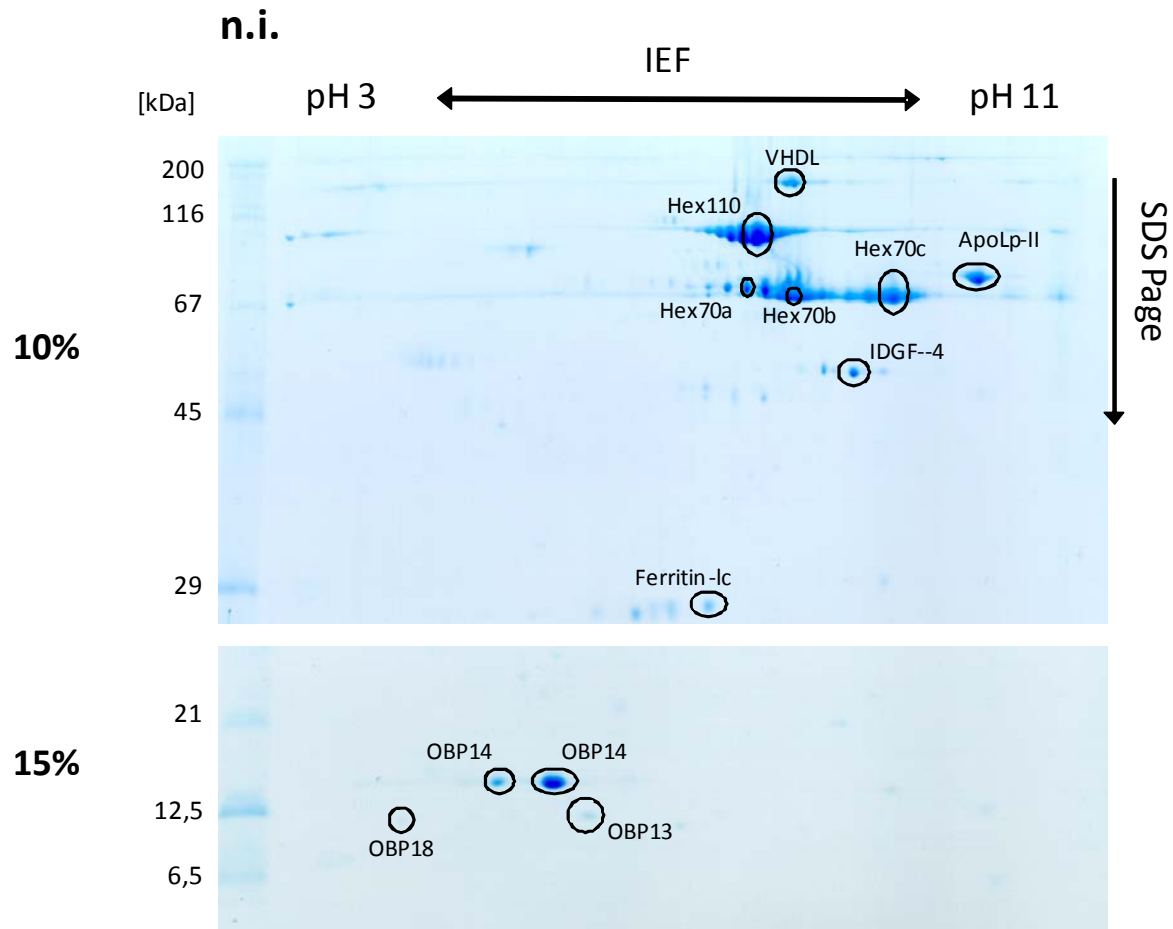


Abb. 26: Charakterisierung der Haemolympheproteine von nicht infizierten Drohnenlarven mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese. Drohnenlarven wurde am 7. Tag der *in vitro* Aufzucht Haemolymphe entnommen und die Proteine durch 2D Gelelektrophorese (10% PAA/0,1% SDS Gel und 15 % PAA/0,1% SDS Gel (Laemmli, 8,5 cm, Coomassie Blue G250)) aufgetrennt. Ausgewählte Proteinspots wurden ausgeschnitten und mittels nano HPLC/MS analysiert. VHDL = very high-density lipophorin; ApoLp-II = apolipophorin-II; IDGF-4 = imaginal disc growth factor; OBP = odorant binding protein; Hex = Hexamerin.

Mittels 2D Gelelektrophorese werden die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem pI-Wert und in der 2. Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dadurch werden auch Proteine, die durch andere aufgrund eines ähnlichen oder gleichen Molekulargewichtes in einem eindimensionalen Gel überlagert werden, sichtbar. Dies wird besonders bei den Hexamerinen 70a, 70b und 70c deutlich. Zudem ist ersichtlich, dass einige Proteine in unterschiedlichen Phosphorylierungsformen vorliegen, wie z.B. das Hexamerin 110.

Im niedermolekularen Bereich ist gut erkennbar, dass OBP 13 und OBP 18 annähernd dasselbe Molekulargewicht haben und somit nahezu auf gleicher Höhe laufen, sich aber im pI-Wert deutlich unterscheiden. Der pI-Wert ohne Signalpeptid von OBP 13 ist 5,6 und der von OBP 18 ist 4,5. Auch im zweidimensionalen Gel ist OBP 14 der auffälligste Proteinspot bei Drohnenlarven im Bereich unterhalb von 21 kDa.

## 4.2 Humorale Immunreaktionen von Drohnenlarven

Bei Drohnenlarven wurden in unterschiedlichen Larvalstadien und mit verschiedenen mikrobiellen Komponenten Infektionsversuche durchgeführt.

Es wurde *Escherichia coli* 682 als Gram-negatives und *Micrococcus flavus* als Gram-positives Bakterium verwendet. Lipopolisaccharide (LPS) sind Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und Peptidoglycan (PGN) ist Bestandteil der Gram-positiven Bakterienhülle. Laminarin ( $\beta$ -1,3-Glucan) aus Braunalgen, ein Polysaccharid, das dort der Energiespeicherung dient, wurde verwendet. Als Bestandteil von Pilzzellwänden induziert Laminarin ( $\beta$ -1,3-Glucan) Immunreaktionen bei Insekten (Korner und Schmid-Hempel, 2004). Daher soll damit eine Abwehrreaktion angeregt werden, die einer Immunreaktion nach einer Infektion mit *Ascosphaera apis*, dem Erreger der Kalkbrut (s. Abb. 6), vergleichbar ist.

### 4.2.1 Proteinanalyse der Haemolymphe von Drohnenlarven nach bakterieller Infektion

Nach einer Infektion mit *E.coli* 682 kommt es zur Bildung der AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1. Hierbei handelt es sich um niedermolekulare Peptide.

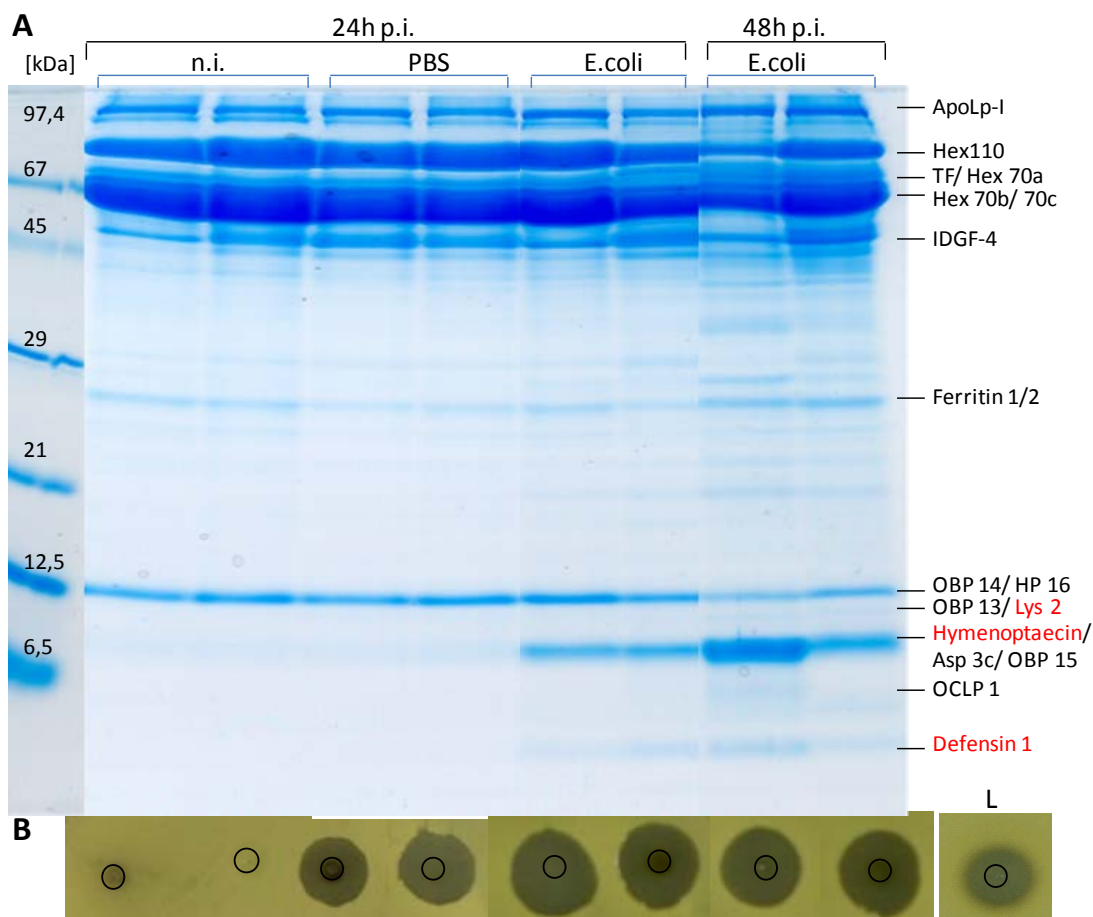


Abb. 27: Charakterisierung transient exprimierter Proteine in der Haemolymphe von je zwei 7d alten Drohnenlarven nach einer Verletzung (Injektion von PBS) und nach einer Infektion mit *E.coli* 682. A) Aliquote ( $1\mu\text{l}$ ) der Haemolympfproben wurden auf ein 15% PAA/0,1% SDS Gel aufgetragen und mit Coomassie Blau G250 angefärbt.

ApoLp = Apolipoprotein; Lys = Lysozym; Hex = Hexamerin; IDGF = imaginal disc growth factor; TF = Transferrin; HP = Hypothetisches Protein; Asp 3c = Antennenspezifisches Protein 3c; OCLP 1 =  $\omega$ -conotoxin-like protein 1. B) Nachweis antibakterieller Aktivität in der Haemolymphe mittels Hemmhoftest. Als Indikatorbakterium wurde das Gram<sup>+</sup> Bakterium *Micrococcus flavus* verwendet und als Positivkontrolle diente Lysozym = L.



Nach einer Verletzung, die durch die Injektion mit PBS (Phosphate Buffer Saline) simuliert wurde, waren hingegen keine AMPs zu sehen. Die Immuninduzierten Peptide Lysozym 2 und OCLP 1 ( $\omega$ -conotoxin-like protein 1) treten auch nur nach *E.coli* Infektion auf (Abb. 27).

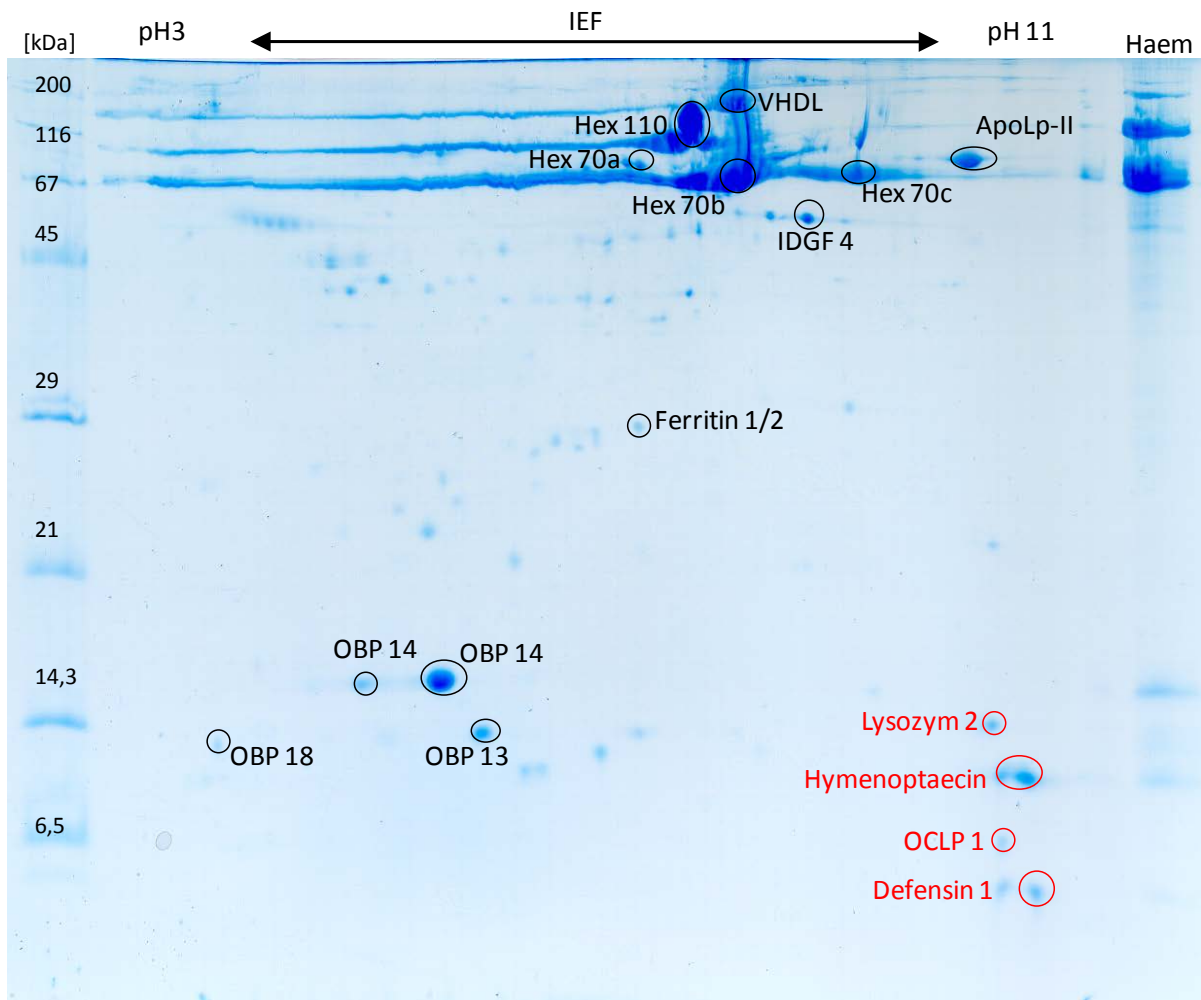


Abb. 28: Analyse der Haemolymphproteine infizierter Drohnenlarven mittels 2D Gelelektrophorese. Es wurde Drohnenlarven, denen am 9. Tag der *in vitro* Aufzucht LPS (0,5  $\mu$ g) injiziert wurde, nach 24h p.i. Haemolymph entnommen und die Proteine durch 2D Gelelektrophorese aufgetrennt. Ausgewählte Protein-Spots wurden ausgeschnitten und mittels nano HPLC/MS analysiert. VHDL = very high-density lipoprotein; Hex = Hexamerin, ApoLp-II = Apolipoprotein-II; IDGF-4 = imaginal disc growth factor; OBP = odorant binding protein; H = Haemolymph. 15 % PAA / 0,1 % SDS Gel Laemmli, Coomassie Blau G250, 19 cm x 20 cm

Auch im 2D-Gel ist gut zu erkennen, dass nach einer bakteriellen Infektion mit *E.coli* die bekannten AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 im niedermolekularen Bereich auftauchen, die bei nicht infizierten Larven nicht vorhanden sind. Weiterhin ist bei der 2D-Gelelektrophorese zu sehen, dass die AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 im basischen Bereich liegen (Abb. 28). Der pI-Wert von Hymenoptaecin ist 9,85 und der von Defensin 1 ist 8,64. Zusätzlich zu den beiden AMPs werden noch Lysozym 2 und OCLP 1, das zu den APT-like (Animal peptide toxins) Proteinen gehört (Kaplan et al., 2007), nach einer Infektion hochreguliert. Das Lysozym 2 ist im 2D-Gel besonders gut zu sehen, da es im 1D-Gel vom OBP 13 überlagert wird.

#### 4.2.2 Die Expression antibakterieller Peptide in der Haemolymphe von Drohnenlarven nach Injektion unterschiedlicher Elizitoren

Schon nach einer Verletzung ist bei Larven im Hemmhoftest eine starke Reaktion zu beobachten, die ähnlich der Reaktion auf *E.coli* Infektion ist (Abb. 27). Die antibakterielle Aktivität der Haemolymphe von Larven, die mit PGN und LPS (täuschen Gram-positive bzw. Gram-negative Bakterien vor) infiziert wurden, ist kaum stärker als die nach einer Verletzung (Abb. 29). Diese ist aber über die gesamte Larvalentwicklung gleichbleibend stark. Nach Verletzung (PBS) ist hingegen zu beobachten, dass die Reaktion mit dem Alter der Larven zurückgeht (Abb. 31). Nach einer Infektion mit *E.coli* ist die antibakterielle Aktivität, wenn überhaupt nur minimal stärker als die Reaktion auf einzelne Bakterienbestandteile, wie LPS oder PGN (Abb. 29). Aber die bekannten AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 werden ungefähr gleich stark in der Haemolymphe exprimiert.

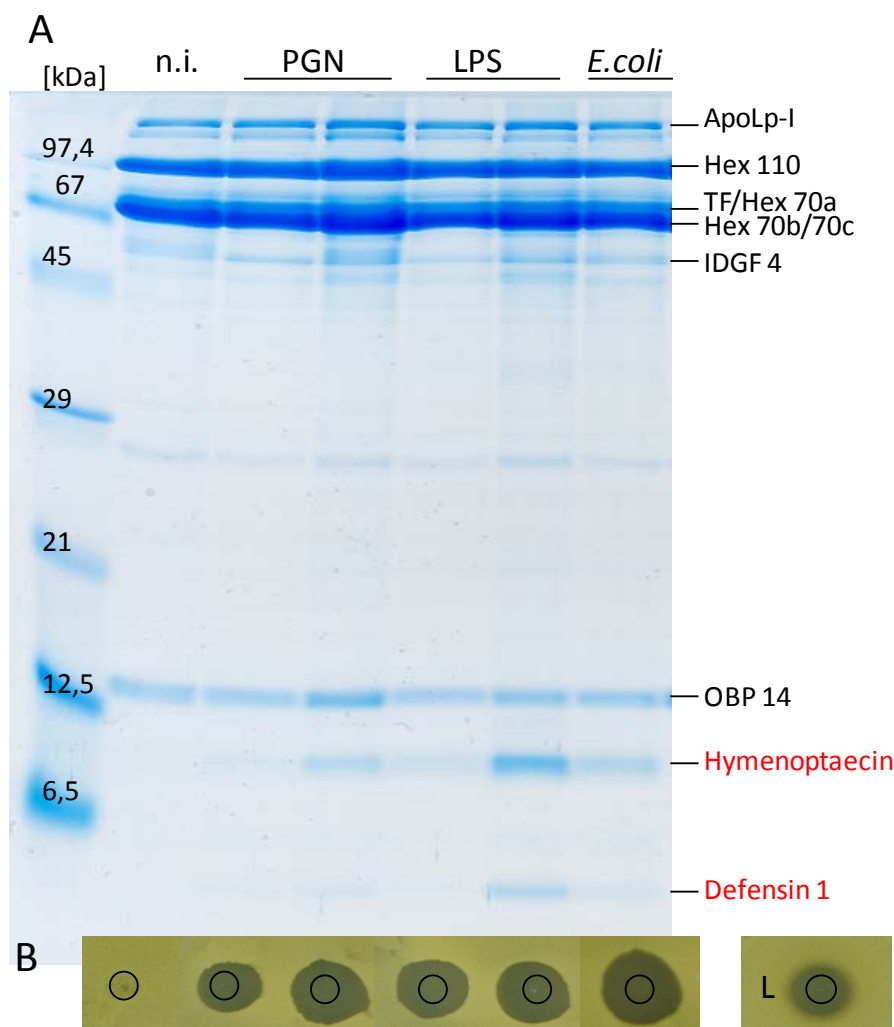


Abb. 29: Analyse der Haemolympheproteine von 6 d alten Drohnenlarven nach Injektion von PGN (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), LPS (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ),  $10^5$  *E.coli* Zellen 24h p.i. A) Proteinmuster der Haemolymphe. 15 % PAA/0,1 % SDS Gel Laemmli, Coomassie Blau G250, 8,5cm. B) Nachweis antibakterieller Aktivität in der Haemolymphe. Als Indikatorbakterium wurde das Gram<sup>+</sup> Bakterium *Micrococcus flavus* verwendet und als Positivkontrolle diente Lysozym = L. TF = Transferrin; Hex = Hexamerin; ApoLp = Apolipoprotein; IDGF = imaginal disc growth factor; OBP = odorant binding protein.

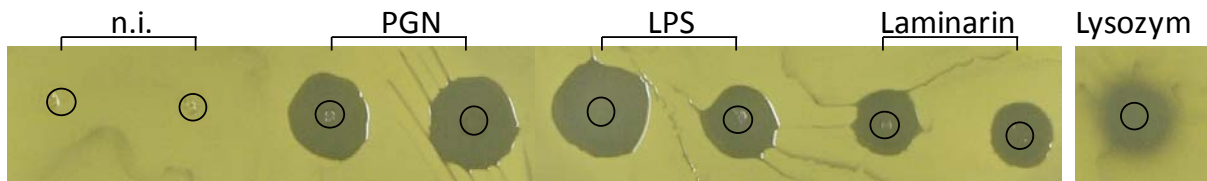


Abb. 30: Nachweis antibakterieller Aktivität in der Haemolymphe von 6 Tage alten Drohnenlarven 24 h p.i. PGN (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), LPS (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und Laminarin (30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) im Vergleich zu naiven Larven (n.i.). Als Indikatorbakterium wurde *M. flavus* verwendet und als Positivkontrolle diente Lysozym 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Im Vergleich zur antibakteriellen Aktivität der Haemolymphe nach Injektion von PGN und LPS (Bestandteile von Bakterienzellwänden), fällt die Reaktion auf Laminarin (Bestandteil von Pilzzellwänden) schwächer aus (Abb. 30).

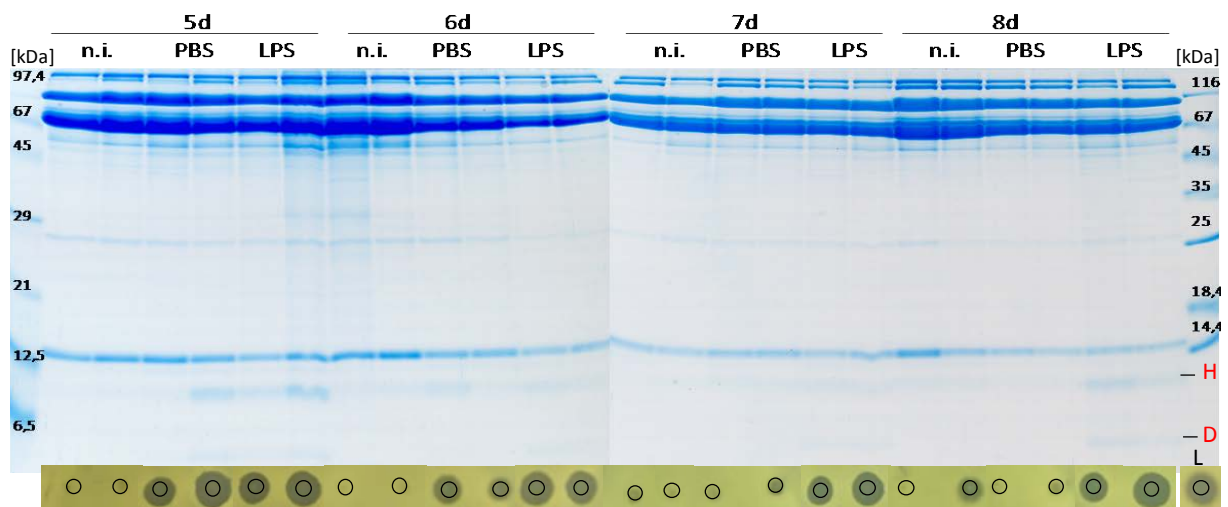


Abb. 31: Nachweis der antibakteriellen Aktivität in der Haemolymphe von 5-8d alten Drohnenlarven 24h p.i. nach Verletzung (PBS) und Injektion von LPS. Aliquote (1 $\mu\text{l}$ ) wurden auf ein 15 % PAA/0,1 % SDS Gel aufgetragen und mit Coomassie Blau G250 gefärbt. Dieselben Proben wurden für einen Hemmhoftest verwendet. Es wurden Aliquote (1,5  $\mu\text{l}$ ) der Haemolymphe aufgetropft. Als Indikatorbakterium wurde *Micrococcus flavus* (Gram<sup>+</sup>) verwendet. H = Hymenoptaecin; D = Defensin 1; L = Lysozymkontrolle.

Drohnenlarven reagieren während ihrer Larvalentwicklung nicht immer gleich auf eine Infektion. So ist bei 5 und 6 Tage alten Drohnenlarven nach einer Verletzung (PBS) eine antibakterielle Aktivität in der Haemolymphe zu beobachten. Dahingegen ist dies bei höherem Alter der Drohnenlarven nicht mehr der Fall. Auch ist bei 7 und 8 Tage alten Drohnenlarven 24 h nach PBS Injektion keine Hochregulation der AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 zu sehen, wie dies noch bei den 5 und 6 Tage alten Drohnenlarven der Fall war (Abb. 31).

### 4.2.3 Abnahme Koloniebildender Einheiten nach bakterieller Infektion in der Haemolymph von Drohnenlarven

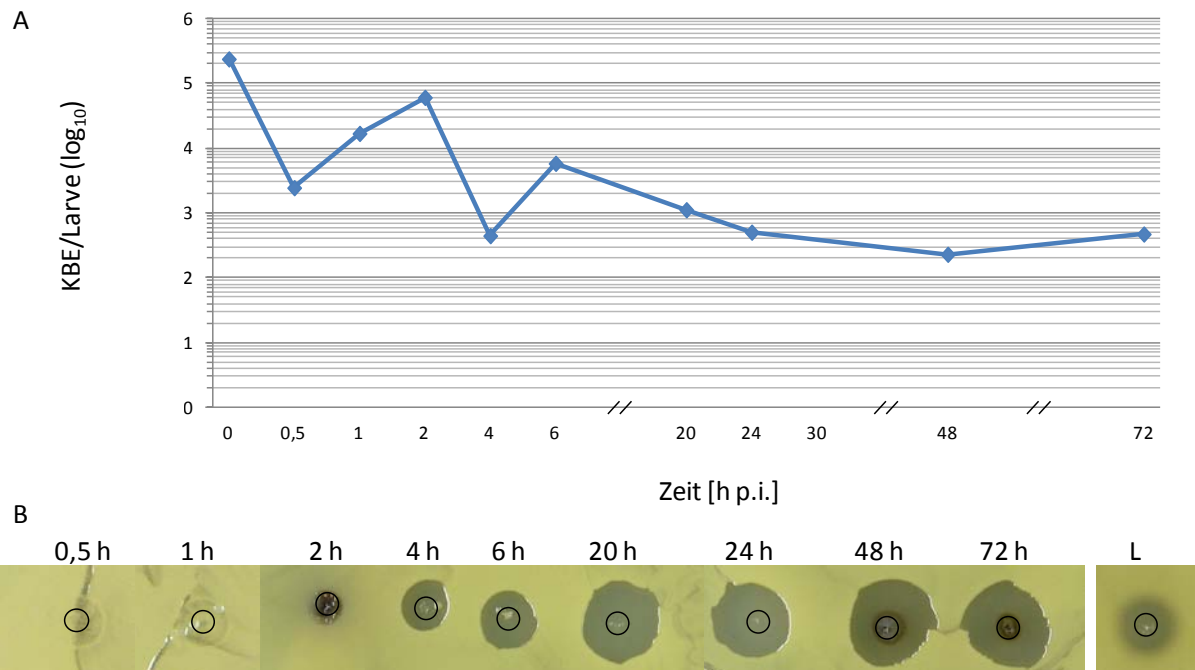


Abb. 32: Vergleich von zellulärer und humoraler Immunantwort von Drohnenlarven (6 d) nach einer Infektion mit *E.coli*. A) Abnahme Koloniebildender Einheiten (KBE) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Infektion mit *E.coli*. B) Antibakterielle Aktivität der Haemolymph von denselben Drohnenlarven. Es wurden jeweils Aliquote (1,5 $\mu$ l) der Haemolymph aufgetropft. Als Indikatorbakterium diente *Micrococcus flavus* (Gram<sup>+</sup>) und als Positivkontrolle diente Lysozym (L) 5 mg/ml.

Die Anzahl an Koloniebildenden Einheiten, die nach einer Infektion von Drohnenlarven mit *E.coli* ( $10^5$ Z) nach verschiedenen Zeitpunkten in der Haemolymph vorhanden sind wurde untersucht (Abb. 32A). Hierbei ist zu beobachten, dass innerhalb der ersten 0,5 h nach einer Infektion die Koloniebildenden Einheiten (die Anzahl der lebensfähigen Bakterien, die sich in der Haemolymph befinden) um den Faktor 50 abnehmen. Danach steigt die Anzahl an koloniebildenden Einheiten (KBE) zunächst noch einmal an, um dann mit Schwankungen nach oben und unten langsam abzunehmen. Ab 24 h p.i. bleibt die Anzahl an KBE/Larve bei ca.  $5 \times 10^2$  KBE/Larve konstant.

Im Hemmhof ist in den ersten 24 h p.i. eine stetige Zunahme an antibakterieller Aktivität zu beobachten (Abb. 32B). Zwei Stunden nach einer Infektion mit *E.coli* ist bei Larven schon ein kleiner Hemmhof zu sehen. Nach vier und sechs Stunden p.i. nimmt die antibakterielle Aktivität der Haemolymph weiter zu und erreicht nach 20 h p.i. die maximale Wirkung. Die antibakterielle Wirkung der Haemolymph ist 24, 48 und 72 h p.i. dann gleichbleibend stark.

## 4.3 Drohnenpuppen: Übergang zwischen Larven und adulten Drohnen

### 4.3.1 Proteinanalyse der Haemolymphe von Drohnenpuppen

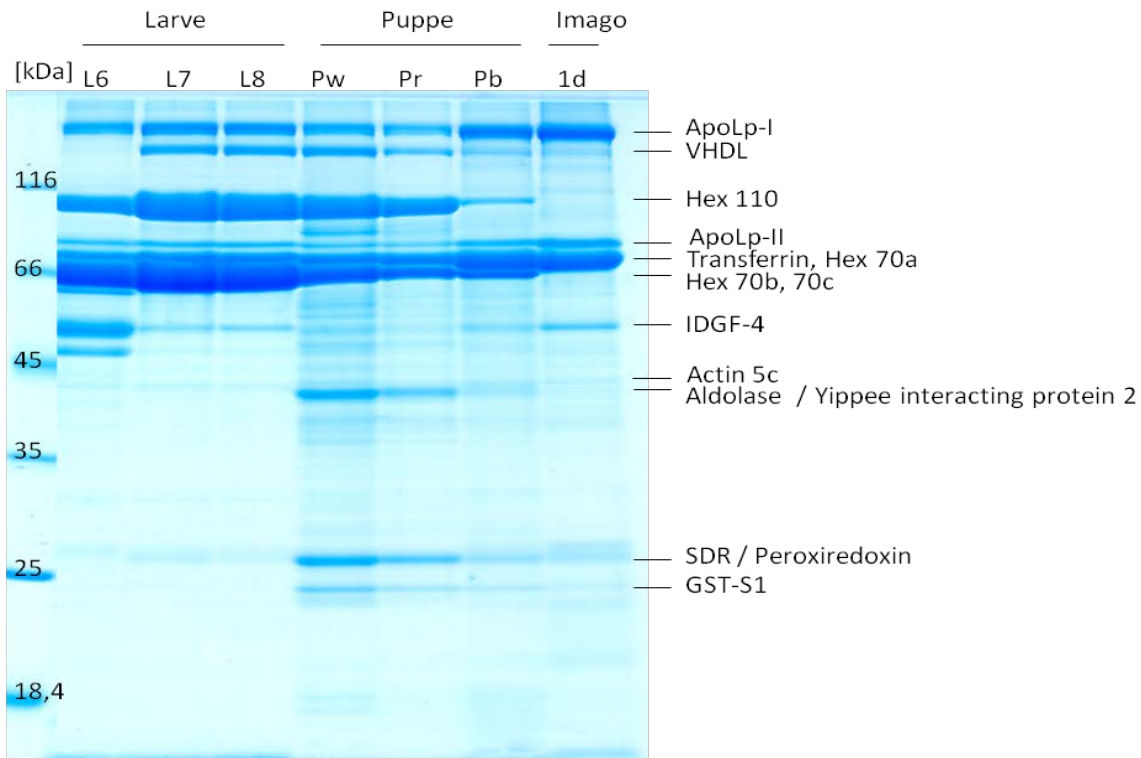


Abb. 33: Vergleich der Haemolympheproteine von Larven, Puppen und adulten Drohnen. Es wurde die Haemolymphe von 6-8 Tage alten Larven (L6-L8), von weißäugigen (Pw), rotäugigen (Pr), braunäugigen Puppen (Pb) und von einer frisch geschlüpften Drohne auf einem 12,5% PAA/0,1% SDS Gel (Laemmli, 8,5 cm, Coomassie Blue G250) aufgetrennt. Ausgewählte Banden wurden mittels nano HPLC/MS analysiert. ApoLp-I, ApoLp-II = Apolipoprotein I bzw. II; VHDL = very high density lipoprotein; Hex = Hexamerin; IDGF = imaginal disc growth factor; SDR = short chain dehydrogenase; GST-S1 = glutathione S transferase 1

Der Vergleich zwischen der Haemolymphe von Larven, Puppen und adulten Drohnen zeigt die starke Abnahme der Speicherproteine, die in den Larven noch die Hauptbestandteile der Haemolymphe bilden (Abb. 33). Besonders gut ist dies am VHDL (very high density lipoprotein) zu sehen. VHDL taucht ab Tag 7 der Larvalphase auf, nimmt dann wieder während der Puppenphase ab und ist in der Haemolymphe von adulten Drohnen nicht mehr vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass das Lipoprotein eine Rolle im Lipidtransport, sowie im Speichermetabolismus während der Metamorphose spielt. IDGF-4 ist in der Haemolymphe von der Bienenlarve bis zur Imago vorhanden, wie auch Transferrin und die Apolipoproteine I und II. Hexamerin 110 ist in Larven und Puppen, aber nicht mehr in frischgeschlüpften Drohnen vorhanden, ebenso die Hexamerine 70a, 70b und 70c. In weißäugigen Drohnenpuppen werden einige spezifische Proteine wie z.B. Aldolase, Yippee-interacting protein 2, short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) und glutathione S transferase S1 (GST) hochreguliert, deren Synthese im weiteren Verlauf des Puppenstadiums wieder abnimmt.

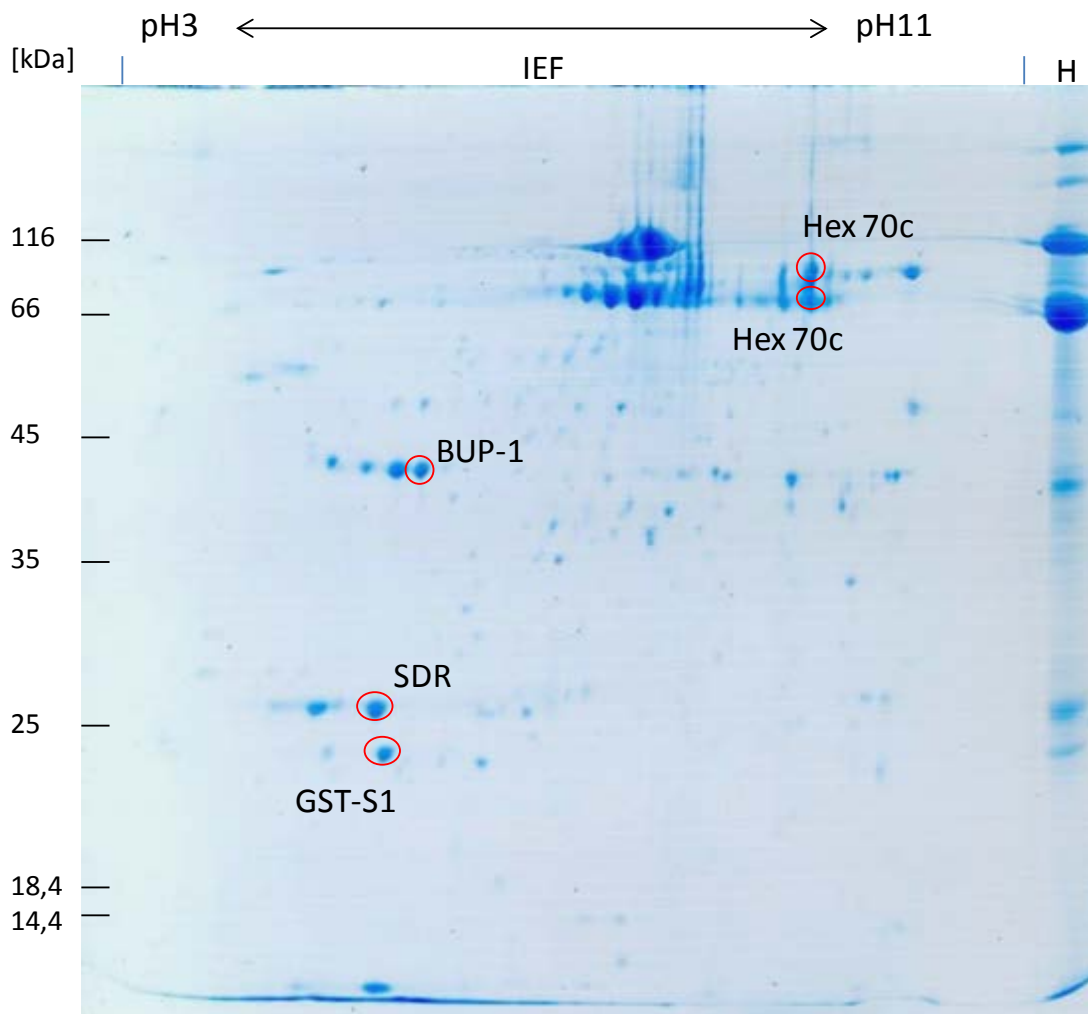


Abb. 34: Zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung der Haemolymphproteine einer rotägigen Drohnenpuppe (n.i.). Die 2. Dimension wurde im 12,5% PAA/0,1% SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie Blau G250 angefärbt. Hex = Hexamerin; BUP-1 = beta-ureidopropionase 1; SDR = short chain dehydrogenasen/reductasen; GST-S1 = Glutathion S Transferase-S1.

Im Bereich zwischen 25 und 45 kDa ist eine deutliche Zunahme an Proteinspots bei Drohnenpuppen zu sehen, die in Drohnenlarven (Abb. 26, Abb. 28) oder adulten Drohnen (Abb. 45) nicht auftreten. Am auffälligsten ist hier BUP-1 (beta-ureidopropionase 1). BUP-1 wurde bisher nur bei Drohnenpuppen gefunden.

Short chain dehydrogenasen/reductasen (SDR) sind NAD(P)(H) abhängige Enzyme, die typischerweise aus circa 250 Aminosäuren bestehen. Sie sind am Metabolismus von Steroiden, Prostaglandinen, Retinoiden, Lipiden, Alkoholen, Zucker bis hin zu Xenobiotika beteiligt (Kallberg et al., 2002; Persson et al., 2009).

Glutathion S Transferasen (GSTs) sind Enzyme, die an der Detoxifizierung von Molekülen beteiligt sind und vermutlich auch am Transport von physiologisch wichtigen lipophilen Stoffen (Fournier et al., 1992). Die GST Multigenfamilie wird zudem mit der Resistenz gegen Insektizide in Verbindung gebracht. Durch eine verstärkte Expression oder Aktivität von GSTs werden Toxine eliminiert oder unschädlich gemacht, indem sie diese binden oder transformieren (Low et al., 2007).

### 4.3.2 Die Auswirkung einer *E. coli* Infektion auf Drohnenpuppen

Die Puppen der Honigbiene durchlaufen nach dem Streckmadenstadium eine Phase als weißäugige Puppe, danach färben sich die Augen rosa, anschließend rot und dann braun. In diesem Stadium fängt die Puppe an, sich auch am restlichen Körper zu färben und die abschließende Umwandlung zur Imago beginnt. Diese metamorphosen Prozesse laufen im geschützten Raum einer verdeckelten Zelle ab.

Dadurch, dass die Varroamilbe sich aufgrund der längeren Entwicklungszeit und des größeren Zelldurchmessers bevorzugt Drohnenzellen als Kinderstube aussucht, sind Drohnenpuppen besonders durch Infektionen gefährdet. Gleichzeitig ist die Varroamilbe eine relativ neue Gefährdungsquelle, da sie erst 1977 über befallene asiatische Honigbienen nach Europa eingeschleppt wurde. Eine der Bekämpfungsmethoden gegen die Varroamilbe ist in der Drohnenzeit das Ausbrechen von Drohnenbrut. Die ausgebrochenen Waben werden anschließend eingeschmolzen, um die Milben, die sich in den Zellen befinden, abzutöten.

Daher wurde auch bei Drohnenpuppen untersucht, wie sie auf eine Infektion reagieren und ob zwischen den Entwicklungsstadien wiederum Unterschiede zu beobachten sind.

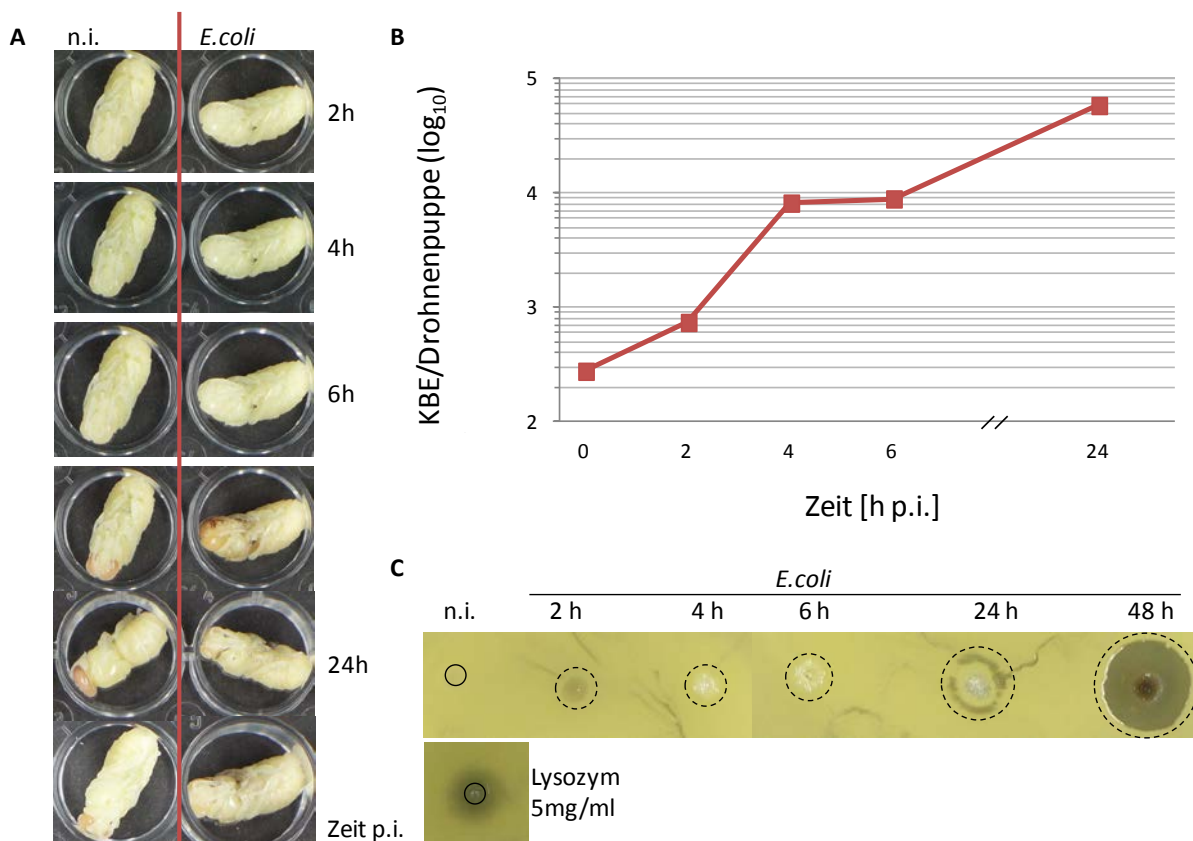


Abb. 35: Reaktion von weißäugigen Drohnenpuppen nach einer Infektion mit  $10^2$  *E. coli* Zellen. A) Äußeres Erscheinungsbild der Drohnenpuppen, B) Zunahme der Kolonienbildenden Einheiten pro Drohnenpuppe mit der Zeit p.i. und C) antibakterielle Aktivität der Haemolymphe im Hemmhofstest gegen *M. flavus*. Es wurden Aliquote von  $1,5\mu\text{l}$  aufgetropft und als Positivkontrolle wurde Lysozym 5mg/ml verwendet.

Nach einer Infektion mit  $10^2$  *E. coli* Zellen pro weißäugige Drohnenpuppe kam es zu einem Anstieg der Bakterienanzahl in der Haemolymphe der Drohnenpuppen um das

Zweihundertfache der Ausgangskonzentration (Abb. 35B). Bei der Infektion mit  $10^5$  *E.coli* Zellen kommt es hingegen nur zu einem Anstieg um das dreizehnfache innerhalb von 24 h p.i. (Abb. 36B).

Antibakterielle Aktivität in der Haemolymph ist in den ersten Stunden nach einer *E.coli* Infektion im Hemmhofstest nicht nachzuweisen. Auch sieht es so aus, dass die *E.coli* Bakterien, die in der Haemolymph vorhanden sind, an der Auftropfstelle wachsen. Nach 24 h p.i. ist ein Ring um die Auftropfstelle zu beobachten und die *E.coli* Bakterien, die an dieser Stelle wachsen, sind gut zu sehen. Erst 48 h nach *E.coli* Infektion ist ein eindeutiger Hemmhof zu erkennen (Abb. 35C). Wobei auch hier an der Auftropfstelle Bakterienwachstum zu erkennen ist, das aber durch die Melanisierung an dieser Stelle verdeckt wird.

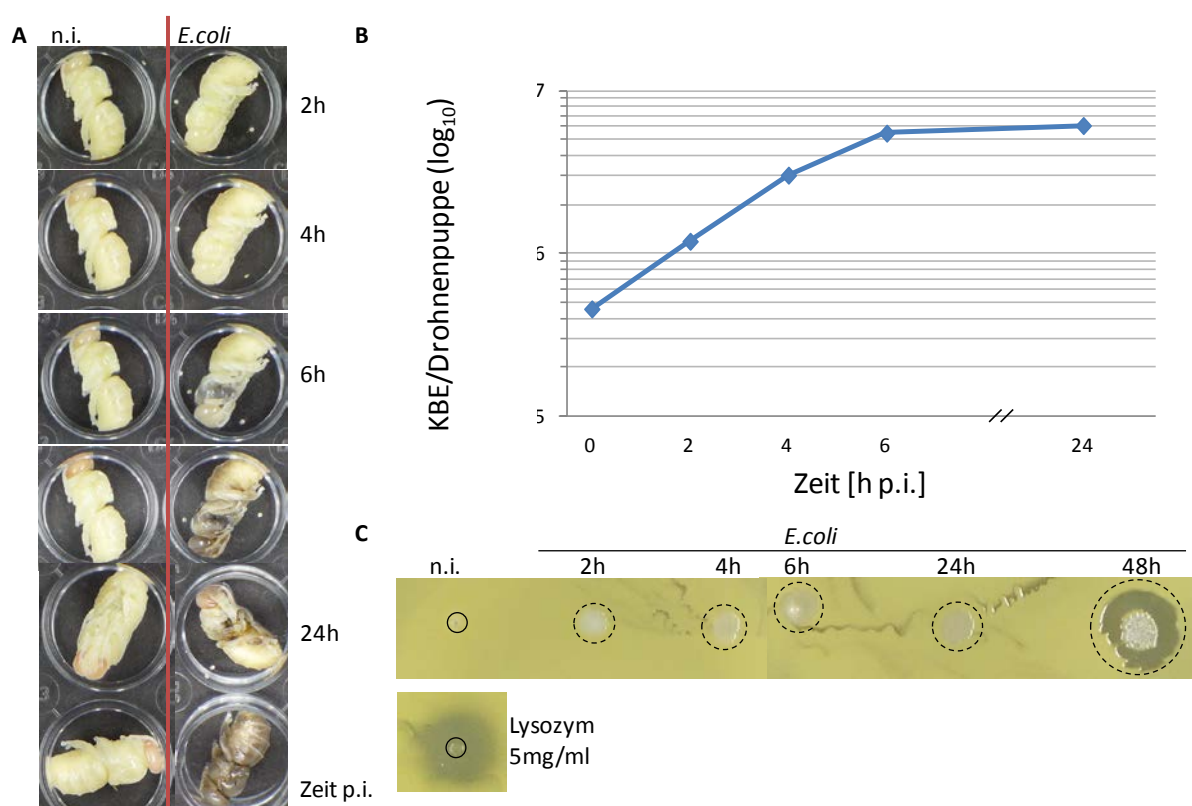


Abb. 36: Reaktion von weißäugige Drohnenpuppen nach einer Infektion mit  $10^5$  *E.coli* Zellen. A) Äußeres Erscheinungsbild der Drohnenpuppen, B) Zunahme der kolonienbildenden Einheiten pro Drohnenpuppe mit der Zeit p.i. und C) antibakterielle Aktivität der Haemolymph im Hemmhofstest gegen *M.flavus*. Lysozym diente als Positivkontrolle.

Im äußeren Erscheinungsbild der Puppen ist erst 24 h p.i. bei der niedrigen *E.coli* Konzentration eine starke Graufärbung am Thorax zu beobachten (Abb. 35A). Bei der Ausgangskonzentration von  $10^5$  *E.coli* Zellen ist schon 6 h p.i. eine starke Graufärbung des Thorax zu beobachten und 24 h p.i. sind die Puppen fast vollständig grünlich gefärbt (Abb. 36A, Abb. 66B). Nach 48 h p.i. ist bei beiden Konzentrationen eine vollständig starke grauschwarze Färbung der Puppen zu beobachten (nicht gezeigt).

Bei der antibakteriellen Aktivität nach einer *E. coli* Infektion mit  $10^5$  Zellen ist erst 48 h p.i. ein Hemmhof zu beobachten, in dessen Mitte allerdings, wie auch schon bei der Infektion mit der niedrigeren Konzentration *E.coli* Kolonien wachsen (Abb. 36C).



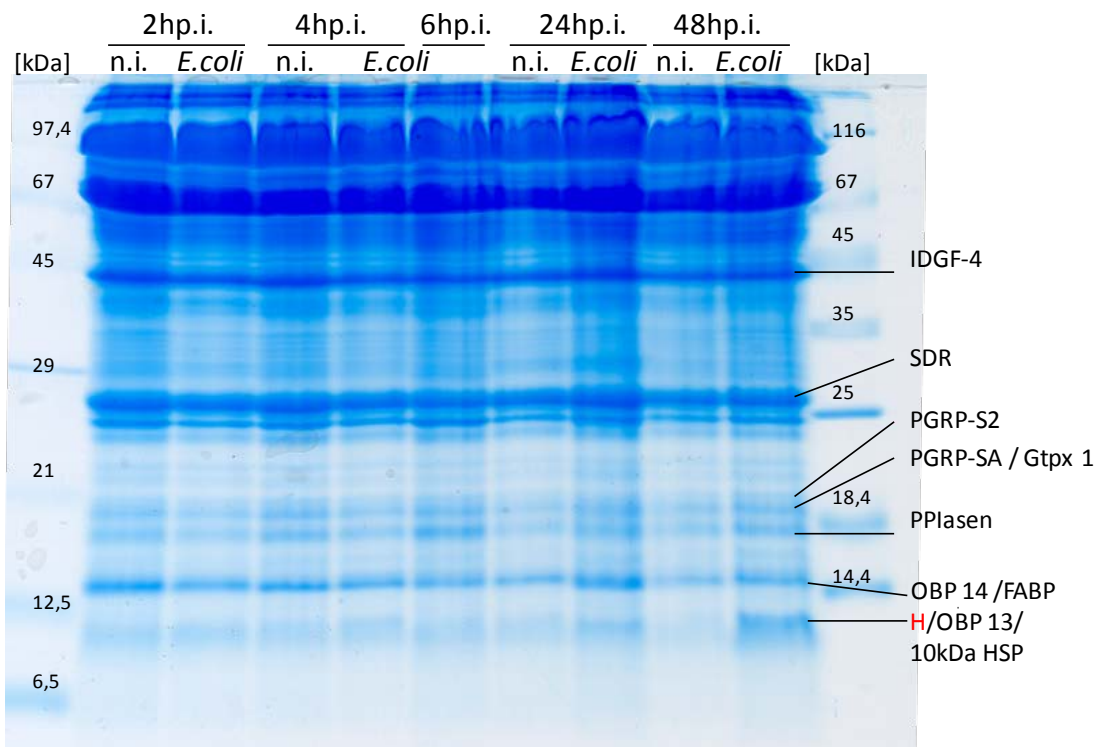


Abb. 37: Proteinmuster der Lymphe von weißäugigen Puppen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Infektion mit  $10^5$  *E.coli* Zellen. Aliquote (1  $\mu$ l) wurden auf ein 15 % PAA/0,1 % SDS Gel aufgetragen und mit Coomassie Blau G250 angefärbt. Einzelne Banden wurden mittels nano HPLC/MS analysiert. SDR = Short chain dehydrogenase/reductase; PGRP-S2 = Peptidoglycan recognition Protein-S2; PGRP-SA = Peptidoglycan recognition Protein-SA; Gtpx 1 = Glutathion peroxidase-like 1; PPlasen = Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like; 10kDa HSP = 10kDa Heat shock Protein.

Erst 48 h nach einer Infektion mit  $10^5$  *E.coli* Zellen ist bei weißäugigen Drohnenpuppen eine leichte Hochregulation von Hymenoptaecin im SDS-Gel zu beobachten (Abb. 37). Dennoch sind weder Immunfaktoren, wie die Carboxylesterase oder IRp30 noch andere AMPs, wie das Defensin 1 zu diesem Zeitpunkt im Gel zu sehen. Aber PGRP-S2, ein Immunfaktor, der bei adulten Drohnen erst nach einer Infektion auftaucht, ist in nicht infizierten und infizierten Drohnenpuppen vorhanden. Auch ein weiteres „peptidoglycan recognition protein“, das PGRP-SA, ist konstitutiv in Drohnenpuppen vorhanden. Peptidoglycan interagierende Proteine spielen in vielfältigen Immunreaktionen eine Rolle, wie die Aktivierung der Prophenoloxidase, die Produktion von AMPs durch die Aktivierung des Toll und IMD Signalweges, die intrazelluläre Bakterienerkennung und die Phagozytose (Goto und Kurata, 2006).

Zwischen 30 min und 24 h nach der Infektion mit  $10^5$  *E.coli* Zellen kommt es bei rotäugigen Puppen zu einem Anstieg der Bakterienanzahl um das achthundertfache (Abb. 38 B). Vier Stunden nach Infektion ist schon eine leichte gräuliche Verfärbung am Thorax zu erkennen. Nach sechs Stunden hat sich eine starke Graufärbung des Thorax herausgebildet und 24 Stunden nach der *E.coli* Infektion ist die komplette Puppe grauschwarz gefärbt (Abb. 38 A). Es ist nach einer *E.coli* Infektion keine antibakterielle Aktivität in der Haemolymphe nachzuweisen und um die Auftropfstelle sind auch hier, wie schon bei den weißäugigen Puppen, *E.coli* Bakterien gewachsen (Abb. 38 C). Allerdings ist zu beachten, dass bei rotäugigen Puppen kein 48 Stundenwert analysiert wurde.

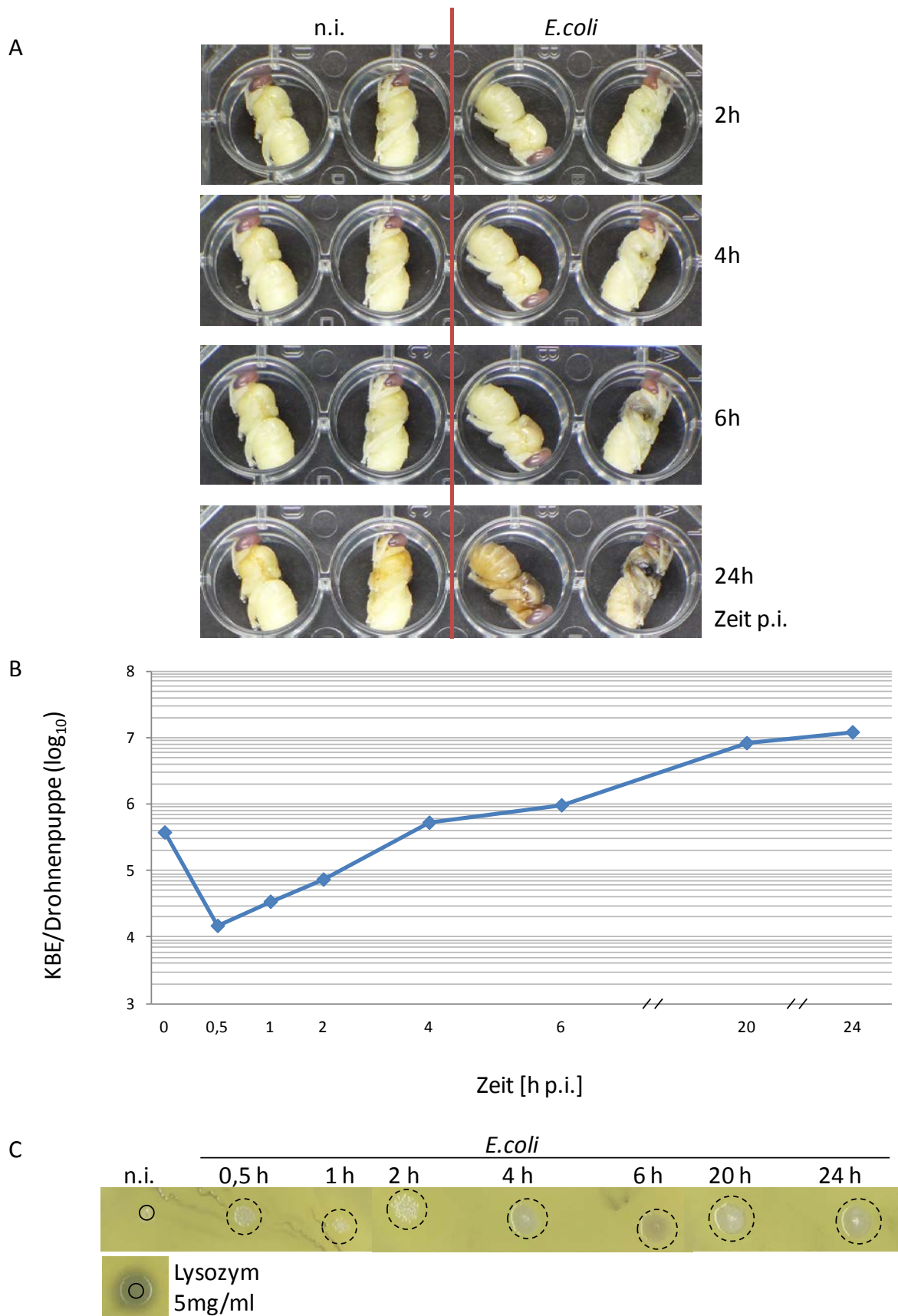


Abb. 38: Reaktion von rotägigen Drohnenpuppen nach einer Infektion mit *E.coli*  $10^5$  Z. A) Das äußere Erscheinungsbild der Drohnenpuppen, B) die Zunahme der Kolonienbildenden Einheiten pro Drohnenpuppe mit der Zeit p.i. und C) die antibakterielle Aktivität der Haemolymphe (Aliquote von 1,5  $\mu$ l) im Hemmhofstest gegen *M.flavus*. Als Positivkontrolle diente Lysozym.

## 4.4 Infektionsversuche mit adulten Drohnen

### 4.4.1 Proteinanalyse der Haemolymphe adulter nicht infizierter Drohnen

Die Haemolymphe von Drohnenlarven und Puppen unterscheidet sich abhängig von deren Alter in der Zusammensetzung erheblich. Daher wurden auch bei den adulten Drohnen Altersreihen durchgeführt. Drohnen führen im Alter von 6 Tagen die ersten Orientierungsflüge zwischen 14 und 16 Uhr durch und werden etwa mit 12 Tagen geschlechtsreif (Taber, 1964). Da im Leben der Drohnen in den ersten 12 Tagen viele Veränderungen stattfinden, wurde dieser Zeitraum eingehender untersucht.

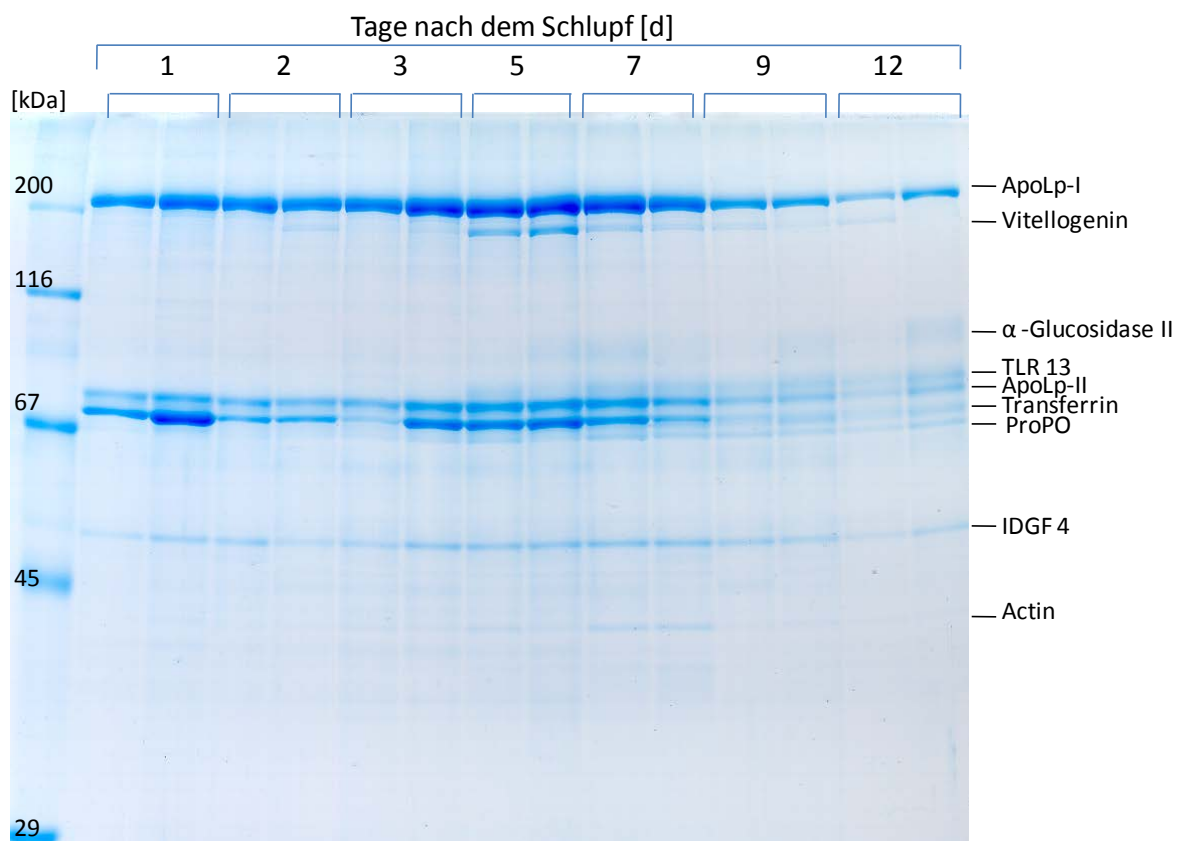


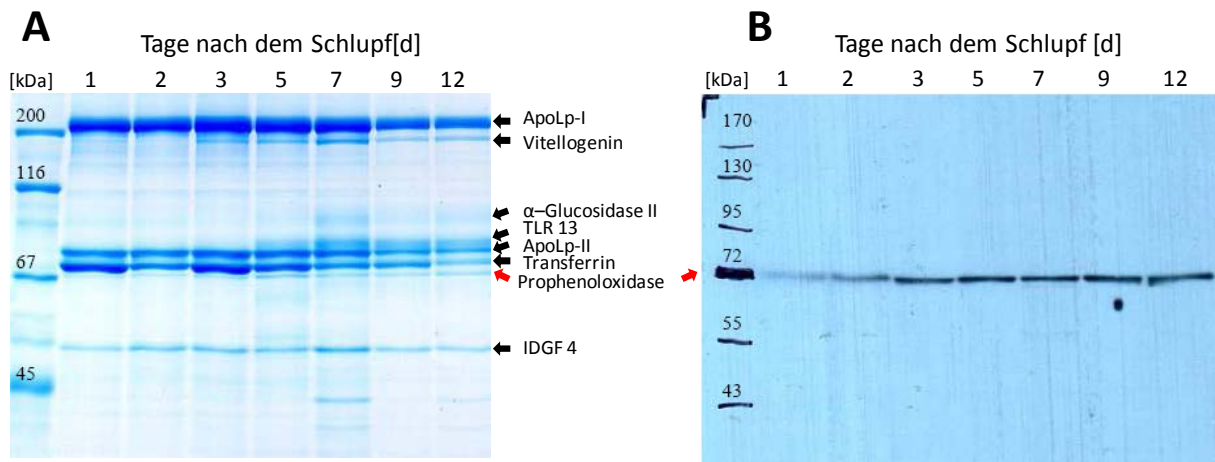
Abb. 39: Proteinmuster adulter nicht infizierter Drohnen verschiedenen Alters bis zu 12 Tage nach dem Schlupf. Es wurde die Haemolymphe von zwei Individuen pro Zeitwert auf ein 10 % PAA/0,1 %SDS Laemmli, Coomassie Blau G250, 8,5 cm aufgetragen. ProPO = Prophenoxidase; TLR = Toll-like Receptor.

In den Abb. 39 und Abb. 40 wurden drei von fünf Haemolympfproben analysiert, die pro Zeitwert von einzelnen Drohnen entnommen worden sind.

Die Hauptproteine in der Haemolymphe von adulten Drohnen sind das Transferrin und die Apolipoporphine I und II. Im Gegensatz zu Arbeiterinnen wird Vitellogenin in Drohnen nur in geringen Mengen exprimiert. Besonders auffällig ist hier aber, dass um Tag 5 und 7 die Menge stark ansteigt und dann wieder abnimmt. Zu diesem Zeitpunkt finden bei den Drohnen die ersten Erkundungsflüge statt.

Ab Tag 5 taucht Toll-like Receptor 13 (TLR 13), ein Protein unbekannter Funktion mit einem Molekulargewicht von 75 kDa, in der Haemolymphe auf.  $\alpha$ -Glucosidase II erscheint in etwa

zwischen dem 5. und 7. Tag (Abb. 39, Abb. 40A). Die  $\alpha$ -Glucosidase I konnte im Ventriculus, die  $\alpha$ -Glucosidase II im Ventriculus und in der Haemolymph und die  $\alpha$ -Glucosidase III in der Hypopharynxdrüse und im Honig nachgewiesen werden (Kubota et al., 2004).



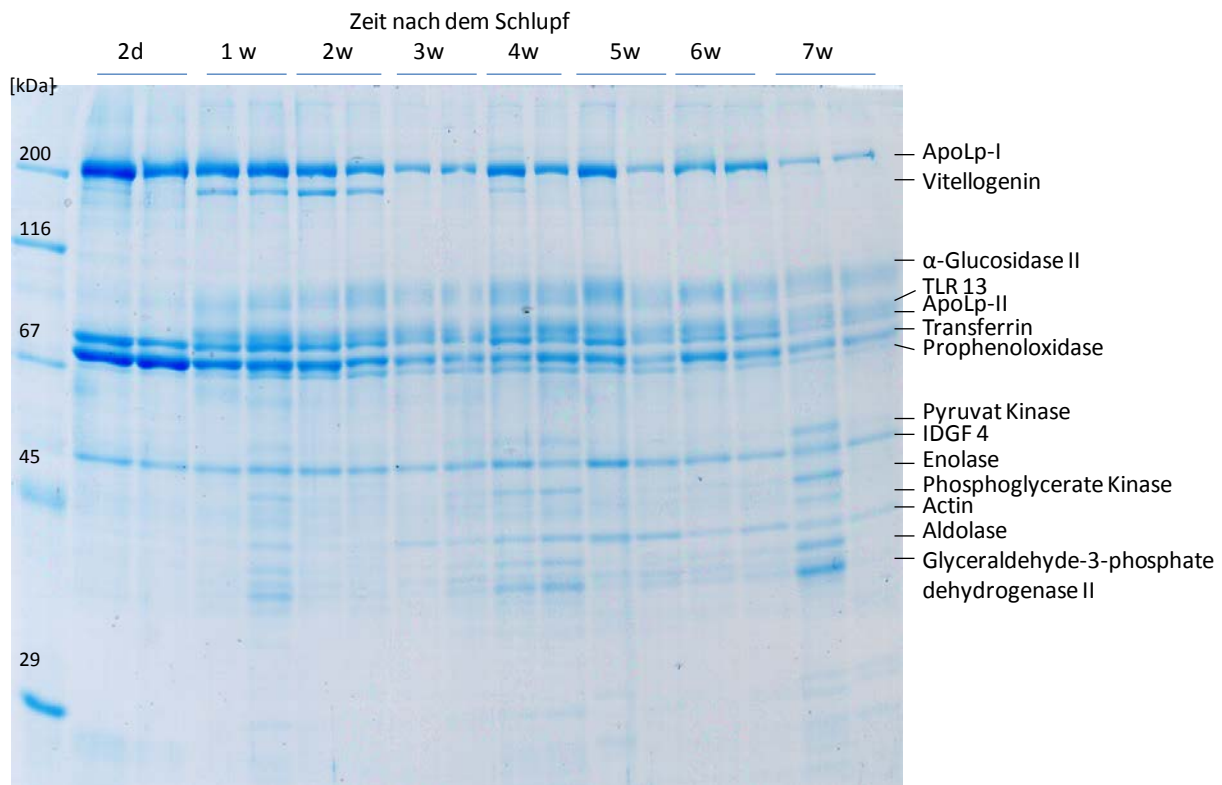
**Abb. 40: Proteinmuster der Haemolymph adulter nicht infizierter Drohnen in Abhängigkeit vom Alter.** Von 1-12 Tage alten Drohnen (Je 5 pro Zeitwert aus dem Bienenvolk) wurde Haemolymph entnommen. Aliquote von je einem Individuum pro Zeitwert ( $\neq$  denen in Abb. 39) wurden auf einem 10% PAA/SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie Blau G250 angefärbt (A). Für den immunologischen Nachweis der Phenoloxidase (ProPO) wurde das Proteingemisch auf eine Immobilon-P Membran übertragen. Der Nachweis von ProPO (B) erfolgte mit Anti-PO (1:1000) und Anti-rabbit IgG-Peroxidase (1:5000).

Im Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass während der gesamten Lebensspanne adulter Drohnen die Phenoloxidase vorhanden ist (Abb. 40B). Die Phenoloxidase ist eine wichtige Komponente des zellulären und humoralen Immunsystems.

Da Drohnen nicht sterben wenn sie geschlechtsreif sind, wurde an 3 Völkern (2 „Gotlandvölker“ und ein Kontrollvolk aus Würzburg; alle in etwa gleich stark und 3 zargig), die keine Schwesternköniginnen hatten, parallel ein Langzeitversuch durchgeführt. Hierzu wurden frisch geschlüpfte Drohnen aus dem jeweiligen Volk farblich markiert und wieder ins Volk eingesetzt. Die Untersuchung wurde solange fortgesetzt, wie genügend markierte Drohnen in den Versuchsvölkern zu finden waren. Hierbei wurde beobachtet, dass markierte Drohnen auch in den benachbarten Völkern am gesamten Bienenstand zu finden waren, sobald die Drohnen ausgeflogen sind. Am Anfang waren die Drohnen eher im Brutbereich zu finden. Später hielten sie sich dann auf den Randwaben, im Bereich der Honigwaben oder in der Nähe vom Flugloch auf.

Zur Haemolymphentnahme wurden zu den Testzeitpunkten jeweils 10-16 Drohnen aus den Versuchsvölkern entnommen, nicht infiziert oder infiziert mit *E.coli* und für 24 h mit Arbeiterinnen in kleinen Käfigen mit Zuckerlösung ad libitum gehalten bis zur Haemolymphentnahme.

Es wurden Haemolymphproben aller drei Völker mittels SDS – Gelelektrophorese analysiert. Zwischen den einzelnen Völkern war im Proteinmuster kein Unterschied zu beobachten. Daher werden hier exemplarisch die Ergebnisse eines Volkes vorgestellt (Abb. 41, Abb. 47 und Abb. 48).



**Abb. 41:** Langzeitstudie zur Proteinzusammensetzung der Haemolymphe von 2 Tage bis 7 Wochen alten nicht infizierten Drohnen. Aliqote wurden auf einem 10% PAA/0,1% SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie Blau G250 angefärbt. ApoLp = Apolipoprotein; TLR 13 = Toll-like receptor 13; IDGF = imaginal disc growth factor.

Bei einem Versuch über den Zeitraum von sieben Wochen wurde untersucht, welche Veränderungen im Proteinmuster der Haemolymphe adulter Drohnen während dieser Zeitspanne stattfinden. Im hochmolekularen Bereich fällt auf, dass einige Proteine über die gesamte Adoleszenzzeit vorhanden sind (Abb. 41). Diese Proteine sind Apolipoprotein I und II, das Transferrin, die Prophenoloxidase, Actin 5c und IDGF 4. Die  $\alpha$ -Glucosidase II und TLR 13 tauchen erst bei einer Woche alten Drohnen auf und sind dann die restlichen Wochen vorhanden. Im Bereich von etwa 30 bis 50 kDa sind die Kinasen Pyruvat Kinase, Phosphoglycerate Kinase und Glycerinaldehyde-3-phosphatdehydrogenase II, sowie eine Enolase und eine Aldolase mehr oder weniger stark vorhanden.

#### 4.4.2 Analyse des Proteinmusters der Haemolymphe adulter Drohnen nach Infektion

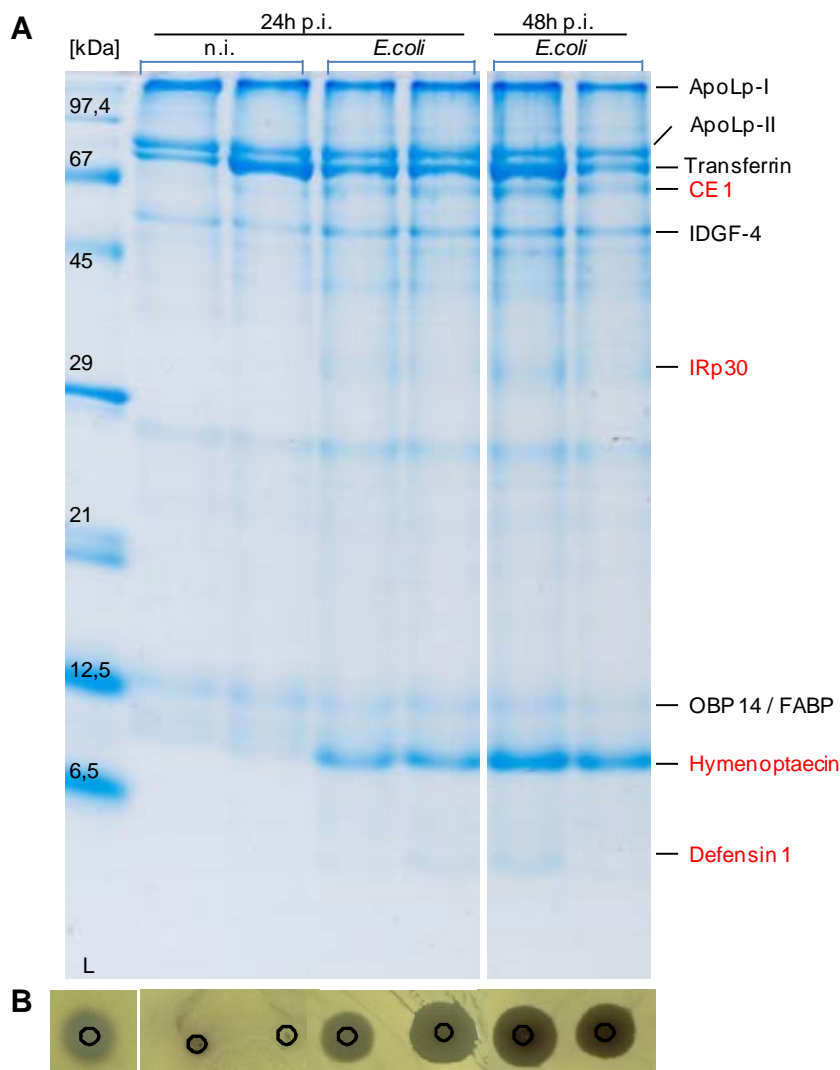


Abb. 42: Charakterisierung von transient exprimierten AMPs und hochmolekularen Immunfaktoren in der Haemolymphe von frisch geschlüpften nicht infizierten Drohnen und 24h und 48h nach künstlicher Infektion mit *E.coli* ( $10^5$  Z). A) Aliquote (1  $\mu$ l) wurden auf ein 15 % PAA / 0,1 % SDS Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie Blau G250 gefärbt. B) Parallel wurde gegen das gram<sup>+</sup>-Bakterium *Micrococcus flavus* ein Hemmhoftest durchgeführt.

Frisch geschlüpfte adulte Drohnen reagieren auf eine bakterielle Infektion, ebenso wie die Drohnenlarven mit der Synthese der bekannten AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1. Darüber hinaus bilden sie aber auch die hochmolekularen Immunfaktoren Carboxylesterase 1 und IRp30 (Abb. 42, Abb. 43). Die Menge der immunassoziierten Proteine nimmt zwischen 24 und 48 h p.i. noch einmal zu. Im Hemmhoftest ist zu sehen, dass es nach einer Infektion mit *E.coli* zu einer starken antibakteriellen Aktivität in der Haemolymphe kommt, die aber 24 und 48 Stunden nach der Infektion in etwa gleich ausgeprägt ist. Auch bei den Drohnenlarven konnte beobachtet werden, dass die antibakterielle Aktivität 24 und 48 Stunden nach Infektion gleichbleibend stark ist (Abb. 32).

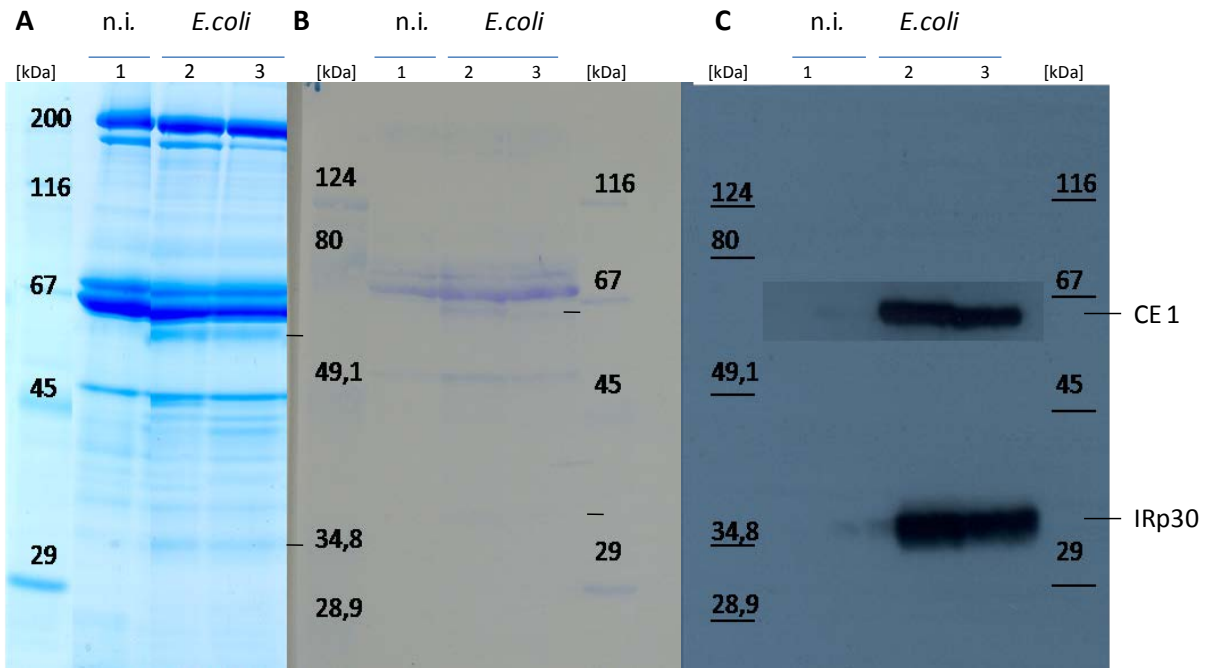


Abb. 43: Die Expression der hochmolekularen Immunfaktoren IRp30 und Carboxylesterase in adulten nicht infizierten (n.i.) Drohnen (1d) und 24 Stunden nach *E. coli* Infektion. (A) 10 % PAA/0,1 % SDS Gel, Laemmli-Puffersystem. Nach dem Blotting wurde eine Coomassie Blau G250 Färbung des SDS Gels gemacht. (B) Blotting Membran mit Coomassie Blau R250 Färbung und anschließende (C) Antikörperfärbung erfolgte mit Anti-IRp30 und Anti-Carboxylesterase. Die Antikörperfärbung wurde zuerst für IRp30 und nach dem Ablösen des Antikörpers für Carboxylesterase 1 durchgeführt. Die Exposition der Röntgenfilme betrug 60 Sekunden. Die Aufnahme der beiden Filme wurde für die Abbildung passend übereinandergelegt.

Mit der Antikörperfärbung im Western Blot wurden bei adulten Drohnen IRp30 und die Carboxylesterase 1 als Reaktion auf eine Infektion mit *E. coli* 682 Anti-IRp30 und Anti-Carboxylesterase nachgewiesen (Abb. 43C). Diese waren in naiven Drohnen ohne Infektion nicht vorhanden. Die Blotting Membran wurde vor der Antikörperfärbung mit Coomassie Blau R250 eingefärbt (Abb. 43B), woraufhin eine bessere Antikörperfärbung, als ohne vorherige Färbung (nicht gezeigt), erzielt werden konnte. Die Banden waren intensiver schwarz.

Es ist deutlich zu erkennen, dass keine unspezifischen Bindungen der Antikörper vorlagen, da außer den gezeigten Banden auf der Höhe von IRp30 und Carboxylesterase keine weiteren Banden auf den Röntgenfilmen sichtbar waren.

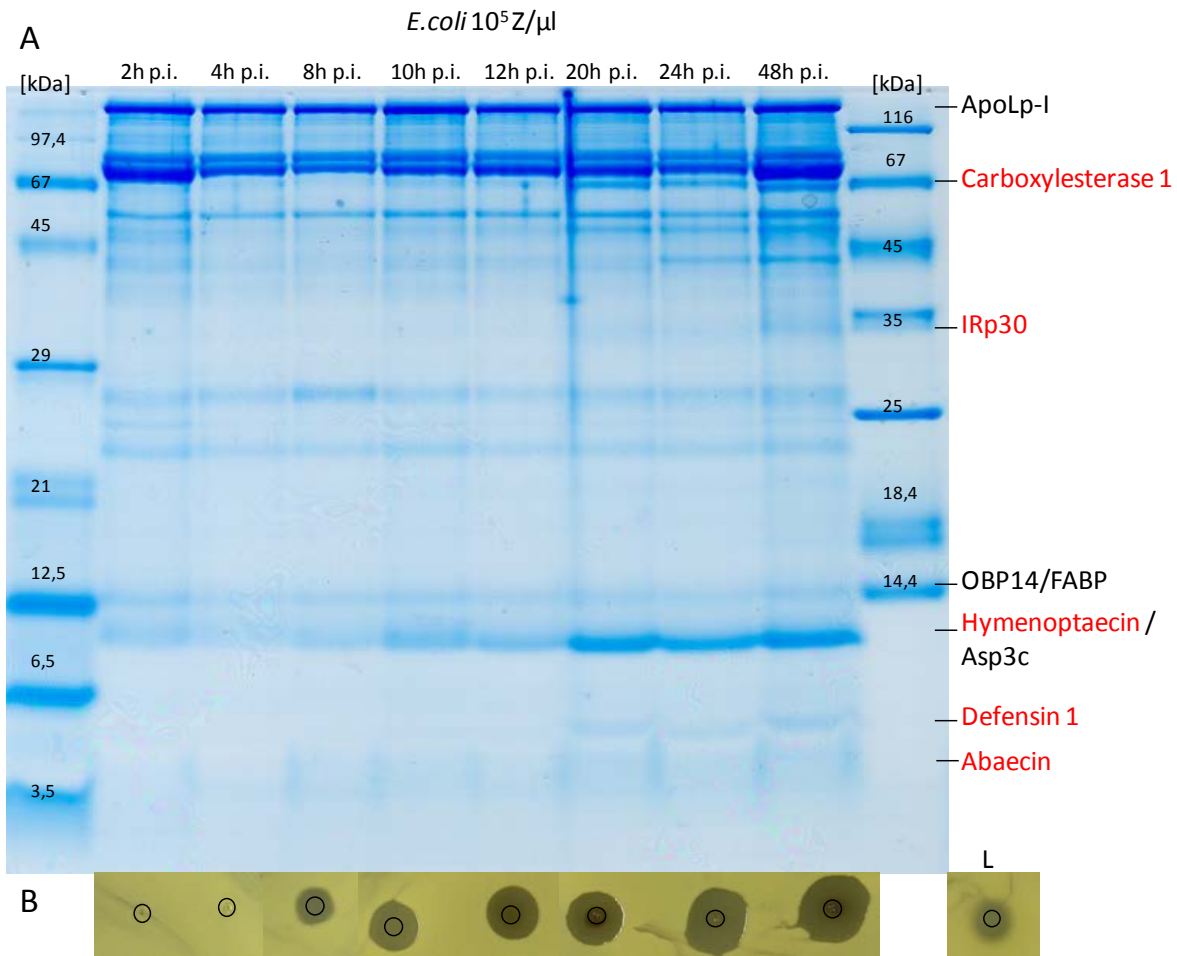


Abb. 44: Charakterisierung von transient exprimierten AMPs zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion mit *E. coli* bei frisch geschlüpften Drohnen. A) Aliquots (1μl) wurden auf einem 15 % PAA/0,1 % SDS Gel (Tricine-Puffersystem) aufgetrennt und mit Coomassie Blau G250 angefärbt. B) Zusätzlich wurde parallel dazu ein Hemmhoftest durchgeführt gegen das Gram-positive Bakterium *M. flavus* und mit Lysozym (L) als Positivkontrolle.

Es wurde nicht nur untersucht, wie sich eine Infektion in den verschiedenen Lebensphasen eines adulten Drohnes auswirkt, sondern auch wie sich diese in den Stunden unmittelbar danach manifestiert. Die Carboxylesterase und IRp30 sind in der gelelektrophoretischen Auftrennung erst nach zwanzig Stunden gut sichtbar, wie auch das Defensin 1. Bei Hymenoptaecin hingegen ist nach zehn Stunden p.i. schon eine leichte Hochregulation erkennbar, die aber danach weiter ansteigt. Abaecin ist nach acht bis zehn Stunden ganz schwach, aber wie das Defensin 1 erst nach 20 h p.i. deutlich erkennbar (Abb. 44A).

Beim Hemmhoftest war schon acht Stunden nach Infektion ein deutlicher Hemmhof erkennbar (Abb. 44B). Mit zunehmender Zeit nach der Infektion nehmen die Größe des Hemmhofes und damit die antibakterielle Aktivität in der Haemolymphe zu. Somit ist die antibakterielle Aktivität in der Haemolymphe circa zwei Stunden früher erkennbar als die AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 im SDS-Gel sichtbar sind.



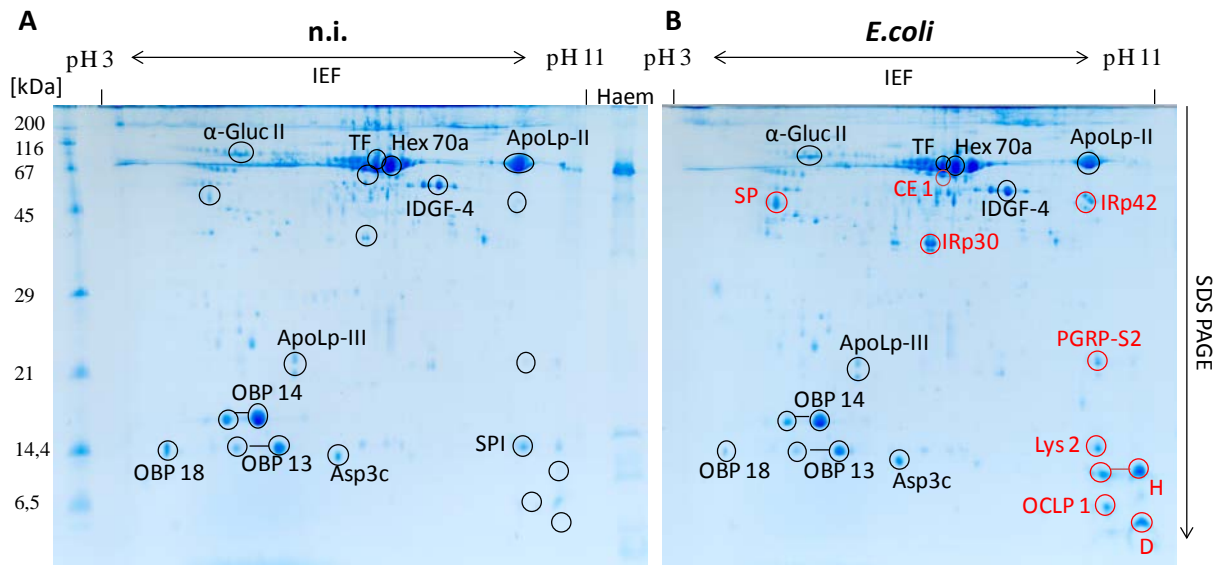


Abb. 45: Analyse von induzierten AMPs und hochmolekularen Immunfaktoren in 6d alten Drohnen mittels 2D Gelelektrophorese. Haemolympfproben von nicht behandelten und mit *E.coli* infizierten Drohnen wurden zweidimensional aufgetrennt. Ausgewählte Spots wurden ausgeschnitten und mittels nano HPLC/MS analysiert. A) Leere Kreise geben die Positionen an, an denen nach einer Infektion Proteine Hochreguliert werden. B) Hochregulierte Proteine sind rot gekennzeichnet. Haem = Haemolymphe; H = Hymenoptaecin; D = Defensin 1; SP = Serinprotease; TF = Transferrin; CE 1 = Carboxylesterase 1;  $\alpha$ -Gluc =  $\alpha$ -Glucosidase; Hex = Hexamerin; OBP = Odorant binding Proteine; Lys 2 = Lysozym 2; ApoLp = Apolipoprotein; PGRP = Peptidoglycan recognition Protein; OCLP 1 =  $\omega$ -conotoxin-like Protein 1; SPI = Serin Protease Inhibitor; IDGF 4 = Imaginal disc growth factor 4; IRp = Immune responsive Protein

Durch die zweidimensionale Auftrennung werden einige Proteine mit gleicher molekularer Masse besser aufgetrennt (Abb. 45), wie zum Beispiel das Hymenoptaecin, das ungefähr auf der gleichen Höhe läuft wie das ASP-3c. Nach einer Infektion werden bei adulten Drohnen Proteine hochreguliert, die mit der Immunabwehr assoziiert sind. Zu den hochmolekularen Immunfaktoren, die nach einer Infektion mit *E.coli* hochreguliert werden, zählen die Serinprotease, die Carboxylesterase, das IRp30, das IRp42 und PGRP-S2. Die Funktion von IRp30 ist bisher nicht bekannt. Es scheint aber ein bei den Hymenopteren hochkonserviertes Protein zu sein (Albert et al., 2011). Bei IRp42 handelt es sich um ein bisher unbekanntes Protein. Außer den hochmolekularen Immunfaktoren werden auch die AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 induziert. Lysozym 2 und OCLP 1 ( $\omega$ -conotoxin-like protein 1) werden zusätzlich zu den AMPs und den hochmolekularen Immunfaktoren nach einer Infektion mit *E.coli* exprimiert. Sie sind nur nach 2D-Gelelektrophorese so deutlich wie in Abb. 45 zu beobachten. Bei nicht infizierten Drohnen befindet sich auf der gleichen Höhe und mit einem ähnlichen pI Wert von Lysozym 2 ein Kazal type Serine Protease Inhibitor (SPI). Die Kazal type Serine Protease Inhibitoren inhibieren Serin Proteasen, Trypsin, Chymotrypsin und Elastasen (NCBI CDD cI00097). Lysozyme sind antibakterielle Peptide, die nahezu in allen Organismen bisher gefunden wurden, seien es nun Vertebraten (z.B. das Lysozym aus Hühnereiweiß, das hier als Kontrolle bei der Untersuchung auf antibakterielle Aktivität verwendet wurde) oder Invertebraten (z.B. Lepidoptera).

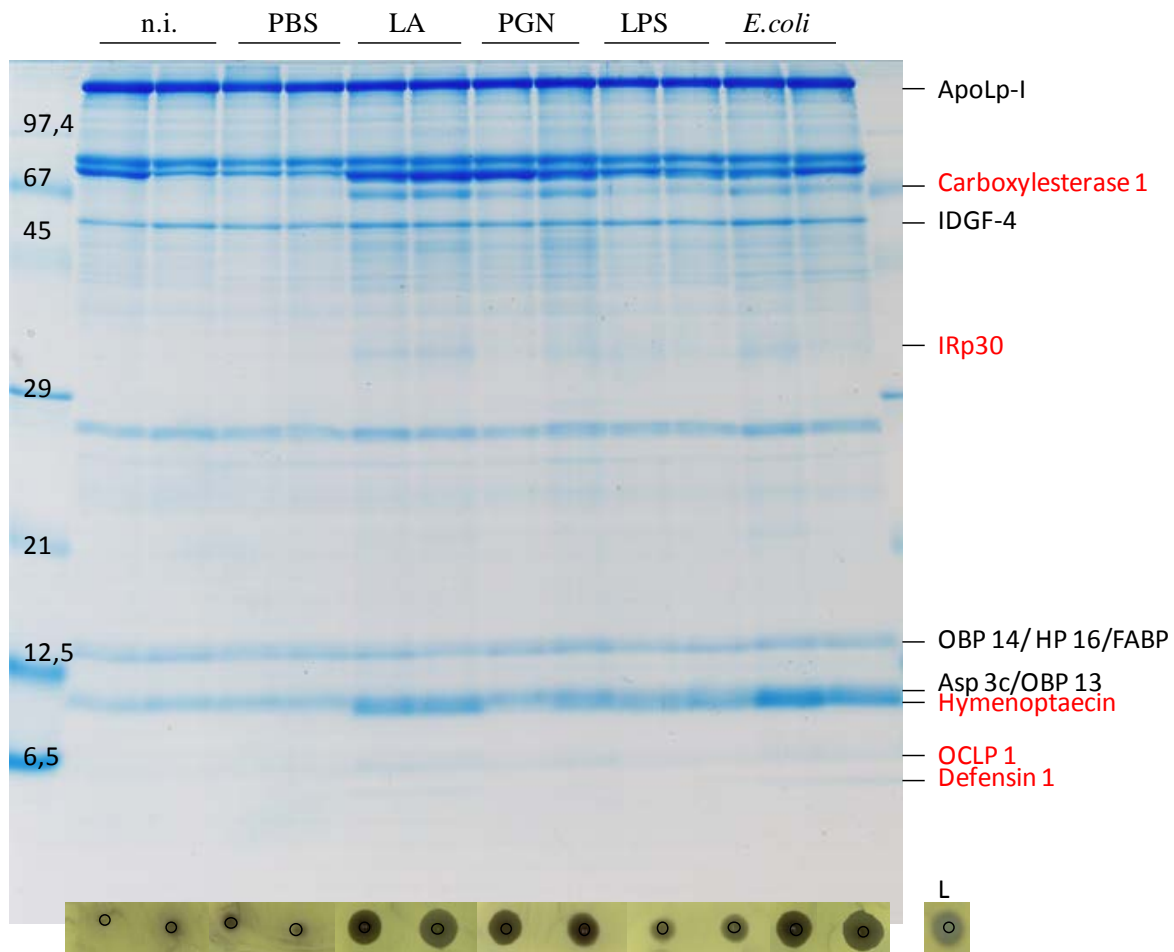


Abb. 46: Charakterisierung von transient exprimierten hochmolekularen Immunfaktoren und AMPs in der Haemolymphe von nicht infizierten (n.i.) adulten Drohnen, nach Verwundung (PBS), Applikation von Laminarin (LA) (30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), PGN (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), LPS (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und nach künstlicher Infektion mit  $10^5$  *E.coli* Zellen 24h p.i.. Aliquote der Haemolymphe wurden auf ein 15% PAA/0,1% SDS Gel aufgetragen und mit Coomassie Blau G250 angefärbt (Gellänge 20cm). Parallel dazu wurde mit den gleichen Proben ein Hemmhofest durchgeführt gegen *Micrococcus flavus* (Gram<sup>+</sup>). Als Positivkontrolle wurde Lysozym 5mg/ml verwendet.

Um zu sehen, wie adulte Drohnen auf verschiedene Immunelizitoren reagieren, wurde bei frisch geschlüpften Drohnen 24 Stunden nach einer Infektion geschaut, ob und welche Immunfaktoren und AMPs in der Haemolymphe exprimiert werden.

Nach Injektion mit Laminarin, Peptidoglycan (PGN), Lipopolysaccharid (LPS) und *E.coli* kommt es zur Hochregulation der Immunfaktoren IRp30 und Carboxylesterase 1. Hymenoptaecin und OCLP 1 werden ebenso nach Injektion aller Elizitoren hochreguliert (Abb. 46). Defensin 1 wird nach Laminarin und *E.coli* Injektion stärker exprimiert als nach PGN und LPS Applikation. Zudem ist bei diesem Versuch erkennbar, dass nach Verletzung (PBS) weder die Immunfaktoren Carboxylesterase und IRp30 noch OCLP1 oder die AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 im SDS Gel sichtbar sind.

Nur nach LPS Injektion fällt die antibakterielle Aktivität der Haemolymphe nicht so stark aus wie bei den anderen Elizitoren. Aber es sind dennoch kleine Hemmhöfe erkennbar. Bei den nicht infizierten und den PBS injizierten ist dagegen kein Hemmhof zu beobachten (Abb. 46).

In frisch geschlüpften adulten Drohnen (1 d) wurden die beiden hochmolekularen Immunfaktoren Carboxylesterase und IRp30 nach einer Infektion mit *E.coli* induziert (Abb. 42). Um festzustellen, ob diese Immunfaktoren auch von älteren Drohnen nach einer Infektion gebildet werden, wurde ein Langzeitversuch über sieben Wochen mit drei verschiedenen Völkern durchgeführt (Abb. 41, Abb. 47).

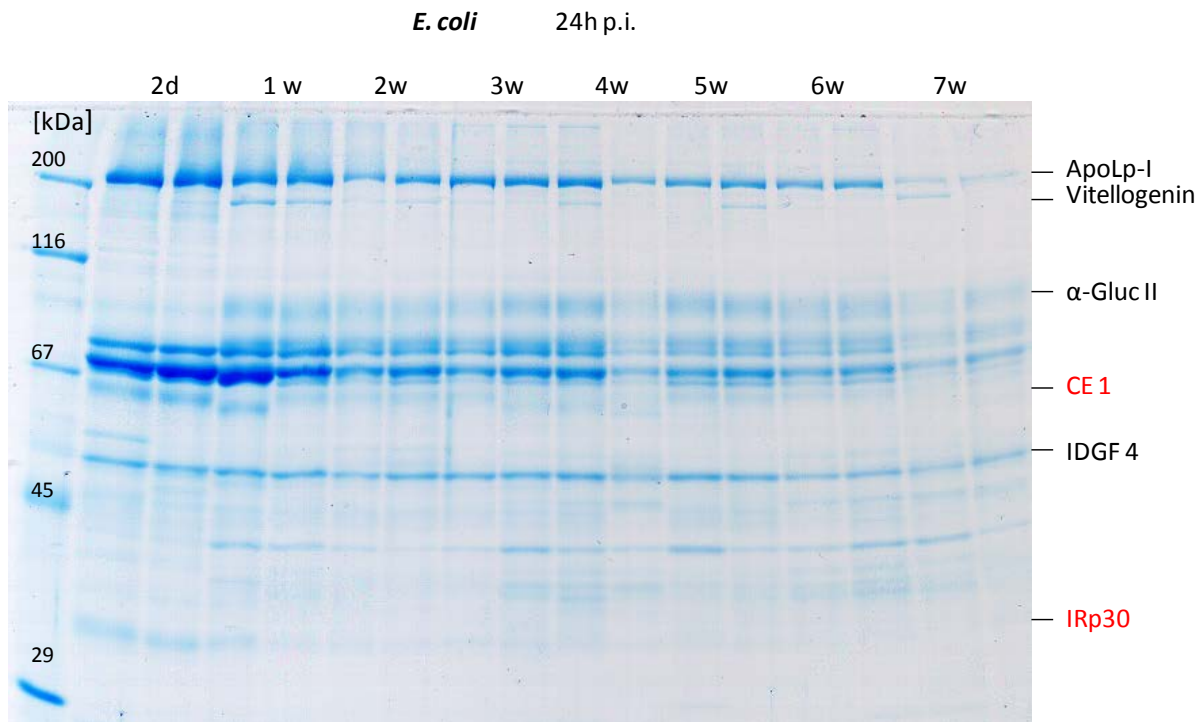


Abb. 47: Proteinmuster der Haemolymphe *E.coli* infizierter adulter Drohnen im Alter von 2 Tagen bis 7 Wochen. Aliqote wurden auf einem 10 % PAA/0, 1% SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie Blau G250 angefärbt.  $\alpha$ -Gluc =  $\alpha$ -Glucosidase; ApoLp = Apolipoprotein.

Der Langzeitversuch mit adulten Drohnen wurde so durchgeführt, dass adulte Drohnen verschiedenen Alters aus dem Stock entnommen wurden, mit *E.coli* infiziert und ihnen 24 h p.i. die Haemolymphe abgenommen wurde. Zwei Tage und eine Woche alte Drohnen reagieren noch mit einer starken Hochregulation der Immunfaktoren Carboxylesterase und IRp30. Aber danach werden die Immunfaktoren nicht mehr in diesem Maße gebildet. Das Vitellogenin ist in ein bis zwei Wochen alten Drohnen am stärksten exprimiert (Abb. 41, Abb. 47). Es ist aber deutlich erkennbar, dass das Vitellogenin auch noch in der Haemolymphe von einigen älteren Drohnen vorhanden ist.

Bevor die Expression niedermolekularer AMPs bei der Langzeitstudie analysiert werden konnte, musste zuerst das Proteinmuster von nicht infizierten Drohnen im niedermolekularen Bereich analysiert werden (Abb. 48).

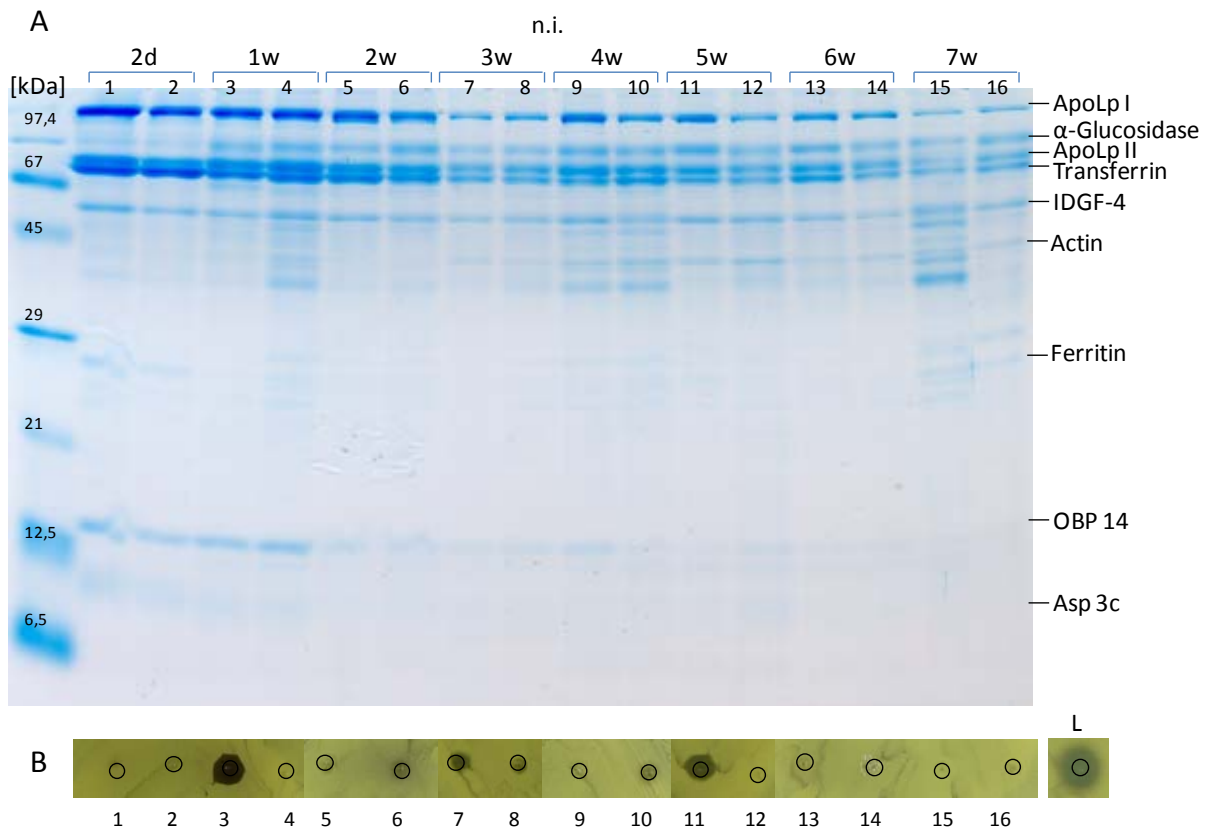


Abb. 48: Langzeitstudie zur Zusammensetzung der Haemolymphe von 2 Tage bis 7 Wochen alten nicht infizierten Drohnen. A) Aliquote wurden auf einem 15% PAA/0,1% SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie Blau G250 angefärbt. B) Dazu wurde parallel ein Hemmhofstest gegen *Micrococcus flavus* (gram<sup>+</sup>) durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Lysozym (L).

Im niedermolekularen Bereich ist OBP 14 während des gesamten Versuchszeitraumes vorhanden. ASP 3c dagegen ist nur in der Haemolymphe von zwei Tage alten Drohnen und eine Woche alten Drohnen gut sichtbar (Abb. 48A). Beim Test auf antibakterielle Aktivität der Haemolymphe ist ersichtlich, dass keiner der Drohnen, die für diesen Versuch verwendet wurden, eine Infektion hatte. Aber dennoch zeigen die Haemolympfproben von den Individuen 3 und 11 einen sehr kleinen Hemmhof, der nicht größer als die Auftropffläche ist und auf eine Verwundungsreaktion der Dohnen hindeutet (Abb. 48B).

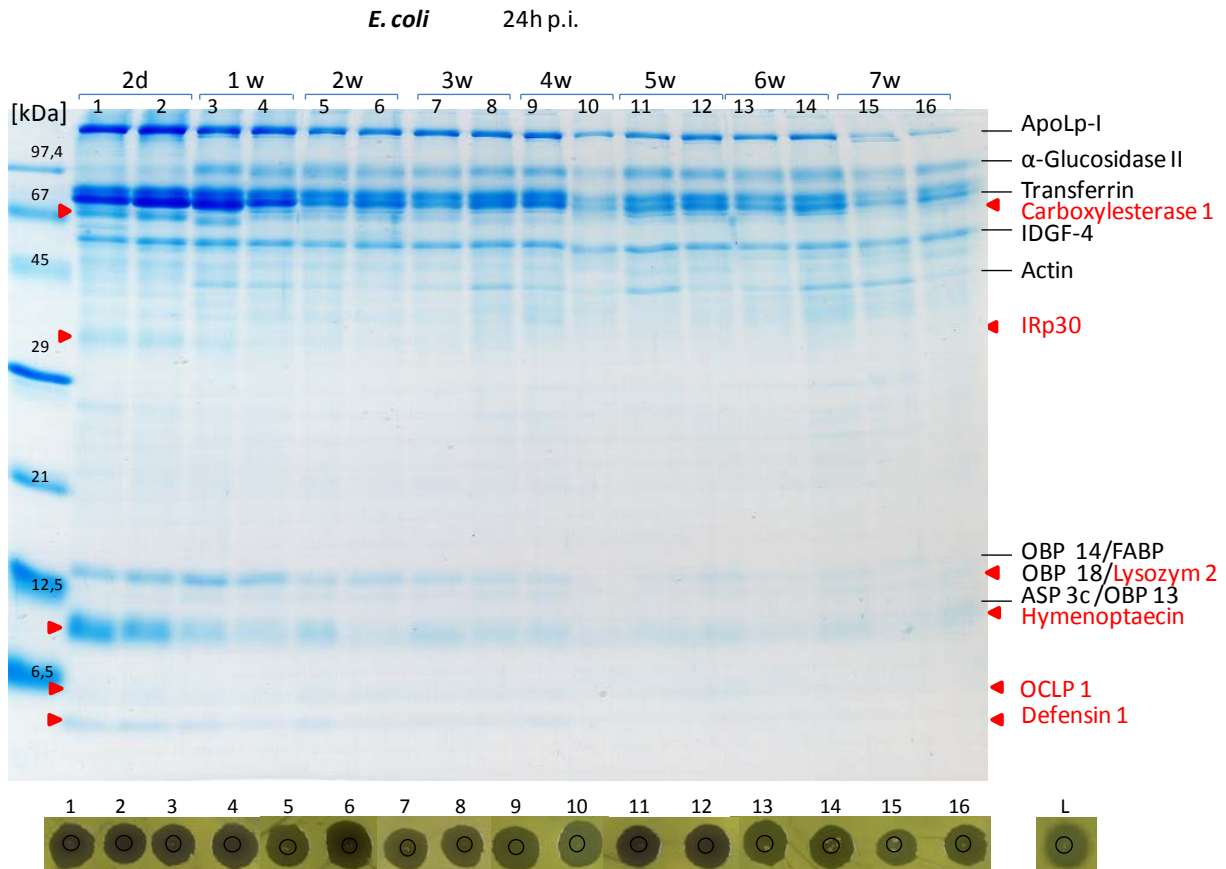


Abb. 49: Proteinmuster der Haemolympe *E. coli* infizierter adulter Drohnen im Alter von 2 Tagen bis 7 Wochen. Aliquote wurden auf einem 15% PAA/0,1% SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie Blau G250 angefärbt. Hochregulierte Proteine nach der Infektion mit *E. coli* sind rot hervorgehoben. Mit den Proben wurde parallel dazu ein Hemmhoftest gegen *Micrococcus flavus* durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Lysozym (L).

Die Expression der antimikrobiellen Peptide Hymenoptaecin und Defensin 1 ist in den ersten zwei Wochen noch stark und lässt dann drastisch nach (Abb. 49). Aber Hymenoptaecin wurde auch noch in der Haemolympe von 4 Wochen alten Drohnen mittels nano HPLC/MS nachgewiesen. OCLP 1 ist über die gesamte Zeitspanne von 7 Wochen gleichbleibend vorhanden. Lysozym 2 läuft im eindimensionalen Gel auf der gleichen Höhe wie OBP 18. Daher kann keine Aussage über eine eventuelle Verringerung oder ein Ansteigen getroffen werden.

Im Kontrast dazu steht das Ergebnis des Hemmhoftestes, der mit denselben Proben durchgeführt wurde (Abb. 49). Die antibakterielle Aktivität der Haemolymphproben ist über den gesamten Testzeitraum von 7 Wochen konstant.

#### 4.4.3 Abnahme Koloniebildender Einheiten nach bakterieller Infektion bei adulten Drohnen

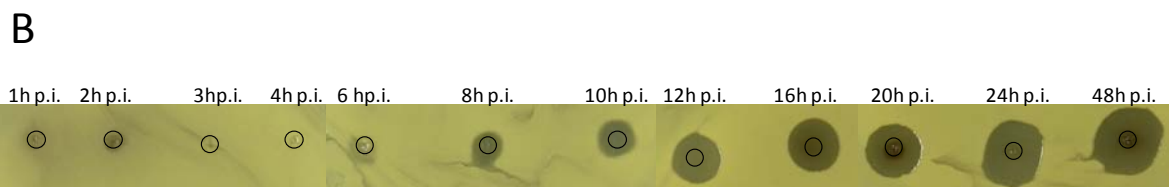
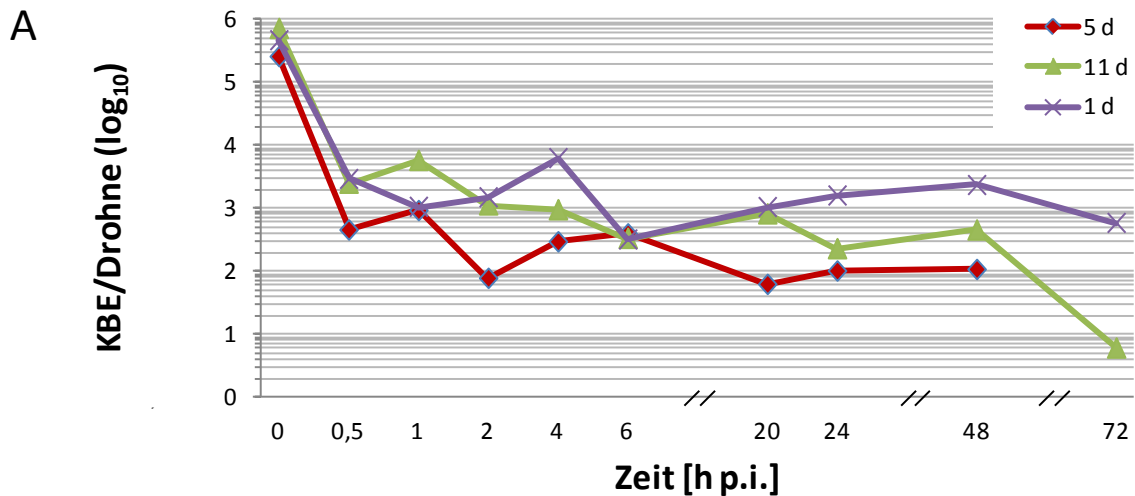


Abb. 50: Vergleich von zellulärer und humoraler Immunantwort von adulten Drohnen nach einer *E.coli* Infektion. A) Abnahme Koloniebildender Einheiten (KBE) pro Drohne zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Infektion mit  $10^5$  *E.coli* Zellen. Es wurden frisch geschlüpfte, 5 Tage und 11 Tage alte Drohnen verwendet. B) Antibakterielle Aktivität in der Haemolymphe nach einer *E.coli* Infektion bei frisch geschlüpfte Drohnen (1 d) nach verschiedenen Zeitpunkten. Der Hemmhof test wurde gegen das Gram-positive Bakterium *M.flavus* und mit Lysozym (L) als Positivkontrolle durchgeführt.

Nach einer artifizierten Infektion mit *E.coli* geht die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE) d.h. der lebensfähigen Bakterien in der Haemolymphe eines Drohnes innerhalb der ersten Stunde p.i. drastisch zurück. Aber die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten geht nicht auf null, sondern pendelt sich bei adulten Drohnen 48 h p.i. zwischen  $10^2$  und  $10^3$  ein. Zudem ist zwischen Drohnen verschiedenen Alters 24 und 48 h p.i. kein signifikanter Unterschied erkennbar. Erst 72 h p.i. nimmt die Anzahl der KBE bei den 11d alten Drohnen auf  $6 \times 10^0$  im Gegensatz zu  $5,8 \times 10^2$  KBE bei den 1d alten Drohnen stärker ab (Abb. 50A). Diese sehr schnelle zelluläre Immunantwort steht im Kontrast zur eher langsamen humoralen Reaktion in Form der Antibakteriellen Aktivität im Hemmhof test (Abb. 50B), die erst nach 6 bis 8 h p.i. richtig sichtbar wird und dann kontinuierlich zunimmt, bis sie etwa 24 h p.i. ihre Plateauphase erreicht zu haben scheint, da es zu keiner weiteren Zunahme in der Hemmhofgröße kommt.

#### 4.4.4 Vergleich der Haemolymphproteine von Larven und adulten Drohnen

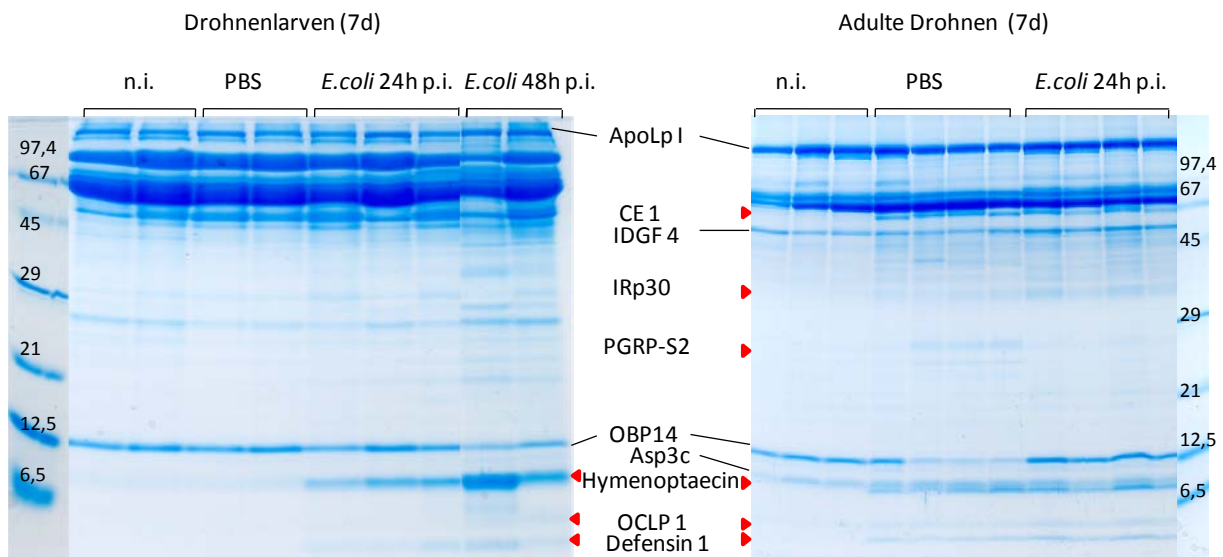


Abb. 51: Vergleich des Proteinmusters der Haemolymphe von nicht infizierten Drohnenlarven (7 d) und adulten Drohnen (7 d) nach Verletzung (PBS) und nach einer Infektion mit  $10^5$  *E.coli* Zellen. Aliquote der Haemolymphe wurden auf einem 15 % PAA/0,1 % SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie Blau G250 angefärbt.

Im Gegensatz zu 7d alten Drohnenlarven reagieren adulte Drohnen schon nach einer Verletzung (PBS) mit der Bildung der AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 (Abb. 51). Darüber hinaus wird nur in adulten Drohnen die Expression der Immunfaktoren Carboxylesterase, IRp30 und PGRP-S2 hochreguliert. OCLP 1 ist in Larven erst 48 Stunden nach Infektion erkennbar vorhanden. In adulten Drohnen wird es hingegen schon nach Verwundung (PBS) exprimiert. Nach *E.coli* Infektion scheint aber mehr OCLP 1 in der Haemolymphe vorhanden zu sein. Da in eindimensionalen Gelen das Lysozym 2 meist von OBPs überlagert wird, kann hierzu kein Vergleich angestellt werden. In zweidimensionalen Gelen ist es sichtbar, aber mit diesen kann immer nur eine einzelne Haemolymphprobe analysiert werden.

In der Haemolymphe von Drohnenlarven und adulten Drohnen ist eine Vielzahl von Peptiden/Proteinen konstitutiv vorhanden. Die wichtigsten dieser Proteine für Drohnenlarven und adulte Drohnen, die während dieser Arbeit mittels nano HPLC/MS identifiziert worden sind, wurden in Tabelle 19 zusammengestellt. Sie prägen weitestgehend das sichtbare Proteinmuster in den eindimensionalen oder zweidimensionalen Polyacrylamidgelen. Aber natürlich sind mehr Peptide/Proteine in der Haemolymphe vorhanden, von denen einige im Laufe dieser Arbeit für Drohnenlarven, -puppen und adulte Drohnen identifiziert wurden (s. Tabelle S1). Die meisten dieser Peptide/Proteine sind nur in geringen Mengen in der Haemolymphe vorhanden.

Tabelle 19: Proteine, die in der Haemolymphe von nicht infizierten Drohnenlarven (DL) und adulten Drohnen (DA) identifiziert worden sind.

| Entwicklungsstadium | Protein                               | Accession (NCBI) | MW [Da] <sup>1</sup> | pI <sup>1</sup> | SP <sup>2</sup> | Mowse score | Sequence coverage [%] <sup>3</sup> |
|---------------------|---------------------------------------|------------------|----------------------|-----------------|-----------------|-------------|------------------------------------|
| DL                  | Apolipoporphin-I (748-3202)           | 66513966         | 273870               | 8.4             | -               | 724         | 26                                 |
| DL                  | Very high-density lipoprotein (VHDL)  | 110762106        | 175689               | 6.6             | -               | 994         | 20                                 |
| DL                  | Hexamerin 110                         | 155369750        | 110339               | 6.4             | 16              | 989         | 34                                 |
| DL                  | Apolipoporphin-II (1-747)             | 66513966         | 83283                | 9.2             | -               | 1018        | 35                                 |
| DL                  | Transferrin                           | 58585086         | 75760                | 6.6             | 25              | 971         | 25                                 |
| DL                  | Hexamerin 70a                         | 148357839        | 79090                | 6.6             | 21              | 647         | 40                                 |
| DL                  | Hexamerin 70b                         | 58585148         | 77048                | 6.6             | 21              | 974         | 49                                 |
| DL                  | Hexamerin 70c                         | 148887477        | 79216                | 8.2             | 19              | 1191        | 50                                 |
| DL                  | Imaginal disc growth factor 4         | 66514614         | 46226                | 7.3             | 23              | 434         | 35                                 |
| DL                  | Ferritin 1                            | 110762641        | 15180                | 5.5             | 19              | 297         | 38                                 |
| DL                  | Ferritin 2                            | 66524161         | 23476                | 6.1             | 16              | 248         | 28                                 |
| DL                  | Odorant binding protein 14 (OBP 14)   | 94158822         | 13518                | 5.4             | 16              | 382         | 44                                 |
| DA                  | Apolipoporphin isoform 1              | 328780884        | 200934               | 8.7             | -               | 2097        | 36                                 |
| DA                  | Vitellogenin                          | 58585104         | 199406               | 6.3             | 16              | 1704        | 29                                 |
| DA                  | $\alpha$ -Glucosidase II              | 94400901         | 64377                | 5.8             | 21              | 684         | 24                                 |
| DA                  | Toll-like receptor 13 like            | 110755367        | 73990                | 6.1             | 17              | 696         | 21                                 |
| DA                  | Hexamerin 70a                         | 148357839        | 79090                | 6.6             | 21              | 834         | 50                                 |
| DA                  | Apolipoporphin-II (1-747)             | 66513966         | 83283                | 9.2             | -               | 1210        | 44                                 |
| DA                  | Transferrin                           | 58585086         | 75760                | 6.6             | 25              | 468         | 27                                 |
| DA                  | Prophenoloxidase                      | 58585196         | 80094                | 6.3             | -               | 1272        | 48                                 |
| DA                  | Imaginal disc growth factor 4         | 66514614         | 46226                | 7.3             | 23              | 887         | 41                                 |
| DA                  | Apolipoporphin-III                    | 166795901        | 19448                | 5.5             | 17              | 406         | 46                                 |
| DA                  | Odorant binding protein 13 (OBP 13)   | 94158810         | 13222                | 5.6             | 17              | 924         | 68                                 |
| DA                  | Odorant binding protein 14 (OBP 14)   | 94158822         | 13518                | 5.4             | 16              | 819         | 75                                 |
| DA                  | Odorant binding protein 18 (OBP 18)   | 94158830         | 13363                | 4.5             | 16              | 127         | 15                                 |
| DA                  | FABP-like Protein                     | 58585214         | 15549                | 5.5             | -               | 131         | 42                                 |
| DA                  | Antennal-specific protein 3c (ASP 3c) | 58585106         | 13014                | 6.8             | 19              | 191         | 40                                 |

<sup>1</sup> Molekulare Massen und pI-Werte wurden via ExPASy/ProtParam erhalten und beziehen sich auf „reife“ Proteine (abzüglich Signalpeptid)

<sup>2</sup> Voraussagen für vorhandene Signalpeptide (SP) und Spaltstellen wurden mit dem TargetP Programm ermittelt.

<sup>3</sup> Die Sequenzabdeckung repräsentiert den Prozentsatz identifizierter tryptischer Peptide



Zusätzlich zu diesen Peptiden/Proteinen, die immer in der Haemolymphe vorhanden sind (Tabelle 19), werden nach einer bakteriellen Infektion Immunpeptide/Proteine induziert oder hochreguliert. Hierbei ist auffällig, dass hochmolekulare Immunfaktoren nur in adulten Drohnen induziert oder hochreguliert werden, nicht aber in Drohnenlarven. Da bei Drohnenpuppen außer Hymenoptaecin 48 h nach *E.coli* Infektion keine weiteren immuninduzierten Proteine hochreguliert oder induziert worden sind, wurden sie nicht in Tabelle 20 mit aufgenommen.

**Tabelle 20: Immunpeptide/Proteine, die nach einer bakteriellen Infektion in Drohnenlarven (DL) und adulten Drohnen (DA) induziert oder hochreguliert wurden.**

| Entwicklungsstadium | Protein  | Accession (NCBI) | MW (Da) <sup>1</sup> | pI <sup>1</sup> | SP <sup>2</sup>        | Mowse score | Sequence coverage [%] <sup>4</sup> |
|---------------------|--|------------------|----------------------|-----------------|------------------------|-------------|------------------------------------|
| DL                  | Hymenoptaecin                                  | 58585174         | 10286                | 9.9             | 17<br>+19 <sup>3</sup> | 139         | 55                                 |
| DL                  | Defensin 1                                     | 37703274         | 5582                 | 8.6             | 19<br>+24 <sup>3</sup> | 96          | 51                                 |
| DL                  | $\omega$ -conotoxin like protein 1 (OCLP 1)    | 110756431        | 6123                 | 8.6             | 20                     | 86          | 13                                 |
| DA                  | Hymenoptaecin                                  | 58585174         | 10286                | 9.9             | 17<br>+19 <sup>3</sup> | 416         | 86                                 |
| DA                  | Defensin 1                                     | 37703274         | 5582                 | 8.6             | 19<br>+24 <sup>3</sup> | 145         | 51                                 |
| DA                  | Carboxylesterase 1                             | 66512983         | 63327                | 6.0             | 18                     | 192         | 14                                 |
| DA                  | Serinprotease                                  | 110758534        | 43949                | 5.3             | 18                     | 179         | 17                                 |
| DA                  | IRp42  | 66519003         | 41491                | 9.3             | -                      | 158         | 23                                 |
| DA                  | IRp30  | 66507096         | 28699                | 6.1             | 17                     | 546         | 26                                 |
| DA                  | Peptidoglycan-recognition protein-S2 (PGRP-S2) | 254910931        | 19386                | 8.9             | 19                     | 132         | 21                                 |
| DA                  | Lysozym 2                                      | 110762162        | 13719                | 9.1             | 21                     | 158         | 21                                 |
| DA                  | $\omega$ -conotoxin like protein 1 (OCLP 1)    | 110756431        | 6123                 | 8.6             | 20                     | 164         | 44                                 |

<sup>1</sup> Molekulare Massen und pI-Werte wurden via ExPasy/ProtParam erhalten und beziehen sich auf „reife“ Proteine (abzüglich Signalpeptid oder PrePro-Sequenz)

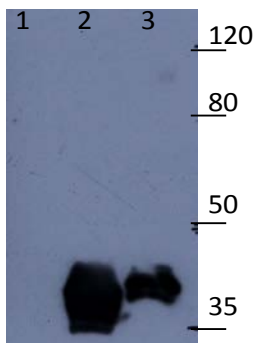
<sup>2</sup> Voraussagen für vorhandene Signalpeptide (SP) und Spaltstellen wurden mit dem TargetP Programm ermittelt.

<sup>3</sup> Prepro-Sequenzen (Casteels-Josson et al., 1994)

<sup>4</sup> Die Sequenzabdeckung repräsentiert den Prozentsatz identifizierter tryptischer Peptide



Aufgrund dieser großen Sequenzähnlichkeit wurde eine Blastsuche durchgeführt, ob OCLP 1 ähnliche Proteine auch in anderen Hymenopteren vorkommen (s. 8.3). Bei der Roten Feuerameise (*Solenopsis invicta*) und der parasitischen Wespe *Nasonia vitripennis* wurde dabei jeweils ein Protein gefunden, das sehr starke Sequenzähnlichkeit mit dem OCLP 1 der Honigbiene und der Hummel aufwies.



Auch bei *Bombus terrestris* wird nach einer Infektion mit *E. coli* eine große Menge an IRp-30 gebildet, wie durch Western Blot Analyse bestätigt werden konnte (Abb. 54). Die Menge an induziertem IRp30 bei *Bombus terrestris* Arbeiterinnen ist deutlich größer, als Arbeiterinnen von *Apis mellifera* nach einer septischen Infektion bilden. Zudem ist erkennbar, dass IRp30 bei nicht infizierten Tieren nicht exprimiert wird.

Abb. 54: Western Blot mit bienenspezifischem IRp 30 Immunsereum 1:1000 1) *Bombus terrestris* nicht infiziert, 2) *Bombus terrestris* nach *E. coli* Infektion und 3) *Apis mellifera* nach *E. coli* Infektion

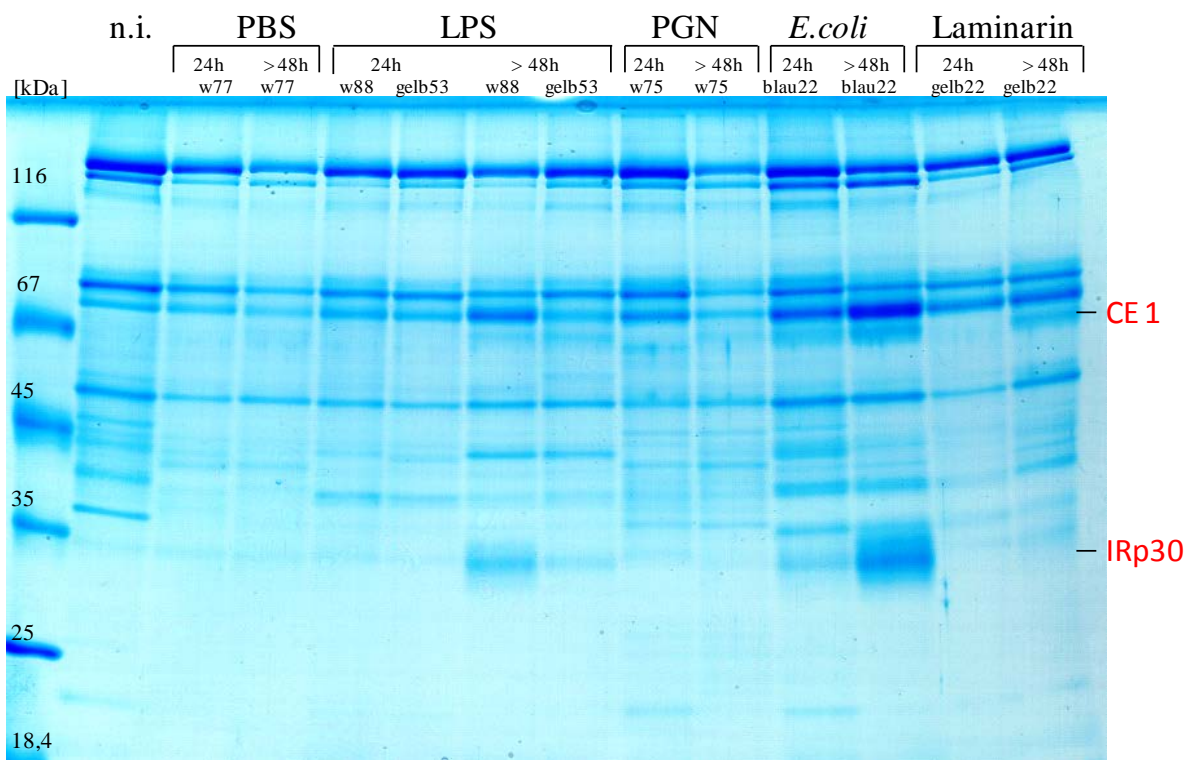
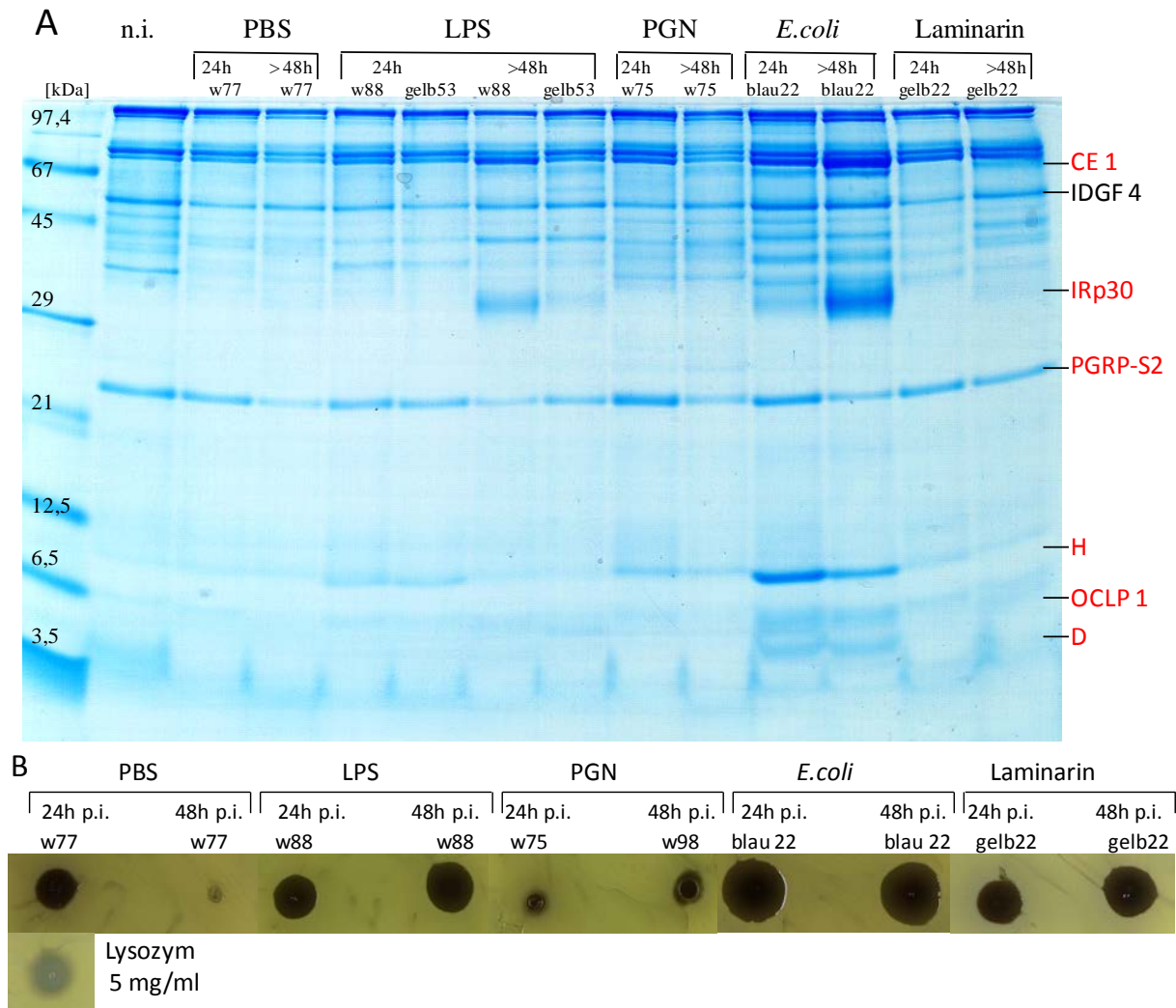


Abb. 55: Charakterisierung von transient exprimierten hochmolekularen Immunfaktoren in der Haemolymphe von *Bombus terrestris*. Die Haemolymphe einer nicht infizierten Erdhummel wurde mit der von Hummeln verglichen, denen je 5 µl LPS (0,5 µg/µl), PGN (0,5 µg/µl), *E. coli* 10<sup>5</sup> Z oder Laminarin (30 µg/µl) injiziert wurden. Bei den 24 h und 48 h Werten handelt es sich jeweils um dasselbe Individuum, kenntlich gemacht durch die Nummerierung der einzelnen Hummel. Die Hummeln waren mit nummerierten Oppalblättchen für den Versuch markiert. 10 % PAA/0,1 % SDS Gel, Laemmli, Coomassie Blue G250, 8,5 cm.

Im hochmolekularen Bereich unterscheidet sich die Reaktion auf die verschiedenen Immunelizitoren insofern, dass nach *E.coli* und nach LPS Injektion eine starke Expression der Immunfaktoren Carboxylesterase und IRp30 zu erkennen ist (Abb. 54, Abb. 56). Aber auch nach Laminarin Injektion werden die beiden Immunfaktoren hochreguliert. Bei PGN Injektion ist 24h p.i. keine Hochregulierung von der Carboxylesterase und IRp30 zu erkennen, jedoch ist 48 h p.i. die Carboxylesterase schwach exprimiert.



**Abb. 56:** Charakterisierung von transient exprimierten AMPs in der Haemolymph von *Bombus terrestris* Arbeiterinnen. Es wurden die gleichen Proben verwendet, wie in Abb. 55. A) Auftrennung im niedermolekularen Bereich: 15 % PAA/0,1 % SDS Gel, Tricine, Coomassie Blau G250, 8,5 cm. H = Hymenoptaecin; D = Defensin 1; CE = Carboxylesterase; OCLP 1=  $\omega$ -conotoxin-like protein 1; IDGF = imaginal disc growth factor; IRp = immune responsive protein; PGRP = peptidoglycan recognition protein. B) Mit den Proben wurde parallel dazu ein Hemmhoftest durchgeföhrt. Als Indikatorbakterium diente *M. flavus* (Gram<sup>+</sup>).

Im niedermolekularen Bereich ist zu erkennen, dass nach einer Infektion mit lebenden *E.coli* Zellen die stärkste Immunreaktion stattfindet (Abb. 56). Hier werden die AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 stark induziert, aber auch das bislang unbekannte Protein mit 6,5 kDa, das als OCLP 1 identifiziert wurde. Dieses wird auch, wenngleich nicht so stark, nach einer Injektion mit LPS, PGN und Laminarin hochreguliert. Im Gegensatz dazu scheint

es, dass das Defensin 1 nur nach einer Infektion mit *E.coli* in der Haemolymphe nachzuweisen ist.

Die antibakterielle Aktivität der Haemolymphe von Hummel Arbeiterinnen unterscheidet sich je nach dem welcher Immunelizitor eingesetzt worden ist (Abb. 56B). Nach einer Verletzung (PBS) ist nur 24 h p.i. ein Hemmhof zu beobachten und nicht 48 h p.i.. Die Hemmhöfe nach LPS und Laminarin Injektion sind in etwa gleich groß. Sie sind aber kleiner als nach einer *E.coli* Infektion und größer als nach PGN Applikation. Im Vergleich zur Lysozymkontrolle sind nur die Hemmhöfe nach Peptidoglycan (PGN) kleiner, während die anderen Hemmhöfe gleichgroß sind beziehungsweise eine größere Fläche einnehmen.

#### 4.5.2 Untersuchungen an der sächsischen Wespe (*Dolichovespula saxonica*)

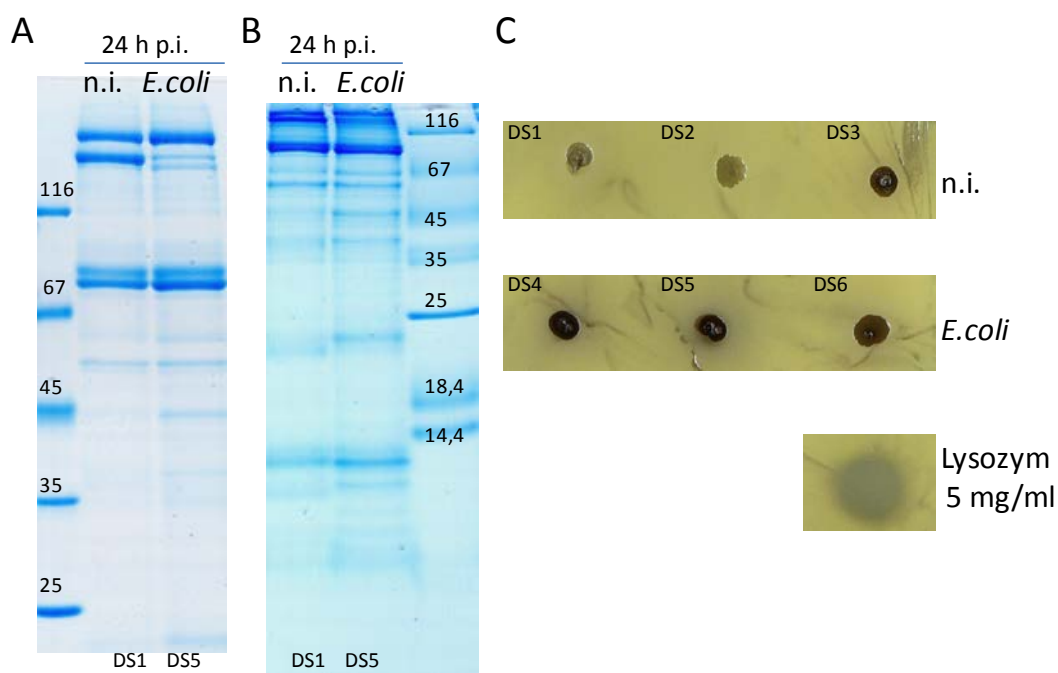


Abb. 57: Charakterisierung der Haemolymphproteine von nicht infizierten adulten *Dolichovespula saxonica* (DS1-DS3) und 24 h nach Infektion mit *E.coli* ( $10^4$  Z) (DS4-DS6). A) 10 % PAA/0,1 % SDS Gel, Laemmli, Coomassie Blue G250, 8,5 cm. B) 15 % PAA/0,1 % SDS Gel, Tricine, Coomassie Blue G250, 8,5 cm. C) Antibakterielle Aktivität der Haemolymphe von je drei Individuen. Als Indikatorbakterium diente *Micrococcus flavus* (Gram-positiv)

Bei *Dolichovespula saxonica* sind nach einer Infektion mit *E.coli* die hochmolekularen Immunfaktoren Carboxylesterase und IRp30 nicht exprimiert (Abb. 57A). Die AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 sind nach einer Infektion mit *E.coli* möglicherweise induziert worden (Abb. 57B). Das Genom von *Dolichovespula saxonica* ist noch nicht sequenziert worden, daher konnte keine Datenbanksuche nach Proteinen durchgeführt werden, die Ähnlichkeit mit den AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 aufweisen.

Antibakterielle Aktivität ist in Haemolymphproben von infizierten und nicht infizierten Individuen der sächsischen Wespe vorhanden (Abb. 57C). Diese Hemmhöfe sind relativ klein und haben keine größere Ausdehnung als die Auftropfstelle, aber es handelt sich eindeutig um Hemmhöfe. Bis auf den Hemmhof von DS3 sind die Hemmhöfe der Haemolymphproben der nicht infizierten Individuen nicht bräunlich gefärbt, wie bei den mit *E.coli* infizierten. Bei den Hemmhöfen der *E.coli* infizierten Individuen ist aber zusätzlich um den Hemmhof herum

eine leichte Braunfärbung erkennbar. Da die Wespen vom Flugloch abgefangen wurden, kann es durchaus sein, dass DS3 schon mit Bakterien in Kontakt gekommen sein könnte und in diesem Individuum daher eine humorale Immunantwort ausgelöst wurde.

#### 4.5.3 Versuche mit der Deutschen Wespe *Vespula germanica*

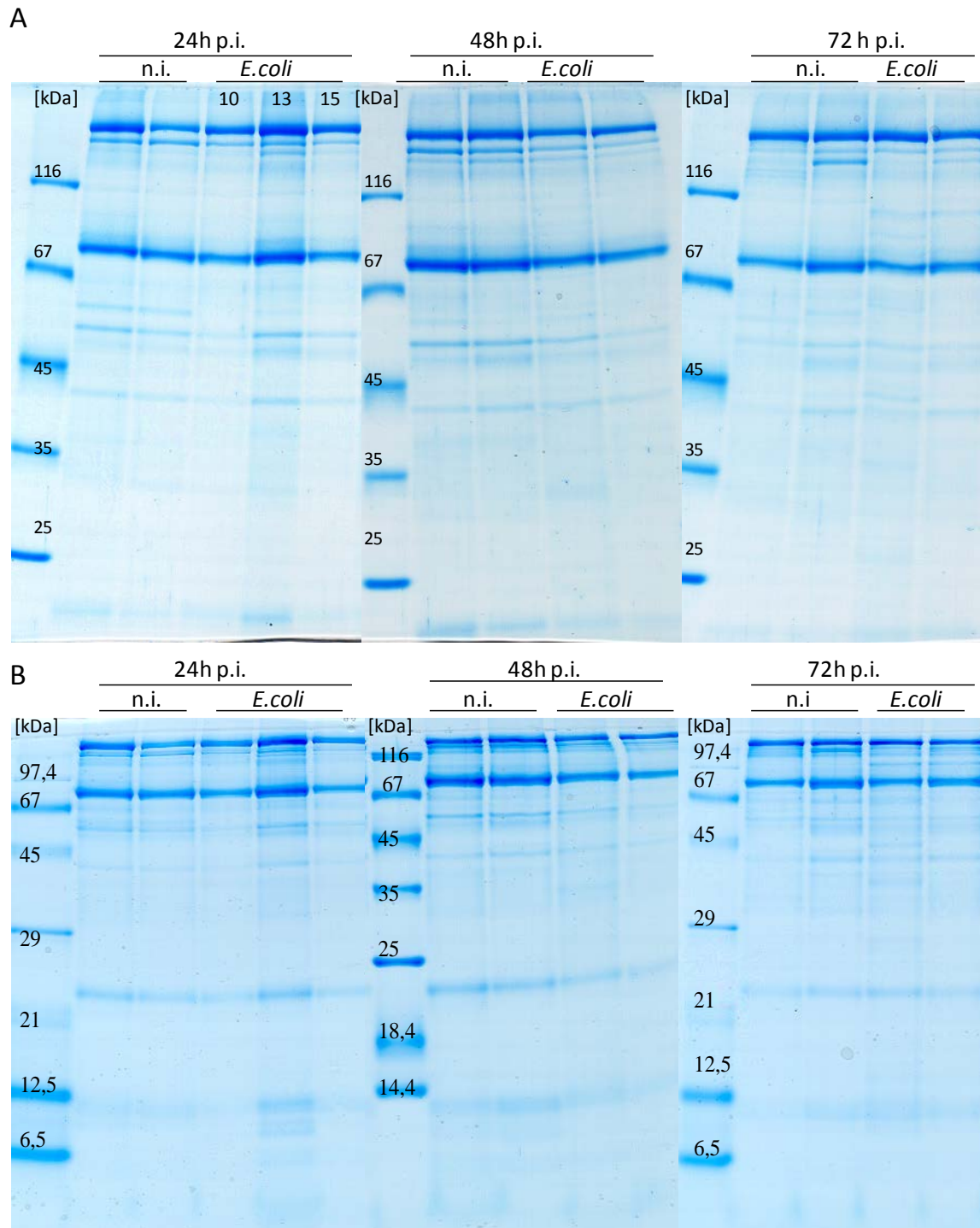


Abb. 58: Charakterisierung der Haemolymphproteine von *Vespula germanica* 24 h, 48 h und 72 h nach einer Infektion mit *E.coli* im Vergleich zu nicht Infizierten. A) Aliquote wurden auf ein 10 %PAA/0,1 % SDS Gel, Laemmli, Coomassie Blue G250, 8,5 cm aufgetragen. B) Die selben Haemolymphproben, die in A aufgetragen worden sind, wurden auch auf einem 15 % PAA/0,1 % SDS Gel, Tricine, Coomassie Blue G250, 8,5 cm aufgetrennt.

Im Hochmolekularen Bereich ist auf dem SDS Gel kein Unterschied zwischen den Haemolymphproben von nicht infizierten und von Wespen, die mit *E.coli* infiziert worden sind, zu sehen. Weder der hochmolekulare Immunfaktor Carboxylesterase, noch IRp30 werden hochreguliert (Abb. 58A).

Nach Auftrennung der Haemolymphproteine von der deutschen Wespen (*Vespula germanica*) im niedermolekularen Bereich ist nach einer Infektion mit *E.coli* erkennbar, dass AMPs wie das Hymenoptaecin und das Defensin 1 nicht induziert wurden (Abb. 58B). Aber bei der zweiten Haemolymphprobe 24 h p.i. *E.coli* wurden scheinbar mehrere Proteine leicht induziert im Bereich zwischen 12,5 und 6,5 kDa. Dies ist nur bei dieser einen Probe zu beobachten. Denn auch bei weiteren Versuchen (hier nicht gezeigt) konnte beobachtet werden, dass in diesem Bereich keine Proteine nach *E.coli* Infektion hochreguliert oder induziert worden sind, weder 24 h p.i. noch zu einem späteren Zeitpunkt.

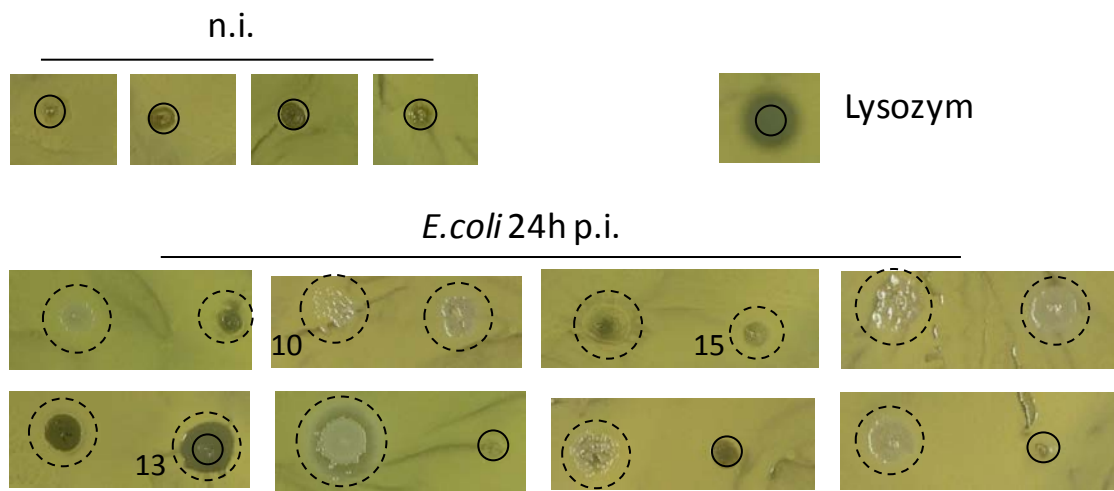


Abb. 59: Antibakterielle Aktivität der Haemolymph von *Vespula germanica* ohne Infektion und 24h nach einer Infektion mit *E.coli*. Als Indikatorbakterium diente *Micrococcus flavus* (Gram-positiv). Bei den nicht infizierten, Lysozym und einigen Haemolymphproben von infizierten Wespen wurde ein Kreis eingefügt, der die Auftropfstelle und -größe verdeutlichen soll. Dies wurde nicht bei allen Haemolymphproben gemacht, da sonst nicht mehr deutlich erkennbar wäre, dass an der Auftropfstelle teilweise eine andere Bakterienart (*E.coli*, weißlich) als das Indikatorbakterium (*M.flavus*, gelb) gewachsen ist. Es wurde daher jeweils ein gestrichelter Kreis eingefügt, der alles einschließt. Haemolymphproben der Serie W3, die zudem für SDS Gele verwendet wurden (Abb. 58), sind mit ihren Nummern gekennzeichnet.

Da beim Hemmhofstest der Haemolymph von *Vespula germanica* nach einer *E.coli* Infektion das Bild nicht eindeutig war, wurde er mehrfach durchgeführt (Abb. 59). Es kam nur zweimal zur Bildung von kleinen Hemmhöfen, die kaum die Auftropfstelle überschritten. Ansonsten war an 2/3 der Auftropfstellen das Wachstum von *E.coli* Bakterienkolonien zu beobachten (*E.coli* weißlich, *M.flavus* gelb). Aber im Großen und Ganzen ist kein Unterschied in der antibakteriellen Wirkung der Haemolymph von infizierten und nicht infizierten Wespen gegen das Indikatorbakterium *Micrococcus flavus* sichtbar.

#### 4.5.4 Versuche mit Mauerbienen (Gattung *Osmia*)

Um einen Vergleich zu den in sozialen Gruppen lebenden *Vespula germanica*, *Bombus terrestris* und natürlich den Honigbienen (*Apis mellifera*) zu haben, wurden Versuche mit den solitär lebenden Mauerbienenarten *Osmia rufa* und *Osmia cornuta* durchgeführt.

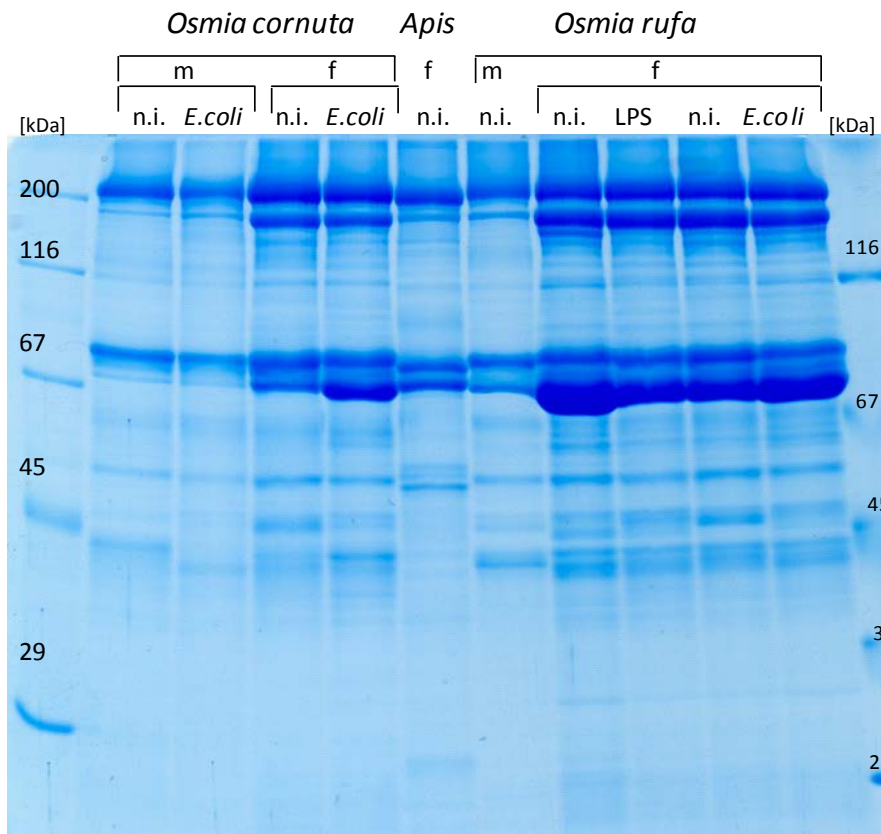


Abb. 60: Charakterisierung der Haemolymphproteine von *Osmia rufa* und *Osmia cornuta* Arbeiterinnen (f) und Drohnen (m). Es wurden Aliquote (1  $\mu$ l) der Haemolymphproben nicht infizierter und mit LPS oder *E.coli* injizierten Drohnen (m) und Arbeiterinnen (f) 24 h p.i. aufgetragen. Zum Vergleich wurde Haemolymphe einer nicht infizierten Arbeiterin der Honigbiene *Apis mellifera* auf ein 10 % PAA/ 0,1 % SDS Gel aufgetragen, Laemmli, Coomassie Blue G250, 8,5 cm.

Bei *Osmia cornuta* wurde die Haemolymphe von naiven Individuen und 24 h p.i. mit  $10^4$  *E.coli* Zellen von Arbeiterinnen und Drohnen entnommen. Die Drohnen von *Osmia rufa* überlebten die Infektion mit *E.coli* nicht oder es konnte keine Haemolymphe oder nur in sehr geringen Mengen entnommen werden. Bei den Arbeiterinnen wurden LPS (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) und  $10^4$  *E.coli* Zellen injiziert und jeweils 24 h p.i. die Haemolymphe entnommen. Die Haemolymphmenge, die den Individuen der Gattung *Osmia* maximal abgenommen werden konnte, war mit 2,5 - 3  $\mu$ l sehr gering. Bei Arbeiterinnen der Honigbiene *Apis mellifera* liegt sie zwischen 5 und 10  $\mu$ l pro Individuum.

Im hochmolekularen Bereich der Haemolymphe von *Osmia rufa* und *Osmia cornuta* sind weder bei Arbeiterinnen, noch bei Drohnen die Hochregulation von Proteinen nach einer Infektion zu beobachten (Abb. 60).



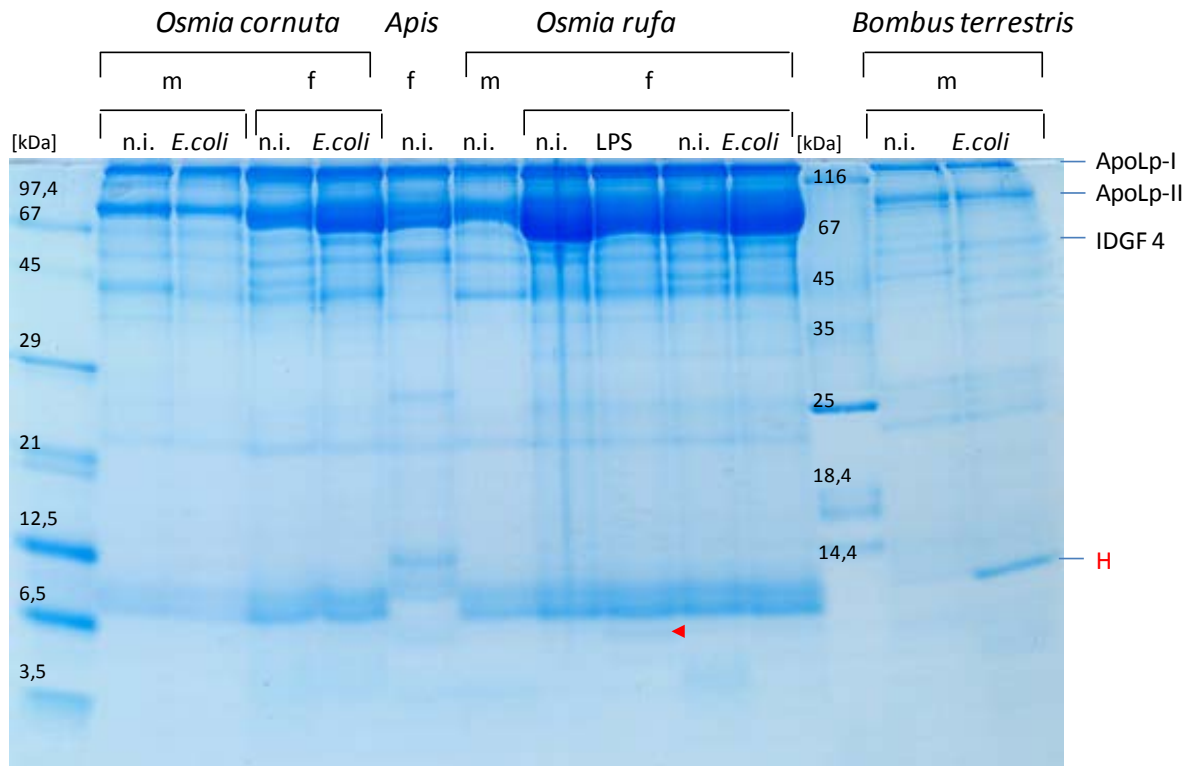


Abb. 61: Charakterisierung der niedermolekularen Haemolymphproteine von *Osmia rufa* und *Osmia cornuta*. Es handelt sich um Haemolymphproben von nicht infizierten und infizierten (LPS, *E.coli* 24 h p.i.) Arbeiterinnen (f) und Drohnen (m). Zum Vergleich wurde je ein Aliquot einer Haemolymphprobe einer nicht infizierten Arbeiterin der Honigbiene *Apis mellifera* und eines nicht infizierten und eines infizierten (*E.coli* 24h p.i.) *Bombus terrestris* Drohns aufgetragen. 15 % PAA/ 0,1 % SDS Gel, Tricine, Coomassie Blue G250, 8,5 cm. ApoLp = Apolipophorin; IDGF = imaginal disc growth factor; H = Hymenoptaecin. ▲ OCLP 1?

Weder bei *Osmia rufa* noch bei *Osmia cornuta* kam es nach einer bakteriellen Infektion zu einer Hochregulation von Immunfaktoren oder den AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 (Abb. 61). Nur nach LPS Injektion wurde bei *Osmia rufa* die Hochregulation eines Proteins mit 6,5 kDa (Abb. 61, rote Pfeilspitze) beobachtet. Bei diesem Peptid könnte es sich um OCLP 1 handeln.

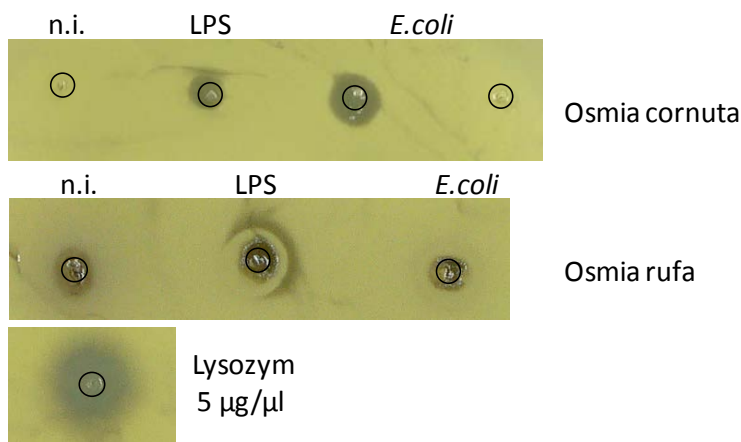


Abb. 62: Test auf antibakterielle Wirkung der Haemolymph von *Osmia cornuta* und *Osmia rufa* von nicht infizierten Tieren und 24 Stunden nach Injektion von LPS oder *E.coli*. Als Indikatorbakterium diente *M.flavus* und als Positivkontrolle Lysozym.

Beim Hemmhof test (Abb. 62) ist bei *Osmia cornuta* 24 h p.i. LPS ein kleiner Hof und nach *E.coli* Infektion ein Hemmhof vorhanden, der größer als die Auftropfstelle ist, allerdings nicht bei allen Proben. Bei den Haemolymphproben von *Osmia rufa* wurde bei allen Proben an der

Auftropfstelle eine leichte Braunfärbung beobachtet. Bei LPS Injektion ist 24 h p.i. zusätzlich noch ein Ring mit antibakterieller Wirkung zu erkennen (Abb. 62).

#### 4.5.5 Vergleich der Immunantwort von *Bombus terrestris*, *Apis mellifera* und *Vespula germanica*

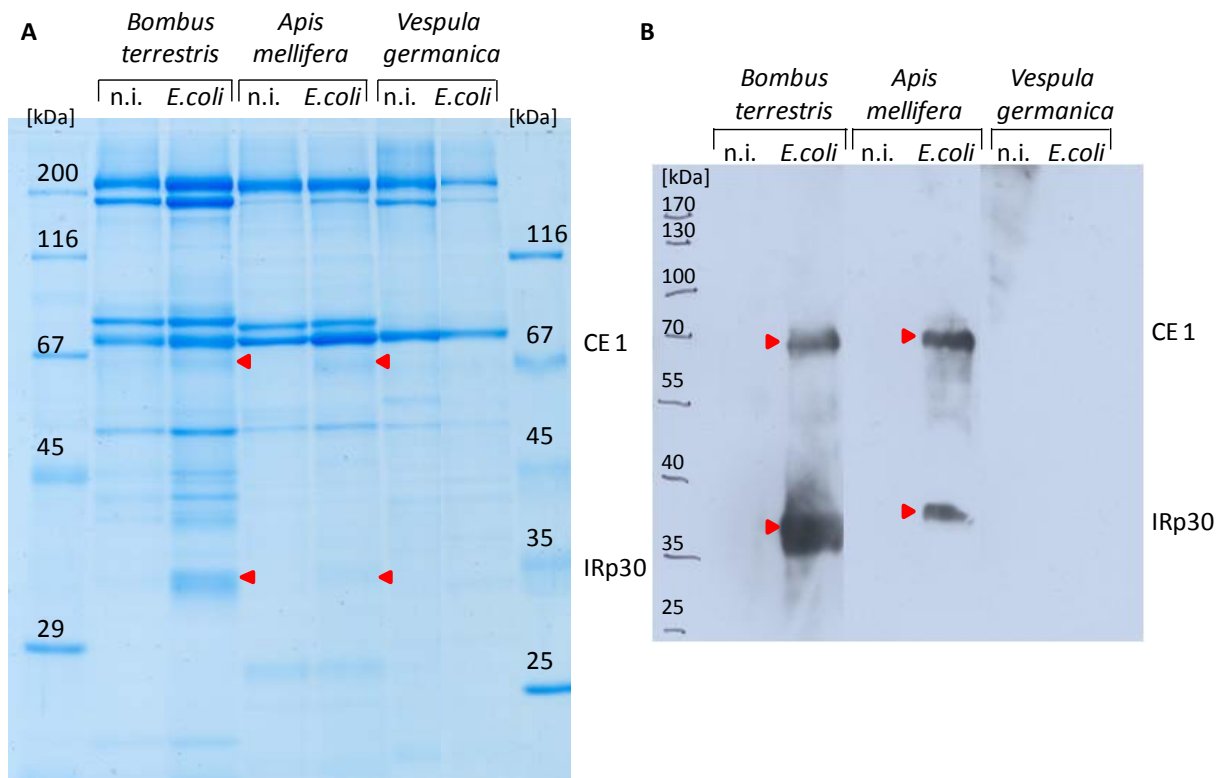


Abb. 63: Charakterisierung der Haemolymphen von Arbeiterinnen der Art *Bombus terrestris*, *Apis mellifera* und *Vespula germanica* ohne Infektion und 24h nach einer Infektion mit *E.coli*. Es wurden 1µl Aliquote der Haemolymphproben von *Apis mellifera* und *Vespula germanica* und 0,5 µl Aliquote der Haemolymphproben von *Bombus terrestris* aufgetragen. A) 10%PAA/0,1% SDS Gel, Laemmli, Coomassie Blue G250, 8,5cm. B) Western Blot mit bienenspezifischen Immunsereen gegen Carboxylesterase 1 und IRp30.

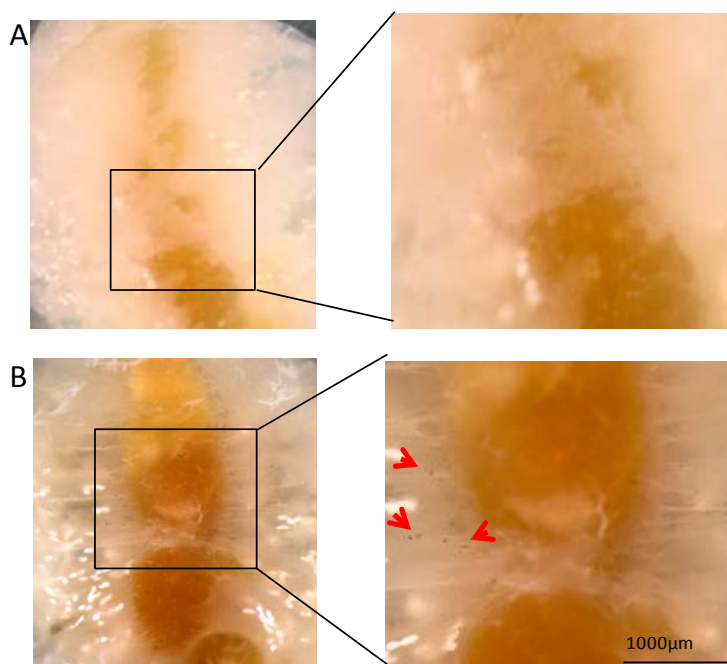
Nur *Bombus terrestris* und *Apis mellifera* Arbeiterinnen exprimierten nach einer bakteriellen Infektion die hochmolekularen Immunfaktoren Carboxylesterase und IRp30 (Abb. 63). Wie auch schon im Western Blot (Abb. 54) erkennbar ist, bilden die Erdhummeln nach einer Infektion mehr IRp30 als die Honigbienen. Die Deutsche Wespe induziert nach einer Infektion keinerlei hochmolekulare Immunfaktoren wie im Vergleich mit der Hummel und der Honigbiene in Abb. 63 gut erkennbar ist. Carboxylesterase 1 und IRp30 sind bei der Wespe nicht nachzuweisen. Auch mit Western Blot können in der Haemolymphe von infizierten Wespen mit den bienenspezifischen Antikörpern keine Kreuzreaktionen wie bei den Hummeln mit den potentiellen Immunfaktoren CE 1 und IRp30 nachgewiesen werden (Abb. 63B).

#### 4.6 Nodulation – Teil der zellulären Immunantwort in der Honigbiene.

Die Nodulation (induziert nach viraler, bakterieller und Pilzsporen Infektion), die Einkapsulierung (induziert von Organismen, die größer als Hämocyten sind und parasitischen Eiern) und die Phagozytose gehören zur zellulären Immunantwort. Nach septischer Infektion mit Bakterien wird in der Biene eine Hauptkomponente der zellulären Immunantwort induziert und zwar die Bildung von Noduli. Hierbei handelt es sich um eine zelluläre Immunreaktion, die in den ersten Stunden nach einer bakteriellen Infektion für das Abfangen der Pathogene in der Haemolymph verantwortlich ist. Bei der Nodulation wird eine Zellschicht um das Pathogen gebildet, in der es anschließend zur Melanisierung kommt.

##### 4.6.1 Nodulationsreaktionen von Larven

Meine Untersuchungen an Larven haben ergeben, dass nur Larven, die sich im Übergang zum Streckmadenstadium befinden, auf eine Infektion mit *E.coli* Noduli bilden. Diese sind in ihrer Färbung schwach ausgeprägt. Sie sind nicht, wie die Noduli adulter Bienen schwarz, sondern haben ein dunkles rotbraunes Aussehen.



**Abb. 64: Nodulibildung von Arbeiterinnenlarven.**  
 A) Naive Larve ohne Noduli. B) Larve 24 h nach *E.coli* Infektion (104Z). Noduli sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.

In vier Tage alten Arbeiterinnenlarven konnten keine oder bis zu drei Noduli pro Larve nach Infektion nachgewiesen werden. Bei 5 Tage alten Arbeiterinnenlarven, d.h. unmittelbar vor dem Streckmadenstadium, wurde ein Median von 3 Noduli pro Larve gefunden (N=35) (Abb. 64).

Bei sechs bis acht Tage alten Drohnenlarven werden nach *E.coli* Infektion keine Noduli gebildet. Neun Tage alte Drohnenlarven weisen nach Injektion von  $10^5$  *E.coli* Zellen 24 h p.i. entweder keine oder höchstens fünf Noduli pro Larve auf. Die Anzahl der Noduli bei zehn beziehungsweise elf Tage alten Drohnenlarven ist mit einem Median von 17 Noduli pro Larve 24 h p.i. (N=18) (Abb. 65) und 54 Noduli pro Larve 48 h p.i. (N=12) erheblich geringer, als dies bei adulten Drohnen der Fall ist. Bei Drohnenlarven konnte eine Zunahme der Noduli im Zeitraum von 24 bis 48 h p.i. festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt ist bei adulten Bienen längst die Plateauphase erreicht (Abb. 75).

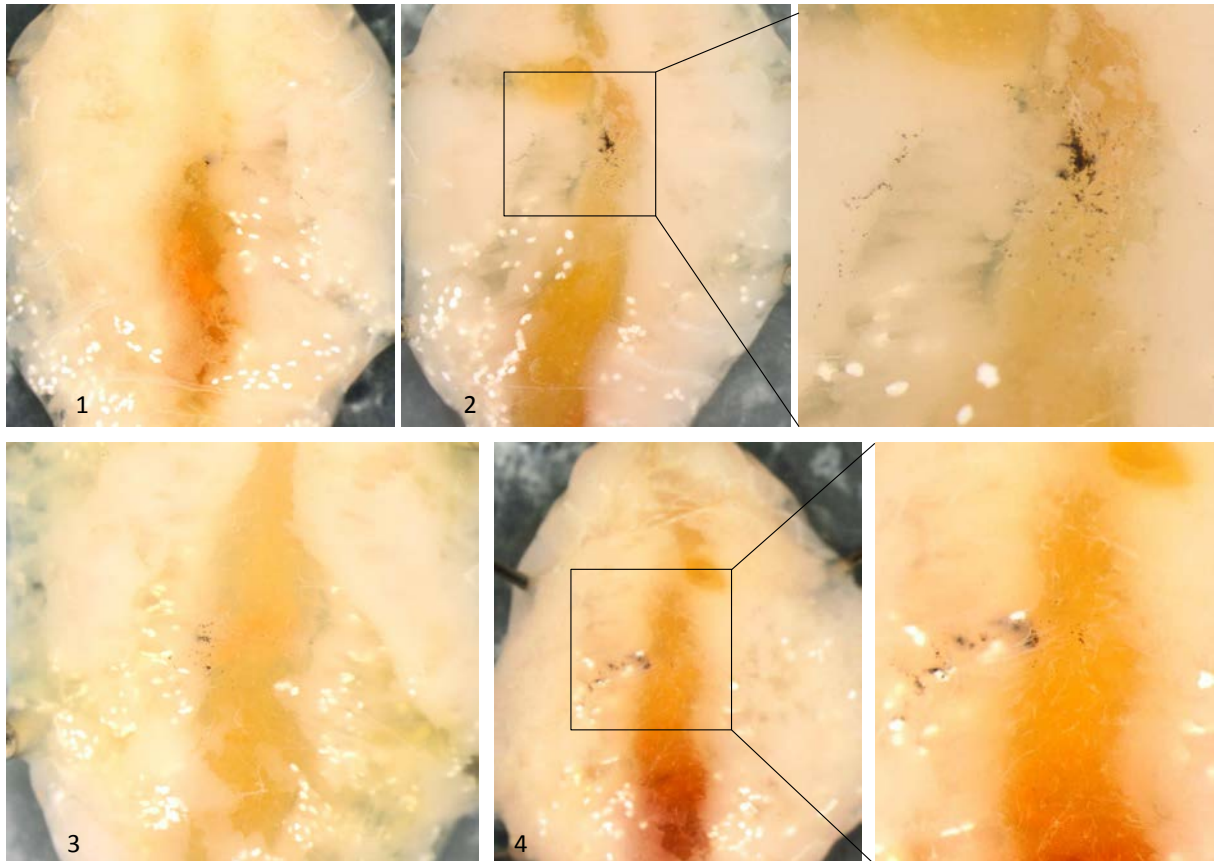


Abb. 65: Nodulbildung in vier Drohnenlarven. 10-11 d alte Drohnenlarven wurden mit *E.coli* ( $10^5$  Z) infiziert und die Nodulreaktion 24 h p.i. untersucht.

Bei Drohnenpuppen oder allgemein bei Puppen ist es schwierig nach Noduli zu suchen, da sie nach einer Infektion im Ganzen gräulich schwarz werden und die Organe sich im Aufbau befinden.

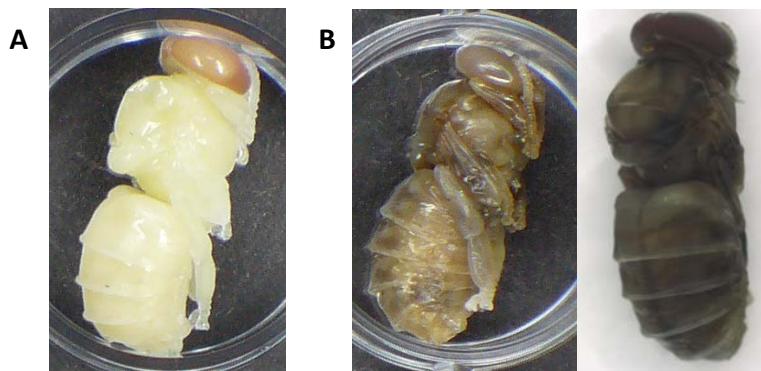


Abb. 66: Nicht infizierte und infizierte Drohnenpuppen. A) Nicht infizierte rotäugige Drohnenpuppe B) mit *E.coli* infizierte Drohnenpuppen (24 h p.i.).

#### 4.6.2 Nodulationsreaktionen von Arbeiterinnen

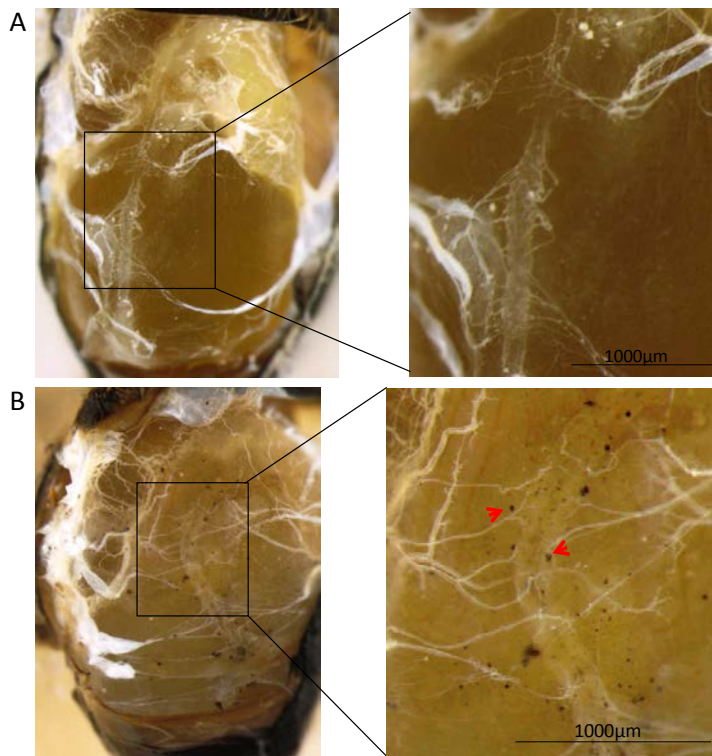


Abb. 67: Nodulationsreaktionen von frisch geschlüpften adulten Arbeiterinnen A) ohne Infektion und B) 24h nach einer Infektion mit *E.coli* ( $10^5 Z$ ). Noduli sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.

Bei frisch geschlüpften Arbeiterinnen ist die Anzahl an Noduli mit rund  $90 \pm 68,3$  (N=59) Noduli pro Arbeiterin, die nach einer Infektion mit *E.coli* zu sehen sind, verglichen mit älteren Bienen am höchsten. Vor allem entlang des Herzschlauches bilden sich im Haemocoel melanisierte Noduli aus. Ammenbienen ( $6,1 \pm 5,1$ ; N=16) (Abb. 68) und Flugbienen (Nektarsammlerinnen und Pollensammlerinnen ( $8,9 \pm 10,2$ ; N=21) (Abb. 70) bilden höchstens 10 % der Noduli von frisch geschlüpften Arbeiterinnen nach einer Infektion aus (Tabelle 21).

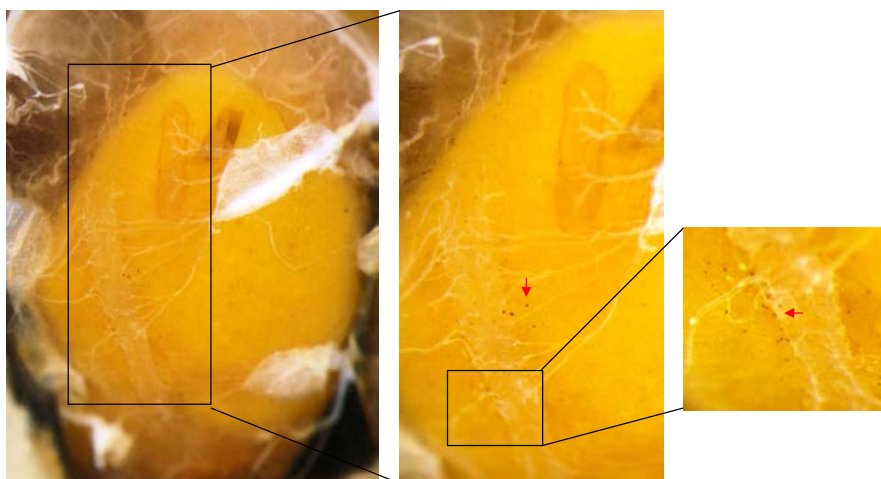


Abb. 68: Ammenbiene mit Noduli. Die Ammenbiene wurde vom Brutnest bei der Brutpflege abgesammelt. Die Bilder wurden 24 h p.i. *E.coli* ( $10^5 Z$ ) aufgenommen.

Wie in Abb. 69 zu sehen, sind erst drei bis vier Stunden nach einer Infektion mit *E.coli* die ersten Noduli in jungen Arbeiterinnen sichtbar. Die Zunahme an Noduli erfolgt exponentiell und erreicht die Plateauphase nach etwa 5-6 Stunden p.i. bei 90 Noduli pro Biene im Mittel.

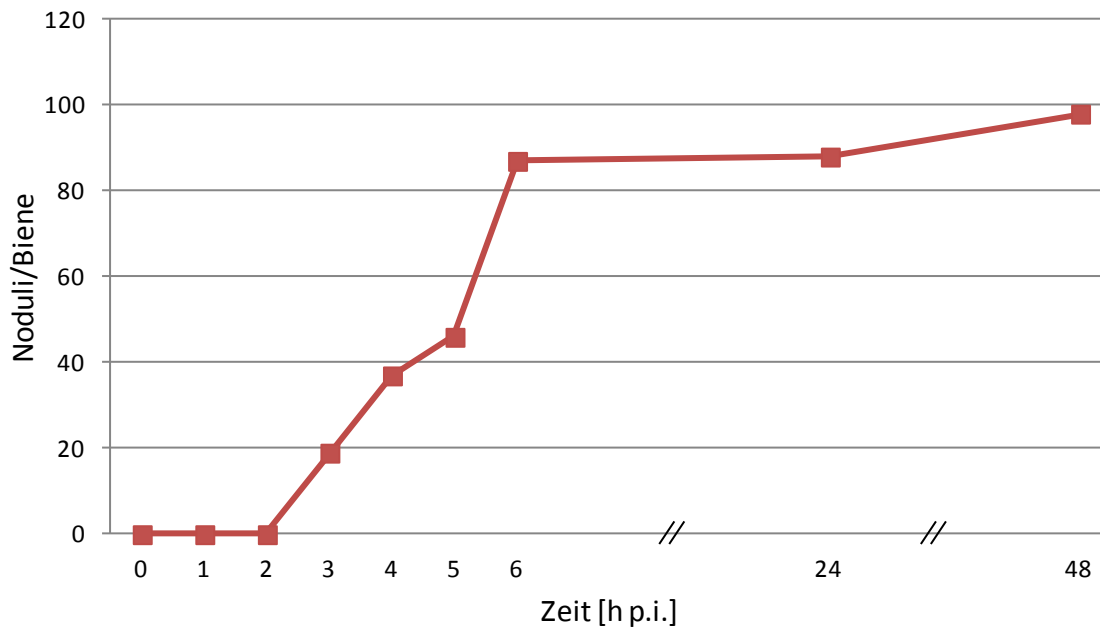


Abb. 69: Nodulationsreaktion von frisch geschlüpften Arbeiterinnen nach einer Infektion mit *E.coli* ( $10^5$  Z). Die Noduli wurden unter dem Binokular nach dem Entfernen der dorsalen Tergite gezählt.

Es wurden auch Nodulationsversuche mit frisch geschlüpften Arbeiterinnen nach Infektion mit *Micrococcus flavus* durchgeführt. Bei keinem dieser Versuche konnten Noduli 6 und 24 Stunden nach einer Infektion mit dem Gram<sup>+</sup> Bakterium *Micrococcus flavus* beobachtet werden. In den Positivkontrollen mit einer *E.coli* Infektion waren nach 6 und 24h Stunden immer Noduli zu sehen.



Abb. 70: Nodulationsreaktionen von Flugbienen. Flugbienen (Nektar- und Pollensammlerinnen), die gerade von einem Flug zum Stock zurückkehrten, wurden am Stockeingang gefangen. Aufnahmen erfolgten 24 h p.i. *E.coli* ( $10^5$  Z).

### 4.6.3 Abwesenheit von Nodulationsreaktionen bei Winterbienen

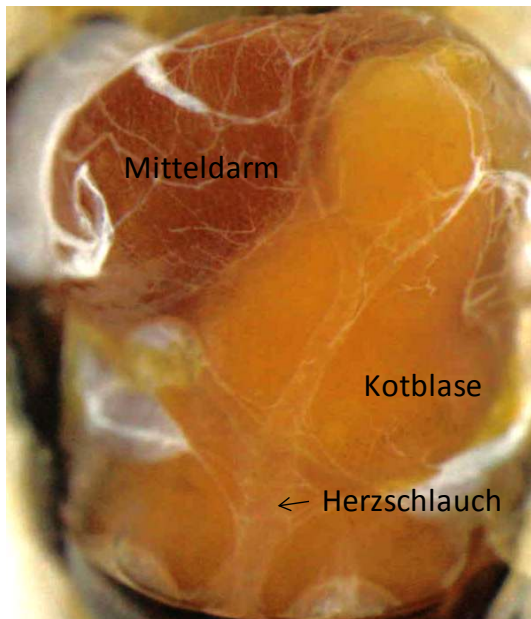


Abb. 71: Winterbiene 24h nach einer Infektion mit  $10^5$  *E.coli* Zellen.

Während des Zeitraumes von Oktober bis Februar sind in den langlebigen Winterbienen zu keinem Zeitpunkt nach einer *E.coli* Infektion Noduli zu finden. Dazu wurden jeweils 6 und 24 Stunden nach der Infektion Arbeiterinnen präpariert. Zu diesen Zeitpunkten nach einer Infektion mit *E.coli* ist bei jungen Arbeiterinnen die höchste Anzahl an Noduli zu beobachten (Abb. 69). Um das Ergebnis, dass Winterbienen keine Noduli nach *E.coli* Infektion bilden zu bestätigen, wurde dieser Versuch in drei aufeinander folgenden Jahren mit unterschiedlichen Versuchsvölkern, die an drei verschiedenen Standorten standen, jeweils im November, Dezember, Januar und Februar durchgeführt. Es wurden dazu Arbeiterinnen aus dem Stock abgesammelt. Zu Zeitpunkten an denen die Bienen aufgrund der außerhalb

herrschenden Temperaturen in der Wintertraube saßen wurden Bienen genommen, die sich in der äußeren Schicht der Wintertraube befanden, um das Volk nicht durch zu langes Öffnen des Stockes zusätzlichem Stress auszusetzen. Da die Bienen zu diesem Zeitpunkt sehr eng zusammen sind, musste dies vorsichtig geschehen, damit sie nicht verletzt wurden.

Um zu prüfen, ob es an bestimmten Zwischenschritten in der Eicosanoid-Biosynthese liegt, dass in alten Arbeiterinnen und in Winterbienen keine Noduli nach einer Infektion gefunden werden, wurde dies untersucht. Dazu wurden in Frage kommende Substanzen parallel zur *E.coli*-Lösung injiziert. Hier insbesondere die Arachidonsäure, die am Anfang der Eicosanoid-Biosynthese steht (Bedick et al., 2001; Stanley und Miller, 2006) (Abb. 72). Die *E.coli*-Lösung wurde immer seitlich links ins Abdomen der Biene injiziert und 1  $\mu$ l der jeweils anderen Substanz rechts.

Zunächst wurden an frisch geschlüpften Arbeiterinnen Vorversuche durchgeführt. So auch, ob sich die Trägersubstanz Ethanol sowohl negativ als auch positiv auf die Nodulation und das Überleben der Bienen nach der Injektion auswirkt. Dabei wurde festgestellt, dass weder die Nodulationsreaktion noch das Überleben der Arbeiterinnen durch die zusätzliche Ethanolgabe beeinträchtigt wird.

Es kam bei der zusätzlichen Gabe von Phenidone, Dexamethasone oder Arachidonsäure zu einer begleitenden flächigen, bräunlichen Färbung entlang des Herzschlauches. Die Überlebensrate ist nach Phenidone, Indomethacine und Dexamethasone zusätzlich zur *E.coli* Infektion auf 40-50% gesunken. Nach der Doppelinjektion von Arachidonsäure und *E.coli* liegt sie bei ca. 70%.



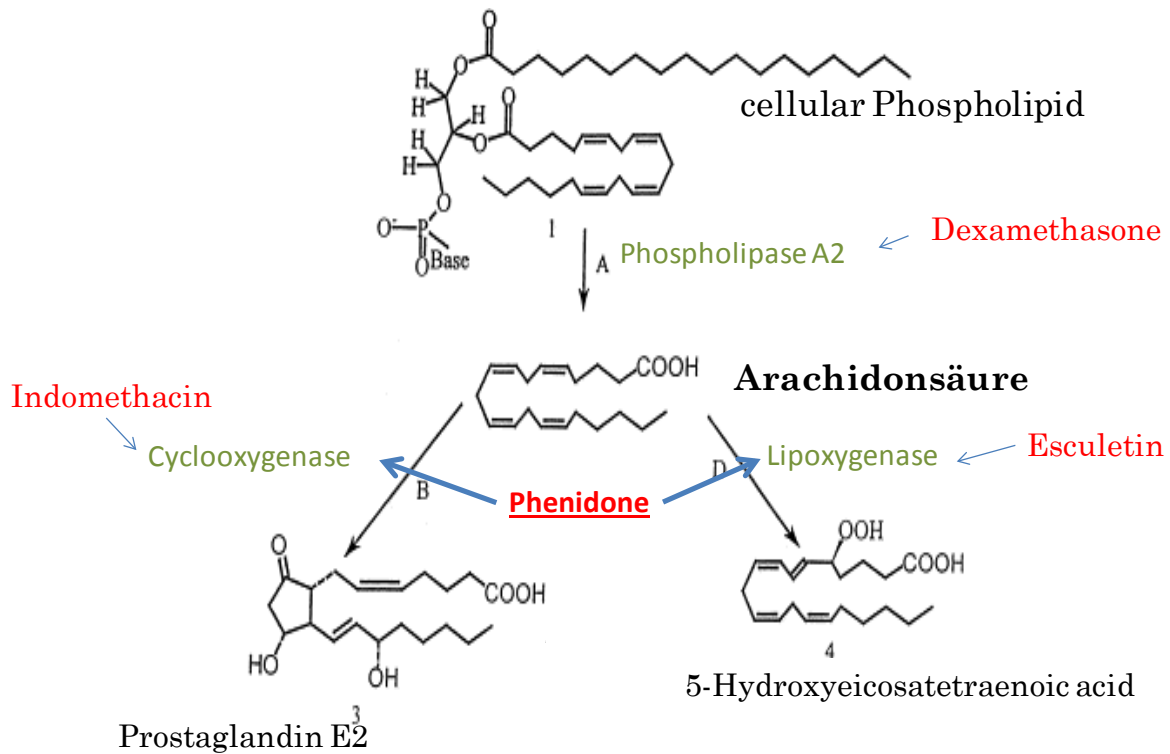


Abb. 72: Eicosanoid-Biosynthese. Die für die Eicosanoid-Biosynthese wichtigen Enzyme sind in grün dargestellt und hemmend wirkende Substanzen in rot (Bedick et al., 2001).

Nur nach L-DOPA Applikation ist die Überlebensrate mit ca. 90% mit der der einfachen *E.coli* Infektion, gleichzusetzen. L-DOPA steht zusammen mit dopachrome am Anfang der Melaninsynthese bei Insekten. Das L-DOPA wird durch eine Phenoloxidase zu dopachrome oxidiert. Dieses wird dann über quinone methide und DHI (5,6-dihydroxyindole) zu Melanin umgewandelt (Sugumaran et al., 1999). Um auszuschließen, dass es an fehlendem Substrat der Melaninsynthese liegt, dass keine Noduli in Winterbienen sichtbar sind, wurde L-DOPA eingesetzt. Aber L-DOPA hatte keinerlei Auswirkung auf die Nodulibildung. Weder war eine stärkere Färbung noch waren mehr Noduli als in der Kontrollgruppe zu beobachten.

Phenidone, das inhibierend wirken sollte, sowohl auf die Cyclooxygenase als auch auf die Lipoxygenase, zeigte kein einheitliches Bild in seiner Auswirkung auf die Anzahl der Noduli. So kam es bei den Versuchen zur Absenkung, Steigerung und zur selben Nodulianzahl im Vergleich mit der *E.coli*-Kontrollgruppe. Der Effekt von Dexamethasone (Inhibitor der Phospholipase A2) war leicht absenkend. Indomethacine (Inhibitor der Cyclooxygenase) hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die Nodulianzahl.

Die zusätzliche Injektion von Arachidonsäure führte durchaus zu einer leichten Steigerung der Anzahl der Noduli bei frisch geschlüpften Arbeiterinnen. Aber bei Winterbienen, die 24 h nach einer Infektion mit *E.coli* keine Noduli aufweisen, konnten auch mit der zusätzlichen Gabe von Arachidonsäure, die am Anfang der Eicosanoid-Biosynthese steht (Abb. 72), keine Noduli nachgewiesen werden.

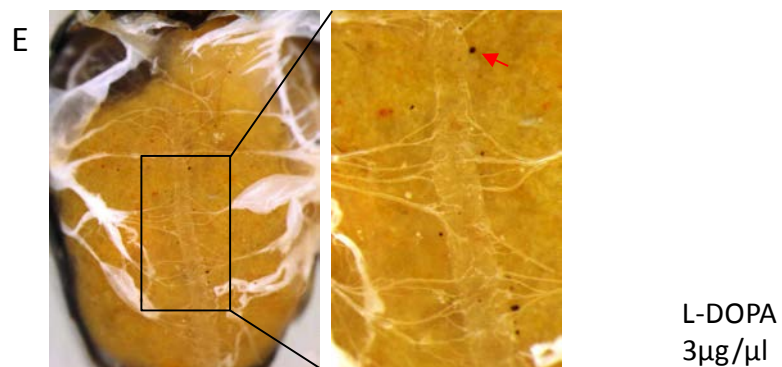
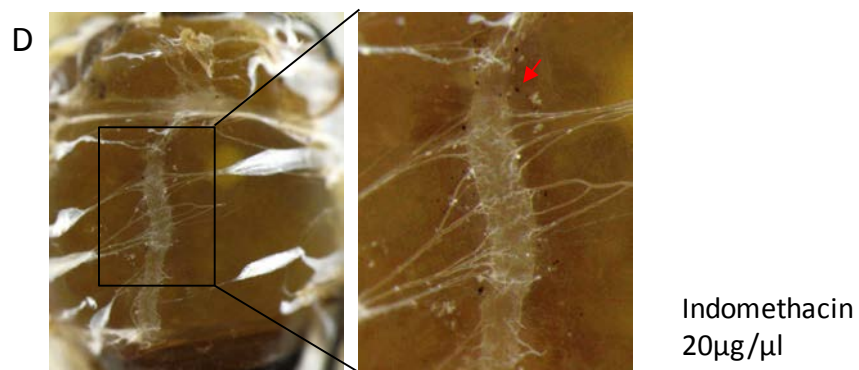
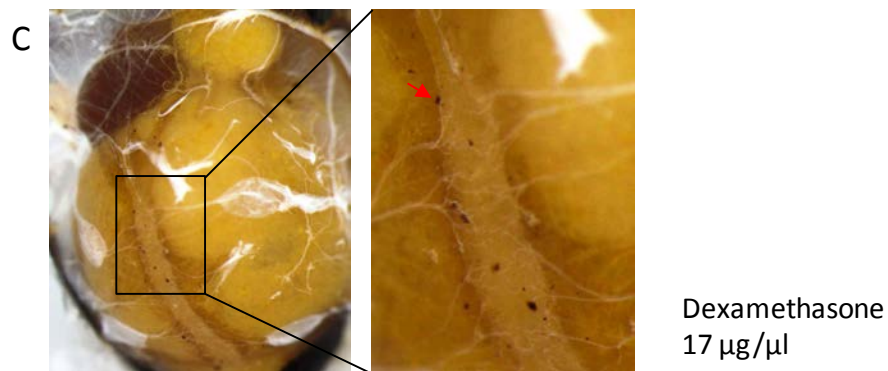
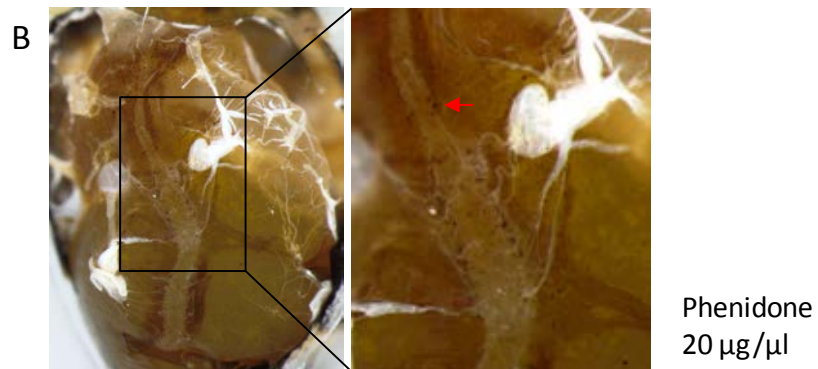
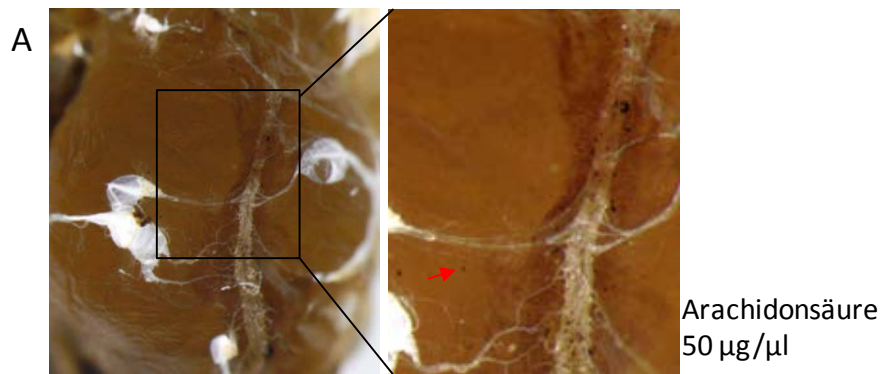


Abb. 73: Die Nodulibildung bei gleichzeitiger Injektion von *E.coli* und einer Substanz, die in die Eicosanoid - Biosynthese eingreift. Die Bilder wurden 24 h p.i. *E.coli* +  
A) Arachidonsäure,  
B) Phenidone,  
C) Dexamethasone,  
D) Indomethacin oder  
E) L-DOPA gemacht. Noduli sind durch roten Pfeil gekennzeichnet.

## 4.6.4 Nodulationsreaktionen von adulten Drohnen

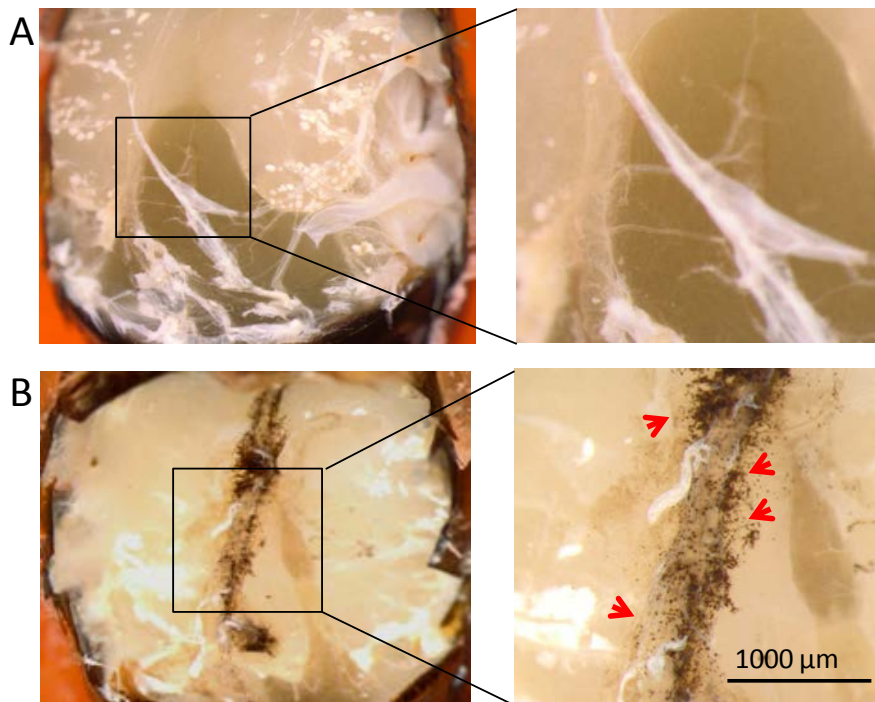


Abb. 74: Nodulationsreaktion von frisch geschlüpften adulten Drohnen  
A) nicht infizierter Drohn und B) 8h nach einer Infektion mit *E.coli* ( $10^5 Z$ ). Noduli sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.

Die Anzahl der Noduli bei frisch geschlüpften Drohnen ist mit im Mittel 1000 Noduli pro Drohne zehnmal höher als bei den Arbeiterinnen. Auch hier sind die Noduli hauptsächlich entlang des Herzschlauches zu finden. Sie sind deutlich kleiner als die Noduli der Arbeiterinnen.

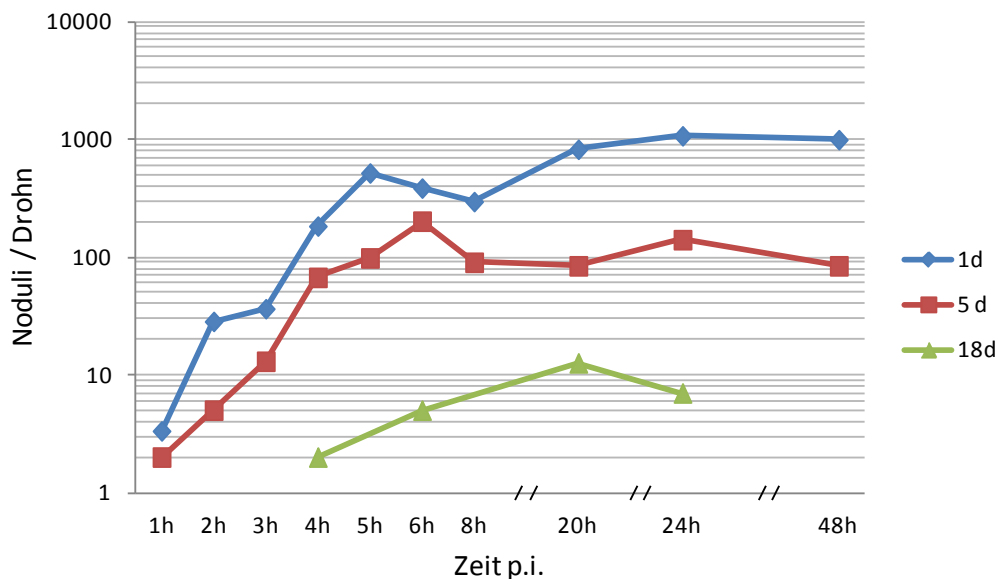


Abb. 75: Zeitlicher Verlauf der Zunahme an Noduli bei Drohnen unterschiedlichen Alters nach *E.coli* Infektion. Es wurde die Nodulation bei frisch geschlüpften Drohnen (1d) mit der von 5 und 18 Tage alten Drohnen verglichen.

Mit zunehmendem Alter der Drohnen lässt die Bildung von Noduli stark nach (Abb. 75), ähnlich wie bei den Arbeiterinnen, bei denen in Ammenbienen und Flugbienen nur noch rund 10% der Noduli von frisch geschlüpften zu finden sind (Abb. 70). Die Plateauphase ist

bei frisch geschlüpften Drohnen bei circa 1000 Noduli pro Drohne, bei fünf Tage alten nur noch bei 100 und bei 18 Tage alten Drohnen (Abb. 77) sind es gerade noch 10 Noduli pro Drohne. Aber der Test auf Abnahme an Koloniebildenden Einheiten, die nach bestimmten Zeitpunkten nach einer Infektion mit *E.coli* in der Haemolymphe von Drohnen unterschiedlichen Alters gefunden wurden, zeigt aber dass es dabei keine signifikante altersabhängigen Varianz gibt (Abb. 50A).

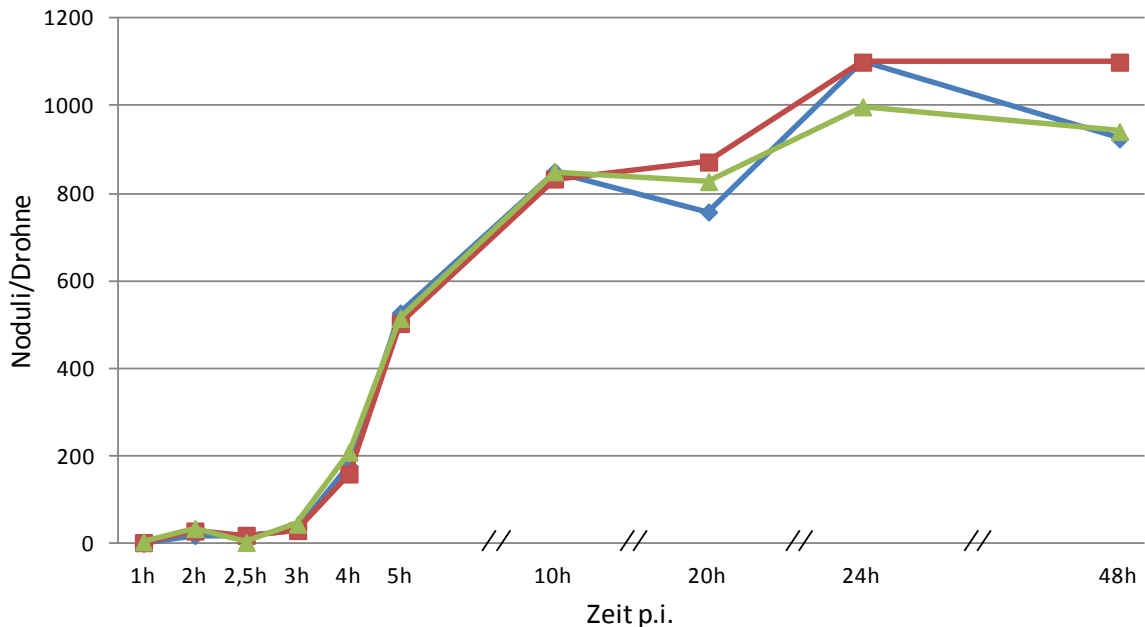


Abb. 76: Zeitlicher Verlauf der Zunahme an Noduli pro Drohne (1d) von drei unabhängigen Untersuchungsreihen. ■ I (siehe auch Abb. 78), ▲ II und ◆ III

Die Plateauphase liegt zwischen 900 und 1100 Noduli pro Drohne. Nach 2,5 Stunden tauchen bei Drohnen die ersten Noduli auf mit einem Median von 13 Noduli pro Drohne (N=117). Hier konnte aber beobachtet werden, dass es Drohnen gab die noch keine Noduli gebildet hatten und auf der anderen Seite vereinzelt Drohnen bei denen schon über 200 Noduli vorhanden waren zu diesem Zeitpunkt.

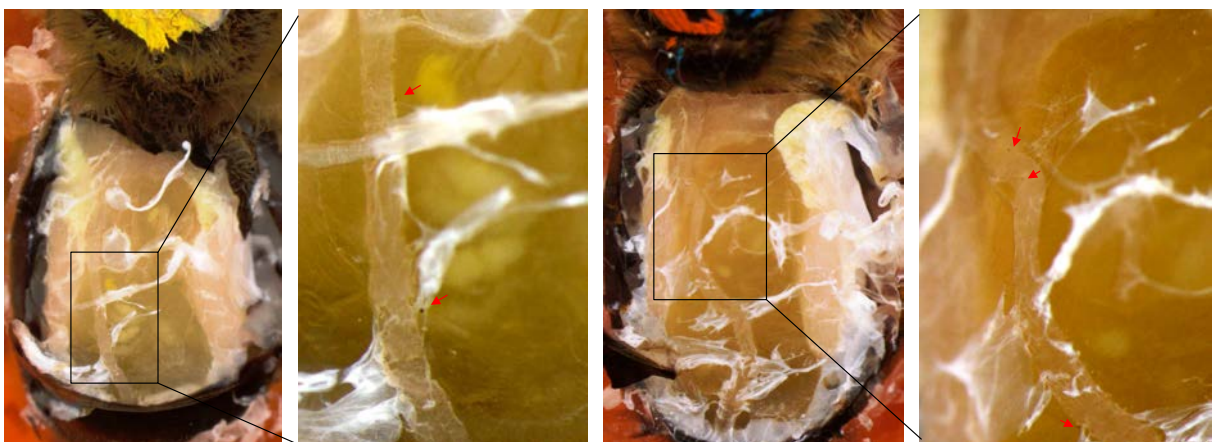


Abb. 77: Nodulationsreaktionen von 18 d alten Drohnen. Drohnen aus zwei unabhängigen Versuchsreihen erkennbar an der gelben und orange/blauen Markierung 24 h p.i.  $10^5$  *E.coli* Zellen. Noduli sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.

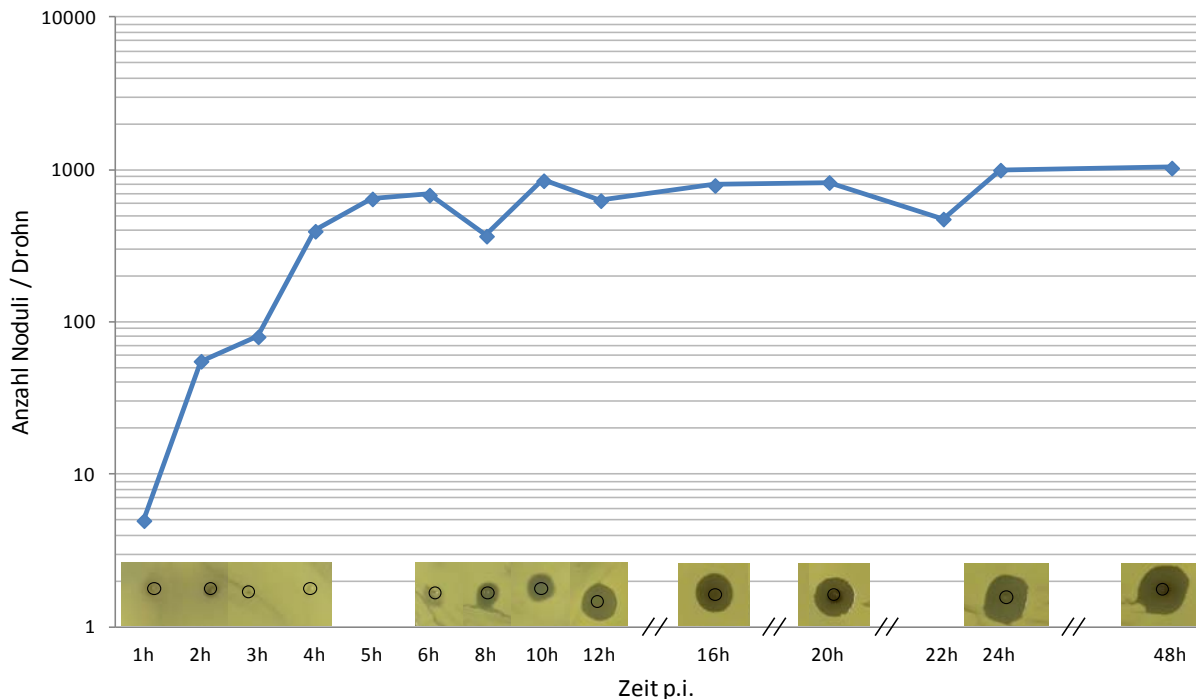


Abb. 78: Zeitlicher Verlauf der Zunahme an Noduli im Vergleich zur Zunahme an antibakterieller Aktivität in der Haemolymph von frisch geschlüpften Drohnen nach *E.coli* Infektion (siehe auch Untersuchungsreihe I, Abb. 76). Beim Hemmhoftest diente als Indikatorbakterium *Micrococcus flavus* (Gram<sup>+</sup>).

Nach einer Infektion mit  $10^5$  *E.coli* Zellen wurde bei je 5 frisch geschlüpften Drohnen pro Zeitwert nach Noduli geschaut und gleichzeitig die Haemolymph entnommen. Bei Drohnen ist dies möglich, da bei ihnen die Haemolymph über eine Wunde am vordersten Beinpaar entnommen wird und zur Präparation der Noduli sowieso die Beine des Drohnes entfernt werden müssen. Zwischen 8 und 10 Stunden nach Infektion wird die Plateauphase der Anzahl an Noduli pro Drohne erreicht. Beim Hemmhoftest auf die Antibakterielle Wirkung der Bestandteile der Haemolymph der Drohnen nach einer Infektion ist erst nach 8 Stunden ein Hemmhof zu sehen. Während das zelluläre Immunsystem schon nach 2-3 Stunden p.i. sichtbar aktiv die Bakterien bekämpft, ist dies beim humoralen Immunsystem insbesondere bei den antimikrobiellen Peptiden erst 5-6 Stunden später der Fall (siehe auch Abb. 44).

Tabelle 21: Nodulibildung nach *E.coli* Infektion bei adulten Arbeiterinnen und Drohnen

| <i>E.coli</i> 24 h p.i.   | Noduli      |          |
|---------------------------|-------------|----------|
| Arbeiterin (1 d)          | 90 ± 68,3   | (N = 59) |
| Ammenbiene                | 6,1 ± 5,1   | (N = 16) |
| Flugbiene                 | 8,9 ± 10,2  | (N = 21) |
| Winterbiene               | 0 ± 0       | (N = 20) |
| Drohnen (1 d)             | 998 ± 228   | (N = 10) |
| Drohnen (5 d)             | 98,7 ± 48,9 | (N = 14) |
| Drohnen (18 d)            | 9,4 ± 9,8   | (N = 7)  |
| <i>M.flavus</i> 24 h p.i. |             |          |
| Arbeiterin (1 d)          | 0 ± 0       | (N=18)   |

#### 4.6.5 Vergleich der Nodulationsreaktion von Arbeiterinnen und Drohnen

Zelluläre Immunreaktionen sind nach einer Infektion als erste aktiv. Nach etwa 4-6 Stunden erreicht die Anzahl an Noduli in einer Biene den Höchststand. Die Plateauphase hält auch 48h nach Infektion noch an. Drohnen haben zwischen 1000 und 1100 und bei den Arbeiterinnen sind es um die 100 Noduli pro Biene nach einer Infektion mit *E.coli* ( $10^5$  Z).

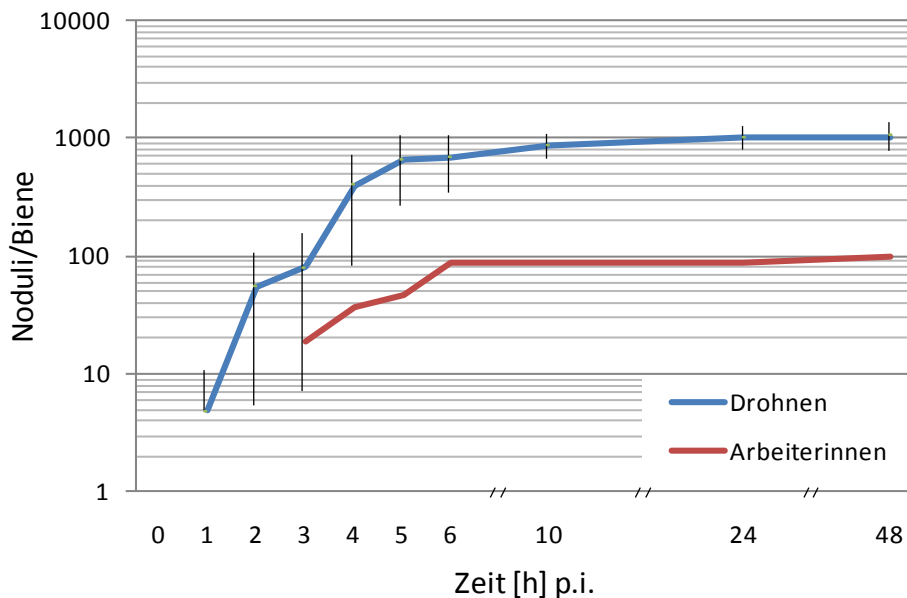


Abb. 79: Anzahl an Noduli pro Biene zu bestimmten Zeitpunkten nach einer bakteriellen Infektion. Bei der blauen Zeitreihe für die Drohnen wurde zusätzlich die Standardabweichung zu den jeweiligen Zeitpunkten angegeben.

Es wurde festgestellt, dass sich die Mittelwerte der Durchmesser mit einem P-Wert von  $>0.0001$  hochsignifikant voneinander unterscheiden. (siehe 8.2) Der Mittelwert der Durchmesser der Noduli von Arbeiterinnen ist  $20,26 \mu\text{m}$ , von Drohnen  $13,38 \mu\text{m}$  und von Königinnen  $15,41 \mu\text{m}$ . Somit sind die Noduli der Drohnen signifikant am kleinsten und die der Arbeiterinnen am größten. Das Mittel der Durchmesser der Noduli von Königinnen liegt dazwischen, unterscheidet sich aber auch jeweils höchst signifikant zu denen der Arbeiterinnen und Drohnen (Abb. 80).

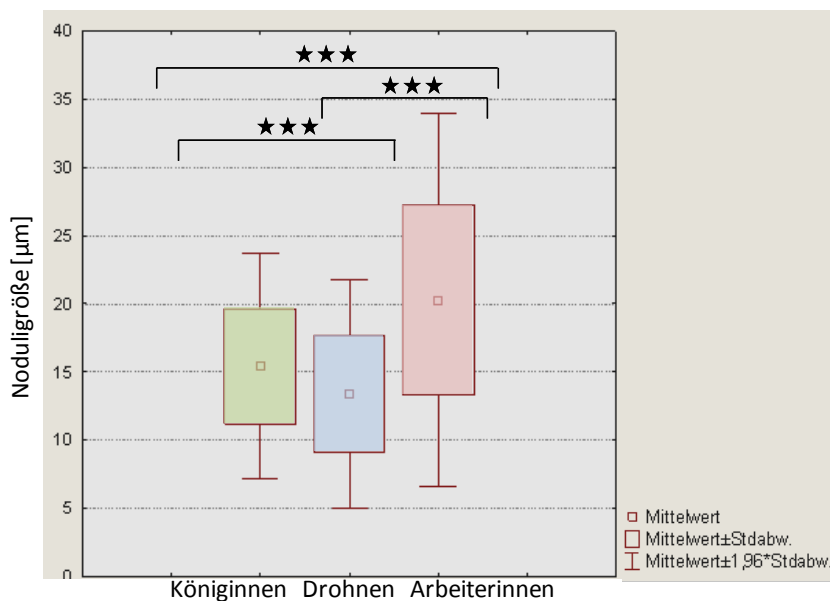


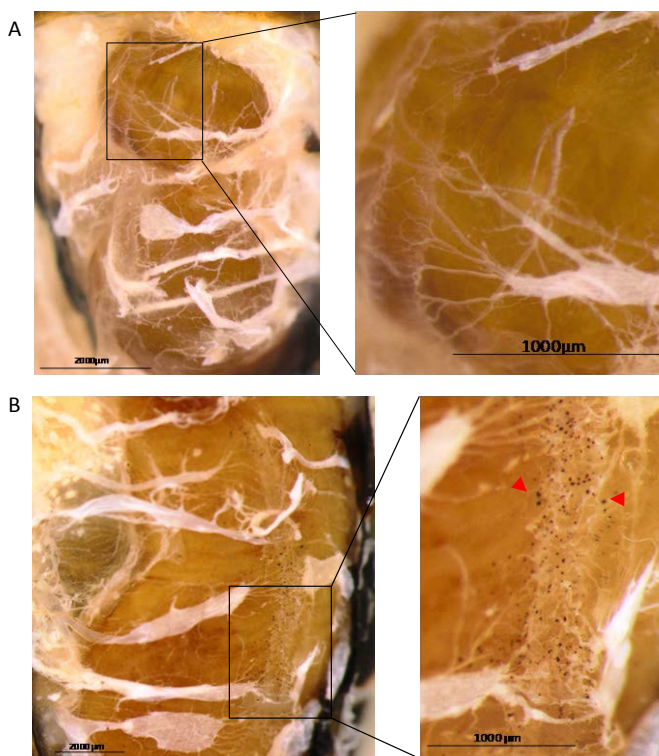
Abb. 80: Box-Whisker-Plot zur Größe von Noduli bei Königinnen, Arbeiterinnen und Drohnen der Honigbiene.

#### 4.6.6 Nodulationsreaktionen von Königinnen

**Tabelle 22: Nodulation 24 h nach einer *E.coli* Infektion bei Königinnen unterschiedlichen Alters.**

| Alter der Königin | Noduli  |
|-------------------|---------|
| frisch geschlüpft | 300-400 |
| 2-3 Wochen alt    | 100-200 |
| 1 Jahr            | ~ 50    |
| 2 Jahre           | ~20     |
| 3 Jahre           | ~5      |

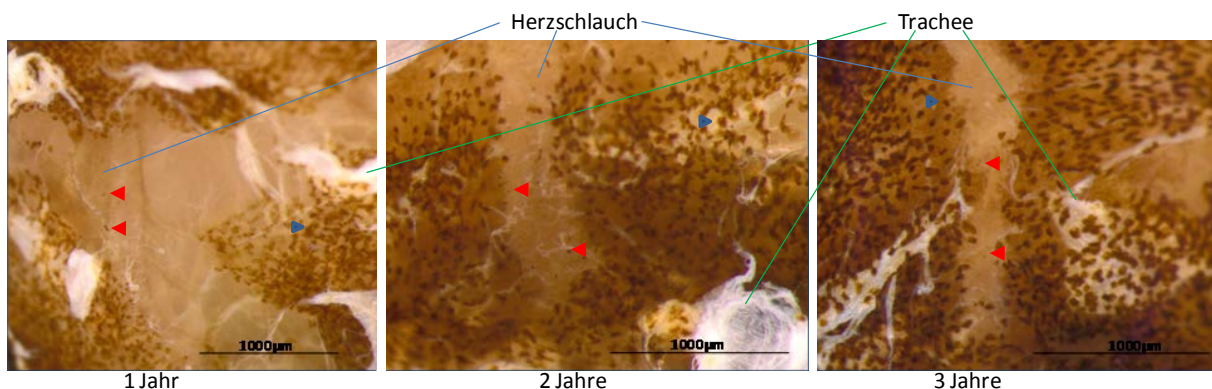
Bei jungen Königinnen (zwischen 1 d und 3 w) sind die meisten Noduli nach einer *E.coli* Infektion zu beobachten. Mit zunehmendem Alter nimmt die Nodulibildung nach einer Infektion ab. Der Fettkörper wird immer dunkler und nimmt an Volumen zu je älter die Königin wird. Dennoch sind die Noduli aufgrund ihrer Schwarzfärbung und geringeren Größe von den bräunlichen Fettkörperzellen unter dem Binokular zu unterscheiden.



Die Noduli sind auch bei Königinnen vorwiegend entlang des Herzschlauches zu finden, was bei frisch geschlüpften bis 3 Wochen alten Königinnen besonders gut zu sehen ist (Abb. 81), da ihr Fettkörper nicht so stark ausgeprägt und die Fettkörperzellen noch nicht so dunkel sind, wie bei ein bis drei Jahre alten Königinnen (Abb. 82).

Die ersten Noduli sind bei Königinnen (1 d bis 3 w) schon 3 h nach der Infektion mit *E.coli* zu beobachten.

**Abb. 81: Nodulation bei Königinnen A) Nicht infizierte junge Königin B) 24 h nach einer Infektion mit *E.coli*. Die Noduli sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.**



**Abb. 82: Ein, zwei und drei Jahre alte Königinnen. Eine Fettkörperzelle ist exemplarisch durch blauen Pfeil gekennzeichnet. Noduli sind durch rote Pfeile kenntlich gemacht.**

#### 4.7 Nosema als Cofaktor bei einer bakteriellen Infektion

Die Nosemose ist eine Darmerkrankung der Honigbiene, die durch das Mikrosporidium *Nosema apis* oder *Nosema ceranae* hervorgerufen wird. *Nosema apis* und *Nosema ceranae* sind Lichtmikroskopisch nicht zu unterscheiden sondern nur mit molekularbiologischen Methoden. Bei der hier verwendeten Infektionslösung handelte es sich um eine reine *Nosema ceranae* Lösung, die zusammen mit einer Zuckerlösung an 6 Tage alte Arbeiterinnen verfüttert wurde. Damit sich die Nosemainfektion in den Bienen entwickeln konnte, wurden diese noch einige Tage mit einer reinen Zuckerlösung weiter gefüttert. Etwa 4 Tage nach der Infektion wurden zur Kontrolle die Därme von einigen Arbeiterinnen auf Nosema getestet.

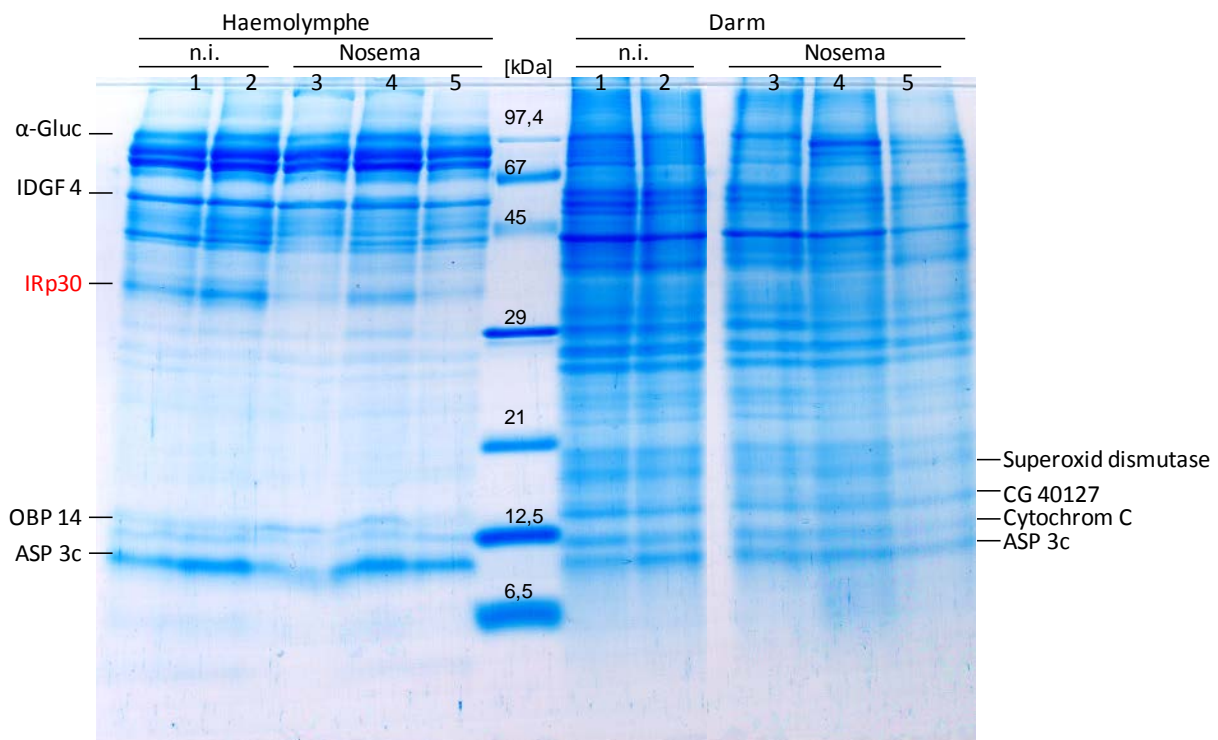


Abb. 83: Nosemainfektion bei 15 Tage alten Arbeiterinnen. Es wurden Haemolymphproben von nicht infizierten und mit Nosemasporen künstlich infizierten Arbeiterinnen auf ein 15 % PAA/0,1 % SDS Gel aufgetragen und mit Coomassie Blau G250 gefärbt. Zusätzlich wurden von den gleichen Bienen die Därme entnommen und eine Suspension davon auf das Gel aufgetragen.  $\alpha$ -Gluc =  $\alpha$ -Glucosidase; ASP = Antennen spezifische Protein; OBP = Odorant binding protein; IDGF= imaginal disc growth factor; IRp30 = Immun responsive protein 30.

In der Haemolymphe der Nosema infizierten Arbeiterinnen sind keine auffällig hochregulierten Proteinbanden zu beobachten (Abb. 83). Auch in den Darmproben der Arbeiterinnen ist kein Unterschied zwischen den Bienen mit Nosemainfektion und ohne Infektion zu erkennen. Um sicherzustellen, dass die Arbeiterinnen nicht infiziert bzw. mit Nosema infiziert sind, wurde der Darminhalt von allen verwendeten Arbeiterinnen auf Nosema lichtmikroskopisch getestet und der Befall abgeschätzt. Die Arbeiterinnen, denen keine Nosemasporen gefüttert worden sind, wiesen keine Nosemainfektion auf. Der Befall der mit Nosemasporen gefütterten Arbeiterinnen wurde als stark eingestuft.



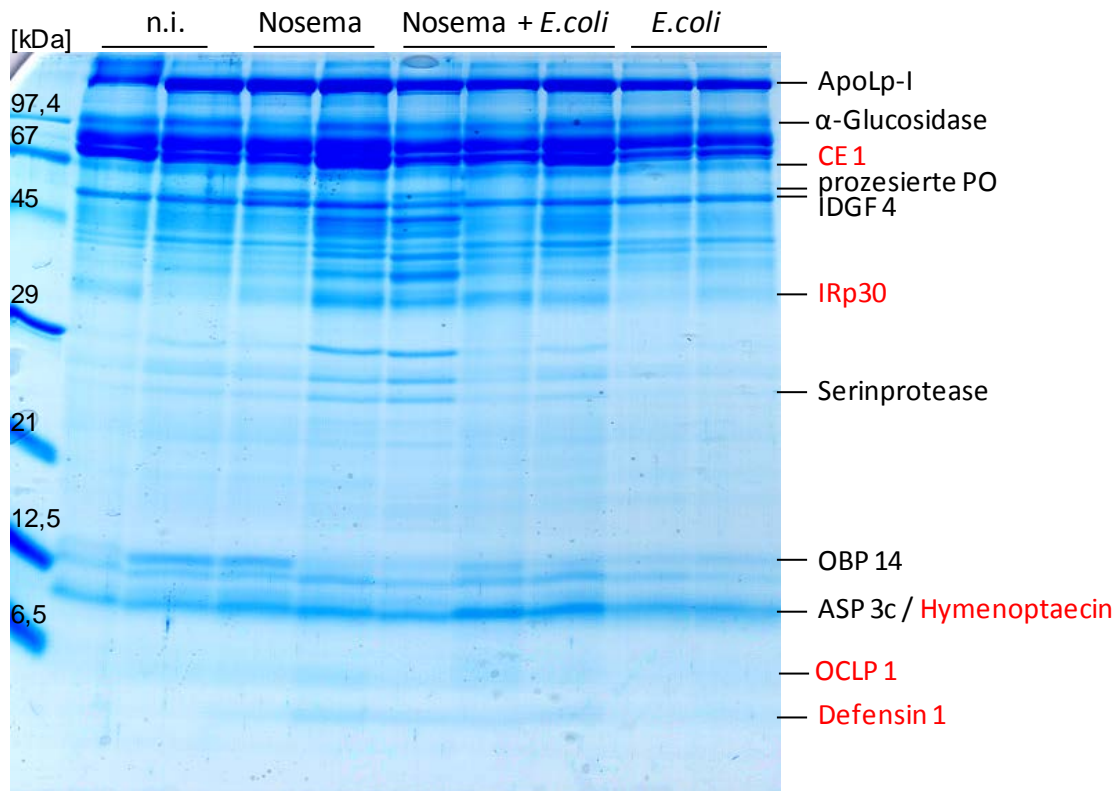


Abb. 84: Simultane Infektion mit *Nosema* und *E.coli* bei 15 Tage alten Arbeiterinnen. Aliquote der Haemolymphproben wurden auf ein 15% PAA/0,1% SDS Gel aufgetragen und mit Coomassie Blau G250 angefärbt. Die Haemolymphe wurde 24 Stunden nach der Infektion mit *E.coli* entnommen. CE = Carboxylesterase; PO = Phenoloxidase. Serinprotease → Serin Protease CG5255 (chymotrypsin 1) (gi|480951599 und Serin Protease CG16996 (trypsin 1) (gi|110762227).

Bei Arbeiterinnen mit Nosemainfektion ist die prozessierte Form der Phenoloxidase in der Haemolymphe zu beobachten (Abb. 84). Zudem sind einige Proteine im Bereich zwischen 45 kDa und etwa 25 kDa hochreguliert. Bei der Doppelinfektion mit *Nosema* und *E.coli* wird IRp30 hochreguliert, das aber auch schon in den nicht infizierten in geringen Mengen vorhanden war. Dies kann vermutlich auf das Alter der verwendeten Arbeiterinnen zurückgeführt werden. Außerdem wird bei der Doppelinfektion Defensin 1 besonders stark exprimiert im Vergleich zur einfachen *E.coli* Infektion. Auch OCLP 1 wird nach der Doppelinfektion in höherem Maße hochreguliert. Bei der Infektion mit *Nosema* und *E.coli* ist ein leichter Anstieg an Hymenoptaecin zu beobachten, der nach einer einfachen Infektion mit *E.coli* nicht so stark ist.

Bei einigen Bienen wurde zusätzlich noch ein Befall mit der Varroamilbe beobachtet. Die Haemolymphe dieser Arbeiterinnen wurde extra untersucht ob es hierdurch zu einer weiteren Hochregulation von Proteinen kam. Weder nach einfachem Varroabefall noch nach einem Befall mit *Varroa*, *Nosema* und *E.coli* zugleich konnte eine Hochregulierung einzelner Proteine beobachtet werden (Gele nicht gezeigt).

#### 4.8 Glucosekonzentration in der Haemolymphe von der Honigbiene

Da eine Infektion eine große Herausforderung für den Stoffwechsel eines Organismus ist, wurde die Haemolymphe-Zucker-Konzentration bei nicht infizierten Bienen und nach *E.coli* Infektion untersucht.

Tabelle 23: Haemolymphezuckergehalt bei nicht infizierten Bienen und nach *E.coli* Infektion. Die Werte von je 5 Bienen aus drei unabhängigen Messreihen wurden gemittelt.

| Zeitpunkt Entnahme [h p.i.]                 | 0     | 2     | 6   | 8    | 18   | 24    | 30    | 48    |
|---|-------|-------|-----|------|------|-------|-------|-------|
| n.i. [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]          | 12,61 | 10,12 | 8,6 | 6,08 | 6,72 | 10,48 | 16,84 | 11,56 |
| <i>E.coli</i> [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] |       | 7,1   | 3,1 | 6,48 | 7,2  | 6,52  | 8,72  | 9,32  |

Die Glucosewerte von Arbeiterinnen nach einer Infektion sind bei fast allen Zeitwerten niedriger als die ohne Infektion. Nur der 8 und der 18 Stundenwert liegen etwas über demjenigen der nicht infizierten Bienen (Tabelle 23). Der 18 Stundenwert liegt auch bei einer Infektion mit *M.flavus* über dem Wert der nicht infizierten Bienen (Abb. 85).

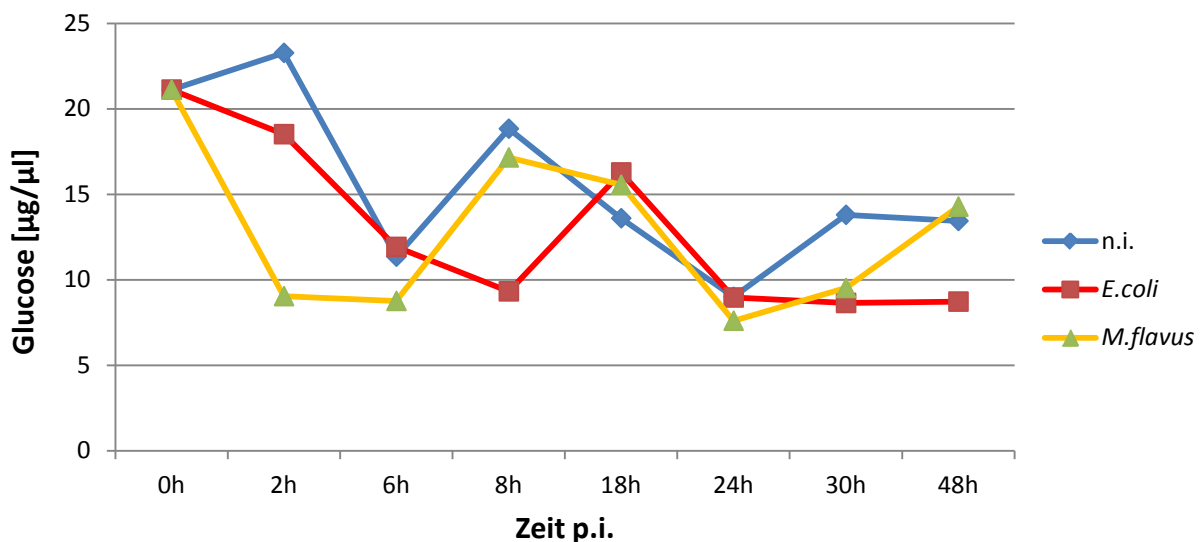


Abb. 85: Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Glucosekonzentration in der Haemolymphe nicht infizierter und mit *E.coli* Infektion einer Messreihe. Die Messung erfolgte an je 5 Bienen pro Messwert und Versuchsgruppe.

Im Vergleich zwischen Arbeiterinnen und Drohnen zeigt sich, dass auch bei Drohnen die Haemolymphe-Zucker-Konzentration nach einer Infektion niedriger ist, als ohne (Tabelle 24).

|          |               | n.i. [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] | <i>E.coli</i> [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] |
|----------|---------------|------------------------------------|---|
| 24h p.i. | Arbeiterinnen | 9,74                               | 7,58  |
|          | Drohnen       | 9,73                               | 9,13  |
| 48h p.i. | Arbeiterinnen | 14,77                              | 9,11  |
|          | Drohnen       | 11,2                               | 6,8   |

Tabelle 24: Vergleich der Haemolymphezuckerkonzentration von Drohnen und Arbeiterinnen 24 und 48 h p.i.. Die Bienen sind alle aus einem Volk und wurden während des Versuches bei 30°C gehalten.

## 5. Diskussion

### 5.1 Strategien der Pathogenabwehr bei Honigbienen

Soziale Insekten wie die Honigbienen verbringen einen Großteil ihres Lebens in engem Kontakt mit anderen Individuen, die meist in einem engen Verwandtschaftsverhältnis zueinander stehen. Damit verbunden ist eine hohe Anfälligkeit gegenüber Pathogenen. Diese können durch die vielen Sozialkontakte leicht innerhalb einer Kolonie übertragen werden. Eine Vielzahl an Pathogenen wurde für die Honigbienen beschrieben. Darunter Viren (z.B. Akute Bienen Paralyse Virus (ABPV), Kashmir Bienen Virus (KBV)), Bakterien (z.B. Amerikanische Faulbrut), Pilze (z. B. Kalkbrut), Protozoen (Nosema) und die Varroamilbe.

Gegenüber Pathogenen haben Soziale Insekten eine Vielzahl an Abwehrstrategien entwickelt. Auf Ebene der Kolonie zählen dazu das Hygieneverhalten, das Beimischen von antimikrobiellen Substanzen zum Nestmaterial und die Erhöhung der genetischen Vielfalt durch die Mehrfachverpaarung der Königin (Viljakainen et al., 2009) um nur einige zu nennen. Bei den Wegameisen findet z.B. eine soziale Immunisierung gegen Pilze statt. Dies funktioniert so, dass kranke Ameisen besonders häufig von ihren Nestgenossinnen geputzt werden. Dadurch bekommen diese eine geringe Menge an Sporen ab, die nicht tödlich ist, und es wird eine Mikro-Infektion ausgelöst. Diese führt zur Hochregulation von Immungenen, die an der Pilzabwehr beteiligt sind, wodurch diese Ameisen gegen die Pilzinfektion geschützt sind (Konrad et al., 2012).

Auf der Ebene des Individuums wirkt bei Insekten das angeborene Immunsystem mit der humoralen Immunantwort, die durch Pathogene oder Pathogenbestandteile induziert wird und der zellulären Immunantwort, die konstitutiv vorhanden ist (s. Abb. 7).

Die drei Kasten der Honigbiene haben aufgrund ihrer unterschiedlichen Entwicklung (Abb. 2), teilweise auch wegen ihrer genetischen Ausstattung (Arbeiterinnen und Königin → diploid im Gegensatz zu den haploiden Drohnen), ihres Verhaltens und ihrer Morphologie unterschiedliche Voraussetzungen, um auf Pathogene zu reagieren. Bei den Arbeiterinnen waren schon Untersuchungen zur Immunabwehr durchgeführt worden (Evans et al., 2006; Randolt et al., 2008), aber bei den Drohnen war zu Beginn meiner Arbeit nichts bezüglich ihrer Immunantwort gegenüber Pathogenen bekannt. Durch die Einführung der Varroamilbe sind die Drohnen, beziehungsweise die Drohnenbrut bei der Gesundheit des Volkes in den Blickpunkt der Forschung und der Imker gerückt. Drohnenbrut wird achtmal häufiger parasitiert. So ist eine der Komponenten der Varroabekämpfung die mehrfache Entnahme von Drohnenbrut. Durch die vermehrte Parasitierung der Drohnenbrut sind die Drohnen natürlich auch den durch die Milbe übertragenen Krankheitserregern stärker ausgesetzt. Es wird davon ausgegangen, dass einige dieser Krankheitserreger wie das Deformed Wing Virus (DWV) durch das Zusammenspiel mit der Varroamilbe virulenter wurden (Genersch und Aubert, 2010) und somit eine größere Gefahr für das Bienenvolk sind.

Die Immunkompetenz von Drohnen ist von großer Bedeutung, da sie einen wichtigen Beitrag zur Fortpflanzung des Bienenvolkes leisten. In dieser Arbeit wurde nun die Immunantwort

von Drohnen aller Entwicklungsstadien und verschiedenen adulten Alters auf bakterielle Infektionen mit dem gram<sup>-</sup> Bakterium *E.coli* untersucht. Desweiteren wurden auch andere Elizitoren eingesetzt. Es wurden sowohl Untersuchungen zum humoralen als auch zellulären Immunsystem von Drohnen durchgeführt und dabei festgestellt, dass Drohnen eine stark ausgeprägte Immunkompetenz besitzen. Dies wird im Folgenden ausführlich diskutiert.

## 5.2 Drohnenlarven

### 5.2.1 In vitro Aufzucht von Drohnenlarven

Drohnenlarven werden in den ersten drei Tagen mit milchig weißem Larvenfutter von den Ammenbienen gefüttert und das Futter für die älteren Drohnenlarven ist schmutzig gelbbraun im Erscheinungsbild, vermutlich aufgrund der Zugabe von Honig und Pollen. Das Futter älterer Larven enthält weniger Protein und Fett, aber mehr Kohlenhydrate als das Futter jüngerer Larven (Hrassnigg und Crailsheim, 2005). Das Arbeiterinnenfutter wird im Vergleich zu dem von Königinnen im larvalen Alter von 84 Stunden (3,5 Tage) geändert und bei Drohnen erst nach 108 Stunden (4,5 Tage) (Brouwers, 1987). Dies ist höchstwahrscheinlich der Tatsache geschuldet, dass die Drohnenentwicklung im Vergleich zu Arbeiterinnen länger ist (Jay, 1963). Diese Änderung im Larvenfutter der Drohnen erfolgt zu einem Zeitpunkt, der dem 5. Tag der Larvalentwicklung den wir gewählt haben, um das Larvenfutter der Drohnenlarven zu ändern, sehr nahekommt. Die positive Entwicklung der Drohnenlarven (Absenkung der Todesrate und bessere Gesichtszunahme) nach der Umstellung auf den Wechsel zwischen den beiden Futterzusammensetzungen spricht dafür, dass dies nötig ist und auch die richtige Futterzusammensetzung gewählt wurde.

In diesem Zusammenhang muss für die Futterzusammensetzung von Larvenfutter erwähnt werden, dass sich das Gelée Royal von *Apis cerana* und *Apis mellifera* in der Zusammensetzung unterscheidet (Yu et al., 2010). Daher muss sichergestellt sein, dass für eine gelungene *in vitro* Aufzucht das adäquate Gelée Royal verwendet wird, damit die Larven optimal wachsen können.

Der Vergleich der Gewichtszunahme von Arbeiterinnenlarven und Drohnenlarven zeigt, dass die Arbeiterinnenlarven schneller an Gewicht zulegen als die Drohnenlarven (Abb. 86) Da die Entwicklung der Drohnenlarven 4 Tage länger dauert, brauchen sie in den ersten 5 Tagen nicht so schnell an Gewicht zuzulegen wie die Arbeiterinnenlarven, die schon ab Tag 6 nach dem Schlupf in die Vorpuppenphase übergehen und die Nahrungsaufnahme einstellen bzw. nicht mehr gefüttert werden, da ihre Zellen verdeckelt werden.

Es ist mir nun gelungen, die Aufzuchtbedingungen so zu etablieren, dass die Entwicklung der Drohnenlarven ebenso wie die der Arbeiterinnen ohne große Sprünge und Abweichungen bei allen Aufzuchtreihen von Drohnenlarven reproduzierbar funktionierte (Abb. 22). Die Aufzucht bis zum Adulttier wurde vor allem zur Kontrolle der Qualität der Larvenaufzucht durchgeführt. Dabei dauerte die Aufzucht der Drohnen einen Tag länger als die durchschnittliche Dauer im Volk. Allerdings ist dies auch nur ein Richtwert. Es kommt schon durch Temperaturänderungen während der Puppenaufzucht zu großen Unterschieden.

Beträgt die Temperatur während der Puppenaufzucht 32°C, so dauert die Puppenphase 12-15 Tage und bei 34.5°C nur 10-11 Tage (Groh et al., 2004).

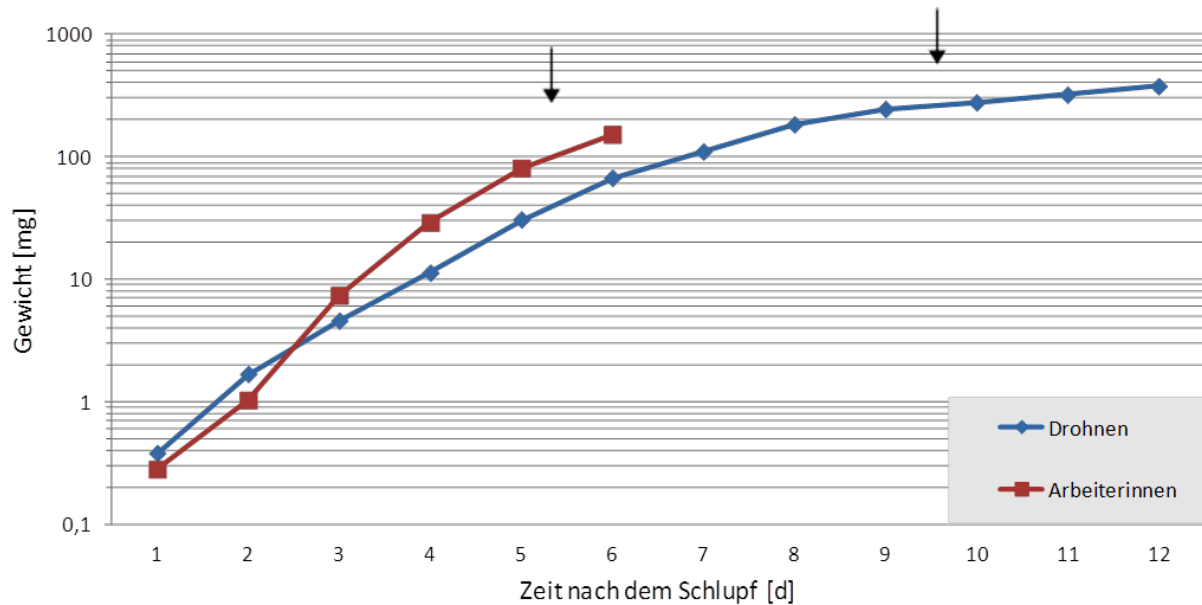


Abb. 86: Gewichtszunahme von *in vitro* aufgezogenen Drohnen- und Arbeiterinnenlarven. Drohnergewichte sind Durchschnittswerte aus den Aufzuchtreihen 2008, 2010/1 und 2010/2. Die Pfeile markieren den Beginn der Vorpuppe bei den Arbeiterinnen und den Drohnen.

Einige geschlüpfte Drohnen wiesen motorische Störungen und Verkrüppelungen auf. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass sie während der Puppenphase nicht optimal ausgerichtet wie in der Zelle lagen. Die gesamte Aufzucht wurde in 24-Näpfcchen-Platten durchgeführt, die für die Puppenaufzucht nicht optimal geeignet sind, da sich die Larve im Vorpuppenstadium nicht wie in der Zelle in Richtung Zelldeckel aufrichten kann, sondern in irgendeiner Position liegt. Die Zellen im Volk sind mit einem Winkel von 13° nach oben ausgerichtet und haben bei Drohnenzellen einen Durchmesser von 6,2-6,4 mm (Winston, 1987). In diesen Zellen liegen alle Puppen auf der dorsalen Seite, auf der sich die Flügel entwickeln. Obwohl also weder der richtige Zelldurchmesser, noch die richtige Zellneigung gegeben war, entwickelten sich eine hohe Zahl an Puppen zu lebensfähigen adulten Drohnen.

Unter anderem wurde von Brodschneider et al. (2009) erfolgreich versucht Deformationen, die durch falsche Lage im Puppenstadium resultieren dadurch auszuschließen, dass die Larven in Königinnen-Näpfcchen in 48-Näpfcchen-Platten *in vitro* großgezogen wurden bis zum Streckmadenstadium. Danach wurden die Streckmaden vorsichtig in Position gebracht, eine sehr dünne Wachsschicht auf die 48-Näpfcchen-Platte, die vertikal aufgerichtet wurde, aufgebracht, so dass am Ende der Aufzucht die Bienen sich selbst freibeissen mussten.

### 5.2.2 Die Haemolymphe nicht infizierter Larven und ihre Besonderheiten

Nachdem die *in vitro* Aufzucht der Drohnenlarven etabliert war, konnte mit Infektionsversuchen an Drohnenlarven gestartet werden, da nun die genaue Zuordnung zum larvalen Entwicklungsalter der Drohnenlarven möglich war. Auch war somit sichergestellt, dass keine Infektionen im Vorfeld zu den Versuchen bestanden. Um einen Vergleich zu haben, wurde zuerst die Haemolymphe von nicht infizierten Drohnenlarven altersentsprechend untersucht. Nicht infizierte Larven dienten aber immer auch als Kontrolle, damit ausgeschlossen werden konnte, dass Infektionen vorhanden waren, die schon beim Absammeln der Larven von der Wabe bestanden hatten. Ein Bienenstock ist nie hundertprozentig Keimfrei auch wenn Propolis, Larvenfutter und Honig antibakterielle Wirkstoffe besitzen und noch andere Barrieren zum Schutz der Bienen auf physikalischer Ebene oder die Soziale Immunität auf der Verhaltensebene da sind.

Am auffälligsten ist, dass in der Haemolymphe der Larven Proteine, die Speicherfunktionen haben, überwiegen (Tabelle S1). Im Allgemeinen haben Larven von holometabolen Insekten, zu denen die Honigbiene zählt, einen hohen Anteil an Speicherproteinen in der Haemolymphe (Shipman et al., 1987). Von daher kann davon ausgegangen werden, dass der hohe Anteil an Speicherproteinen spezifisch für das larvale Entwicklungsstadium ist.

Am Anfang der Larvalentwicklung sind noch relativ wenige Proteine in der Haemolymphe exprimiert, wobei die MRJPs (Major Royal Jelly Proteine) in den ersten 3-5 Tagen stark vertreten sind (Abb. 24). Dies könnte zwar in den ersten 3 Tagen auf den Gesamtlarvenextrakt zurückzuführen sein, der verwendet wurde. Allerdings müssten sie in größeren Mengen als den gefundenen vorliegen, wenn die MRJPs von eventuellen Futterresten stammen würden und desweiteren müssten auch mehr MRJP-Banden vorhanden sein, da die MRJPs 90 % des Gelee Royals ausmachen, das von den Ammenbienen verfüttert wird (Albert und Kludiny, 2004). Dies ist nicht der Fall, also kann davon ausgegangen werden, dass es keine Verunreinigungen durch das Larvenfutter gab. Die MRJPs könnten nun aber vom Darminhalt sein. Dagegen spricht, dass auch bei 3 und 4 Tage alten Larven, von denen nur Haemolymphe verwendet wurde, nur die MRJPs 2 und 3, wie zuvor bei den 1 und 2 Tage alten Larven nach Gelelektrophoretischer Auftrennung sichtbar sind (Abb. 24, Abb. 25). Im Gelee Royal sind hingegen 7 MRJPs vorhanden von denen das MRJP 1 den größten Massenanteil hat (Schmitzová et al., 1998; Yu et al., 2010). Im SDS-Polyacrylamidgel sind die MRJPs 1, 2, 3 und 5 gut sichtbar, wobei MRJP 1 als sehr starke Bande erkennbar ist (Schmitzová et al., 1998). Hier wurden nur MRJP 2 und 3 eindeutig identifiziert. Aber beide Proteine wurden auf einer Höhe gefunden bei der die molekulare Masse geringer als erwartet ist. So hat MRJP 2 ohne Signalpeptid eine Masse von 49191 Dalton während es hier auf der Höhe von ca. 43000 Dalton gefunden wurde (Abb. 24, Abb. 25). Dies lässt vermuten, dass es sich bei den in der Haemolymphe von Larven gefundenen MRJPs um Abbauprodukte handeln könnte. Zudem liegen laut Schmitzová et al. (1998) alle MRJPs des Gelee Royal zwischen 49 und 87 kDa und somit höher als die hier gefundenen. Aber sie weisen auch darauf hin, dass Degradationsprodukte von MRJPs selbst im Gelee Royal vorhanden sind. Da es sich in dieser Arbeit aber um MRJPs handelt, die in der Haemolymphe gefunden worden

sind, könnten sie auch prozessiert worden sein. Zudem ist MRJP 3 ein hoch polymorphes Protein, das einen Größenpolymorphismus aufweist (Albert et al., 1999).

Das VHDL (Very High Density Lipoprotein), das etwa ab Tag 7 der Larvalentwicklung von Drohnenlarven in höheren Mengen auftaucht, konnte bei RNAi Versuchen mit VHDL dsRNA bei Arbeiterinnenlarven mit dem Larvenwachstum in Verbindung gebracht werden. Larven bei denen VHDL dsRNA zur Herunterregulierung von VHDL injiziert worden war, wuchsen langsamer als unbehandelte Arbeiterinnenlarven (Herter, 2010). Auch ist das VHDL in den ersten Tagen der Larvalentwicklung nicht vorhanden (Herter, 2010), wie dies auch bei den Drohnenlarven der Fall ist (Abb. 24, Abb. 25). Somit hat das späte Auftauchen von VHDL entwicklungspezifische Gründe und erfolgt bei Arbeiterinnen und Drohnen etwa in der gleichen Entwicklungsphase.

### 5.3 Drohnenlarven reagieren mit starker humoraler und schwacher zellulärer Immunantwort auf bakterielle Infektionen

Wie in Hemmhoftests gezeigt werden konnte, reagieren Drohnenlarven sensitiv auf Verletzungen und Infektionen. Aber 7 und 8 Tage alte Larven reagieren nicht mehr so stark auf Verletzungen wie dies 5 und 6 Tage alte Larven tun (Abb. 31). Wedenig et al. (2003) haben herausgefunden, dass 2-4 Tage alte Arbeiterinnenlarven das Wachstum von *Peanibacillus larvae* (AFB) hemmen können. Diese Fähigkeit wird ab Tag 5 der Entwicklung nach und nach reduziert. Sie gehen daher von einer altersabhängigen Resistenz gegen den Erreger der Amerikanischen Faulbrut bei Bienenlarven aus. Adulte Bienen sind völlig resistent gegen das Bakterium und nur bis zu zwei Tage alte Larven sind überhaupt anfällig für eine Infektion. Ältere Drohnenlarven reagierten auf eine Verletzung nicht mehr so stark oder gar nicht mehr. Wenn man nun immer von derselben Abwehrstrategie bei Bienenlarven gleich ob Arbeiterinnen oder Drohnen ausgeht, würde das bedeuten, dass die Immunabwehr geschwächt oder gar nicht mehr vorhanden ist. Aber bei einer Infektion mit *E.coli* kam es in keinem Alter zu einer Abnahme der Reaktion im Hemmhoftest oder bei der Bildung der antibakteriellen Peptide (AMPs). Dies konnte auch bei den Bestandteilen von Bakterienzellwänden LPS (Lipopolysaccharid) und PGN (Peptidoglycan) beobachtet werden. Somit ist die Immunantwort der Larven keineswegs geschwächt. Sie scheint nur gezielter auf potentiell pathogene Eindringlinge zu reagieren und nicht schon auf tendenziell harmlose Verletzungen (hier durch die Injektion von PBS vorgetäuscht), die durch einfache Wundverschlussreaktionen bekämpft werden können.

Nach einer Infektion mit Laminarin (Bestandteil von Pilzzellwänden) fällt der Hemmhof kleiner aus als nach PGN und LPS Applikation (Abb. 30). Das angeborene Immunsystem der Insekten kann zwischen bakteriellen und Pilzinfektionen unterscheiden (Engström, 1999, Lemaitre et al., 1997). Bakterien und Pilze werden durch unterschiedliche Moleküle erkannt und aktivieren somit verschiedene Signalkaskaden, die sich in ihren Produkten überlappen, aber dennoch nicht gleich sind (Engström, 1999). Nach einer Pilzinfektion wird nur der TOLL-Signalweg induziert während nach bakterieller Infektion sowohl der IMD/JNK, JAK/STAT als auch der TOLL-Signalweg aktiviert werden (Engström, 1999). Auf Grund dessen werden nach

einer Pilzinfektion viel weniger Proteine, die der Abwehr dienen, exprimiert als nach bakterieller Infektion. Infolgedessen sollte die Haemolymphe nach einer Infektion mit Laminarin auch weniger antibakteriell aktive Substanzen enthalten und somit der resultierende Hemmhof auch nicht so groß sein.

Ein weiterer Aspekt bei der Immunantwort nach Laminarin Injektion ist das ProPhenoloxidase aktivierende System.  $\beta$ 1,3-Glucan Recognition Proteine (GRPs) konnten in einigen Invertebraten gefunden werden, wie *Manduca sexta*, *Bombyx mori* aber auch ähnliche Proteine verschiedener Schabenarten stimulieren durch Bindung an  $\beta$ 1,3-Glucan die Aktivierung der Phenoloxidase durch die Interaktion mit einer Serinprotease (Ma und Kanost, 2000). Aber bei meinen Experimenten kam es nicht zu einer bräunlichen Verfärbung des Hemmhofes der Haemolympheproben der Larven denen Laminarin injiziert worden war. Diese Beobachtung spricht gegen eine Aktivierung des Prophenoloxidase aktivierenden Systems bei Drohnenlarven durch  $\beta$ 1,3-Glucan, da es durch eine erhöhte Konzentration an Phenoloxidase in der Haemolymphe zur Melanisierung um die Auftropfstelle kommen müsste, wie dies z.B. bei Winterbienen und älteren Arbeiterinnen der Fall ist.

Eine humorale Immunantwort bei *E.coli* Infektionen konnte in allen Stadien der Larven, die untersucht worden sind, mittels Gelelektrophorese und Hemmhoftest nachgewiesen werden. Schon nach 2 Stunden ist nach einer *E.coli* Infektion von Drohnenlarven ein kleiner Hemmhof zu erkennen (Abb. 32) während bei adulten Drohnen erst nach 6 bis 8 Stunden p.i. ein Hemmhof sichtbar wird (Abb. 44, Abb. 50). Die antibakterielle humorale Immunantwort von Larven ist also um einiges schneller als die der adulten Drohnen.

Die humorale Immunantwort auf verschiedene Elizitoren ist bei Larven mit der Hochregulation von den AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 verbunden. Im hochmolekularen Bereich werden aber bei Larven keine Immunfaktoren, z.B. Carboxylesterase und IRp30 nach Infektion verstärkt exprimiert (Abb. 27, Abb. 28), wie dies bei adulten Drohnen der Fall ist (Abb. 42, Abb. 45). Dies konnte zuvor schon für die Arbeiterinnen der Honigbiene nach Injektion von *E.coli* nachgewiesen werden (Randolt et al., 2008).

Nach einer Infektion mit *E.coli* wird auch das animale Peptidtoxin (APT) OCLP 1 bei Larven hochreguliert, ebenso wie das Lysozym 2 (Abb. 28). Die toxische Wirkung von OCLP 1 wurde von Kaplan et al. (2007) mit einem Test auf dessen Toxizität an Fischen nachgewiesen. Welche Funktion dieses Toxin in der Haemolymphe hat, ist aber noch unbekannt. Jedoch würde man bei der Honigbiene Toxine eher in der Giftblase erwarten. Drohnen haben aber keine Giftblase, die bei den Arbeiterinnen Teil des Stachelapparates ist.

Erst 9 bis 11 Tage alte Drohnenlarven zeigen eine schwach ausgeprägte zelluläre Immunantwort in Form von Nodulation. Die gebildete Menge an Noduli 24h nach einer *E.coli* Infektion (~20 Noduli pro Larve) ist weit geringer als dies bei jungen adulten Drohnen beobachtet wurde (~1000 Noduli pro Drohne). Zudem erscheinen die Noduli in Larven (Abb. 64, Abb. 65) weniger stark gefärbt als in adulten Drohnen (Abb. 74). Die Frage, warum die Nodulation überhaupt nur im letzten Larvalstadium bei Drohnen- und Arbeiterinnenlarven stattfindet, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Man könnte vermuten, dass junge Larven die Zelltypen, die sie für die Nodulation benötigen, nicht haben und diese



erst zu einem späten Zeitpunkt der Larvalentwicklung gebildet werden. Dann stellt sich aber auch die Frage, warum die Noduli sich in der Ausfärbung von denen der adulten Bienen unterscheiden. Da sich die Noduli von Arbeiterinnen, Drohnen und Königinnen stark in der Größe unterscheiden (Abb. 80) kann aber gesagt werden, dass die andere Färbung der Noduli bei Larven typisch für das Larvalstadium bei Honigbienen ist.

In Larven kommt es nach einer bakteriellen Infektion innerhalb der ersten 4 h p.i. zu einer Abnahme der koloniebildenden Einheiten (Abb. 32). Da die humorale Immunantwort bei Larven - wie im Hemmhofstest gezeigt - erst nach 4 h stark ausgeprägt ist, erklärt sie nicht die Abnahme der Koloniebildenden Einheiten innerhalb der ersten 4 h nach Infektion. Da zudem die zelluläre Immunantwort in Form von Nodulation bei Larven eher schwach ausgeprägt ist, greift hier vermutlich der Mechanismus der Phagozytose bei der Elimination der Bakterien innerhalb der ersten 4 h p.i..

#### 5.4 Drohnenpuppen besitzen keine Immunkompetenz

Nach der Infektion mit *E.coli* verfärbten sich die Puppen komplett gräulich schwarz und es konnten keine einzelnen Noduli erkannt werden (Abb. 66), wie dies bei Larven oder adulten Drohnen der Fall war, noch wurde eine Abnahme von Koloniebildenden Einheiten beobachtet. Die Haemozytenanzahl ist aber in Puppen von Arbeiterinnen am höchsten (Wilson-Rich et al., 2008). Eine andere Arbeit zeigt, dass die Haemozytenzahl bei Arbeiterinnen im Puppenstadium höher ist als bei den Larven und niedriger als bei frisch geschlüpften Arbeiterinnen. Die Haemozytenzahl nimmt zudem durch eine Parasitierung mit *Varroa* signifikant bei Arbeiterinnen, aber nicht bei Drohnen ab (Wienands und Madel, 1988). Die totale Haemozytenzahl von gesunden Drohnenpuppen liegt bei  $3992 \pm 313$  (davon sind 49 % Plasmatozyten und 48 % Önozytoide) und bei frisch geschlüpften Drohnen bei  $3100 \pm 329,4$  (davon sind 65 % Plasmatozyten und 18 % Önozytoide) (Wienands und Madel, 1988) und entspricht somit der Aussage, dass Puppen eine höhere Haemozytenanzahl aufweisen als adulte Bienen. Daher ist es verwunderlich, dass die Anzahl an Koloniebildenden Einheiten ausgerechnet bei den Puppen zunimmt und nicht, wie bei den Larven und adulten Individuen abnimmt, die ja weniger Haemozyten besitzen. Wenn man aber davon ausgeht, dass die meisten dieser Haemozyten eine Funktion während der Metamorphose innehaben und keine Funktionen bei der Immunantwort ausführen, kommt man wiederum zur spezifischen Zusammensetzung der Haemozytenpopulation. Darüber wird aber im Allgemeinen bei der Gesamthaemozytenzahl keine Aussage getroffen. Schon die Haemozytenzusammensetzung von frisch geschlüpften Arbeiterinnen und ein Tag alten Arbeiterinnen unterscheidet sich. So nimmt der Prozentsatz an ovalen Plasmatozyten von im Mittel 2,1 auf 21,3 % der Gesamthaemozyten zu (van Steenkiste, 1987). Der Prozentsatz der Plasmatozyten und der Freien Kerne (10 %) steigt bei frisch geschlüpften Drohnen im Gegensatz zu den Drohnenpuppen an. Aber bei Parasitierung mit der Varroamilbe steigt die Anzahl an Önozytoiden um 12 % an, während frisch geschlüpfte Arbeiterinnen dann nur einen Anstieg von 4% aufweisen (Wienands und Madel, 1988). Daher muss auch davon ausgegangen werden, dass sich die Haemozytenzusammensetzung durch eine Infektion

jeglicher Art ändert und damit wiederum die Zusammensetzung der Haemozyten zum Zeitpunkt der Infektion in den Fokus rückt.

Bei der Honigbiene wurden fünf Haemozytentypen identifiziert. Und zwar sind dies die Calculocyten, die Plasmatoocyten, die Granuloocyten, die Aciculocyten und die freien Kerne, die sich in ihrer Größe, Morphologie und ihrem Verhalten unterscheiden (Thomas, 2008). Van Steenkiste (1987) unterschied hingegen fünf Basistypen von Zellen (Plasmatoocyten, Prohaemozyten, Granulozyten, Oenozytoide und Coagulozyten) in seiner Arbeit über die Haemozyten der Honigbiene. Aber die Prohaemozyten sieht er als Vorläufer für die Plasmatoocyten, die er noch in mehrere Plasmatozytentypen unterteilt. Bei *in vitro* Versuchen sind die Granulozyten phagozytotisch aktiv (van Steenkiste, 1987). Wienands und Madel (1988) gehen davon aus, dass die Haemolympe von *Apis mellifera* sieben Elemente enthält: fünf Haemozytentypen (Prohaemozyten, Plasmatoocyten, Önozyten, Imaginalönozytoide und Freie Kerne) sowie Larval- und Imaginalönozyten, die in unterschiedlicher Häufigkeit in den verschiedenen Entwicklungsstadien und Kasten auftreten. In Lepidopteren sind dahingegen bis zu 5 Haemozytentypen bekannt. Diese sind die Prohaemocyten, Plasmatoocyten, Granuläre Zellen, Sphaerische Zellen und die Oenocyten (Trenczek et al., 1998). Wie man an den unterschiedlichen Benennungen der Zellen und den verschieden großen Anzahlen sehen kann, besteht keine eindeutige Klassifizierung der Haemozyten der Honigbiene. Außerdem ist bei Lichtmikroskopischen Untersuchungen von Zellen immer auch ihre Ausrichtung zum Betrachter eine Fehlerquelle. Denn ein und dieselbe Zelle kann zum einen großflächig und rund mit vielen granulären Einschlüssen und zum anderen schmal und langgezogen mit einem großen Zellkern erscheinen. Solche Zellen können nun als zwei verschiedene Haemozytentypen eingeteilt werden, wenn sie nicht durch Zellkernfärbung eindeutig zugeordnet werden können. Auch wenn man nun eine eindeutige Benennung der Haemozyten der Honigbiene hätte, wäre ihre Funktion immer noch nicht eindeutig geklärt.

Die Plasmatoocyten sind die phagozytotisch aktiven Zellen in *Galleria mellonella* und *Schistocerca gregaria*. Aber sie sind in *Manduca sexta* nur schwach phagozytotisch aktiv im Vergleich zu den Granulären Zellen (Pech et al., 1994). Nur bei Larven der Honigbiene konnte Phagozytose durch Haemozyten bei *in vitro* Versuchen mit Tusche und Neutralrotpartikeln festgestellt werden und nicht bei adulten Arbeiterinnen (Wienands und Madel, 1988). Dahingegen stellte van Steenkiste (1987) die phagozytotische Aktivität von Granulozyten mit der Haemolympe von einen Tag alten Bienen in Zellkulturversuchen fest. Allerdings ist bei beiden zu beachten, dass die Kurzlebigkeit der Haemolymphzellen bei *in vitro* Versuchen keine eingehenderen Untersuchungen zulassen, da die Überlebensdauer der Zellen kurz ist. Zudem wurden nur „unbelebte“ Partikel verwendet und keine Bakterien. Daher kann von dieser Aussage nicht auf die hier durchgeführten *in vivo* Versuche wie die Nodulationsversuche und die Abnahme der Koloniebildenden Einheiten geschlossen werden, da sie im „natürlichen“ Kontext mit einem lebenden Bakterium gemacht worden sind.

An der Phagozytose sind einige Rezeptormoleküle beteiligt so z.B. das LPS recognition Protein (LRP), das in *Holotrichia diomphalia* gefunden wurde, das in die Haemolympe segregiert wird und Gram-negative Bakterien durch seine Bindung an LPS verklumpt (Lemaitre und Hoffmann, 2007). Solch spezifische Rezeptormoleküle werden aber bei

Versuchen mit Partikeln, die weder PGN noch LPS in ihrer Oberfläche besitzen, gar nicht erst aktiv zur Unterstützung der Phagozytose.

Während der Puppenphase der Entwicklung der Honigbiene nimmt die Konzentration an Phenoloxidase in der Haemolymphe zu. Diese trägt wahrscheinlich zur Melanisierung der Kutikular der Puppe, die durch den endogenen Ecdysteroidlevel reguliert wird, bei (Zufelato et al., 2004). Es ist bekannt, dass Phenoloxidase in frei zirkulierenden Haemozyten synthetisiert und als inaktives Vorläuferprotein Prophenoloxidase in die Haemolymphe abgegeben wird (Zufelato et al., 2004). So kann man davon ausgehen, dass die hohe Haemozytenzahl in Puppen mit der Phenoloxidase und der damit einhergehenden Ausfärbung der Kutikular der Puppe zusammenhängt. Da Peptidoglycan interagierende Proteine (PGRPs) an der Aktivierung der Prophenoloxidase beteiligt sind (Goto und Kurata, 2006) und die Phenoloxidase an der Melanisierung der Kutikular der Puppen beteiligt ist, verwundert es nicht weiter, dass die PGRPs auch in nicht infizierten Puppen vorhanden sind (Abb. 37).

Nach einer Infektion mit *E.coli* verfärbten sich die Puppen gräulich-schwarz. Folglich müsste die Prophenoloxidase aktivierende Komponente der Immunantwort nach der Infektion mit *E.coli* aktiviert worden sein und damit auch mehr Phenoloxidase in der Haemolymphe vorhanden sein, was nicht der Fall ist (Abb. 37). Die starke Melanisierung muss daher Endprodukt einer anderen Signalkaskade sein oder die Kaskade anders initiiert worden sein. Das zelluläre Immunsystem in Form von Nodulation und Phagozytose scheint in Puppen nicht aktiviert zu werden, da weder Noduli zu finden waren, noch eine Abnahme von koloniebildenden Einheiten beobachtet wurde. Die Bakterien, gleich welcher Anfangskonzentration, vermehrten sich dagegen ungehindert sowohl in weißäugigen als auch in rotäugigen Puppen (Abb. 35, Abb. 36, Abb. 38).

Obwohl aufgrund der gräulich schwarzen Färbung der Puppen davon ausgegangen wurde, dass alle Puppen spätestens 24 h nach Infektion mit *E.coli* tot waren, wurde das AMP Hymenoptaecin in der Haemolymphe 48 h p.i. identifiziert (Abb. 37). In derselben Bande wurde auch ein 10 kDA Heat shock Protein gefunden. Das Heat shock Protein 10 wurde ursprünglich als essentielles mitochondriales Protein beschrieben, welches an der Proteinfaltung beteiligt ist. Aber auch an extrazellulären immunomodulierenden Prozessen soll HSP 10 beim Menschen beteiligt sein. Heat shock Proteine sollen als Gefahrensignale dienen, die das angeborene und adaptive Immunsystem über Schäden durch Infektionen, Verletzungen, Hitze und/oder zellulären Stress informieren (Johnson et al., 2005). Weiter wird vermutet, dass bakterielle Heat shock Proteine als Transporter für das AMP Apidaecin fungieren (Otvos et al., 2000). Insofern könnte bei weißäugigen Puppen erst zu diesem sehr späten Stadium der Infektion eine Kaskade zur Pathogenabwehr gestartet worden sein. Dies wird auch durch die antibakterielle Aktivität im Hemmhoftest 48 h p.i. deutlich (Abb. 35, Abb. 36). Bei rotäugigen Puppen hingegen ist diese antibakterielle Aktivität nicht erkennbar (Abb. 38). Zudem steigt die Anzahl der koloniebildenden Einheiten bei allen untersuchten Puppen innerhalb von 24 h so stark an (Abb. 35, Abb. 36, Abb. 38), dass es wahrscheinlich auch für die weißäugigen Puppen nicht mehr möglich ist, die Infektion in den Griff zu bekommen. Zusätzlich sind beim Hemmhoftest der höheren Anfangskonzentration in der

Mitte des Hemmhofes Bakterien gewachsen, die von der aufgetropften Haemolymphe stammen müssen (Abb. 36). Was wiederum vermuten lässt, dass die nur in den weißäugigen Puppen vorhandene Pathogenabwehr nur ungenügend ist und viel zu spät einsetzt. Zu solch einem Bakterienwachstum um die Auftropfstelle kommt es weder bei den Larven (Abb. 31) noch den adulten Individuen der Honigbiene (Abb. 49) oder bei *Bombus terrestris* (Abb. 56), *Dolichovespula saxonica* (Abb. 57) oder den beiden *Osmia* Arten (Abb. 62).

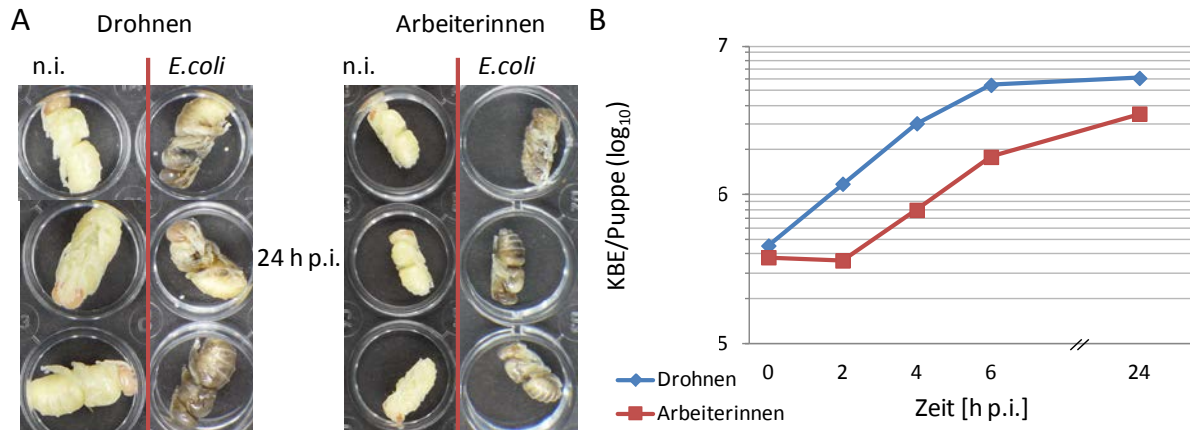


Abb. 87: Weißäugige Drogen- und Arbeiterinnenpuppen 24 h nach einer Infektion mit  $10^5$  *E.coli* Zellen. Vergleich A) des äußeren Erscheinungsbilds der Puppen und B) der Zunahme der Koloniebildenden Einheiten pro Puppe mit der Zeit p.i. . Die Ergebnisse zu den Arbeiterinnenpuppen wurden von K. Azzami (BEEgroup) zur Verfügung gestellt.

Nicht infizierte Puppen entwickeln sich im Gegensatz zu den infizierten normal weiter wie an den leicht rosa gefärbten Augen zu sehen ist. Die mit *E.coli* infizierten Drogen- und Arbeiterinnenpuppen verfärben sich dahingegen gräulich schwarz (Abb. 87). Sowohl in Arbeiterinnenpuppen als auch in Drogenpuppen kommt es nach *E.coli* Infektion zu einem Anstieg der Bakterienzahl um etwa eine Zehnerpotenz. Die Immunabwehr der Puppen scheint also generell sehr schwach zu sein. Dies kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass sie sich während der Puppenphase in den gedeckelten Zellen in einer Art Schutzraum befinden, in den keine Krankheitserreger eindringen können. Mit der Invasion der Varroamilbe hat sich dies aber dramatisch geändert und die Puppen sind nun auch vermehrt Krankheitserregern ausgesetzt.

Zwar konnte auch bei rotäugigen Arbeiterinnenpuppen vereinzelt eine schwache Expression von Hymenoptaecin zu einem späten Zeitpunkt nach der Infektion beobachtet werden (Azzami, 2011), wie bei den Drogenpuppen ist aber auch hier davon auszugehen, dass die humorale Immunantwort viel zu spät einsetzt, um noch irgendeine Wirkung zu entfalten.

## 5.5 Adulte Drohnen zeigen eine starke humorale und eine starke zelluläre Immunantwort

### 5.5.1 Das Haemolymphproteinmuster adulter Drohnen variiert mit dem Alter

Die Proteinzusammensetzung der Haemolymph von adulten Drohnen ändert sich innerhalb der ersten zwei Wochen nach dem Schlupf stark. Diese Zeitspanne ist mit wichtigen Veränderungen im Leben der Drohnen verbunden. Zwischen Tag 5 und 7 tauchen in der Haemolymph einige neue Proteine auf. Besonders auffällig sind dabei das Vitellogenin, die  $\alpha$ -Glucosidase II und TLR 13 (Toll-like Receptor 13) (Abb. 39). Während das Vitellogenin nur bei bis zu 2 Wochen alten Drohnen nachgewiesen werden kann, sind die anderen beiden Proteine auch noch bei sieben Wochen alten Drohnen in der Haemolymph vorhanden und somit bis zum Lebensende der Drohnen (Abb. 41).

Die Drohnen beginnen rund um Tag 6 nach dem Schlupf mit den ersten Erkundungsflügen und werden ab Tag 6 nicht mehr von Arbeiterinnen gefüttert, sondern ernähren sich selbst (Hirtz, 2011). Sie werden zudem mit 9-12 Tagen geschlechtsreif (Rhodes et al., 2011). Das Vitellogenin ist also gerade in einer Zeit in der Haemolymph der Drohnen vorhanden, in der diese viel Energie benötigen. Vitellogenin wird bei Arbeiterinnen und Königinnen häufig mit Langlebigkeit in Verbindung gebracht (Amdam et al., 2004), da es bei diesen in großer Menge vorhanden ist und die Menge an Vitellogenin mit dem Alter ansteigt (Azzami et al., 2009). Diese Rolle kann Vitellogenin in Drohnen aufgrund der kurzen Zeitspanne und geringen Menge, in der es in der Haemolymph vorhanden ist (Trenczek et al., 1998), nicht haben.

Vitellogenin kann zudem bei Drohnen nichts mit der Immunkompetenz zu tun haben, wie dies für Arbeiterinnen angenommen wird (Amdam et al., 2004; Amdam et al., 2005; Corona et al., 2007), da Drohnen ihr ganzes Leben lang eine gleichbleibend starke Immunantwort zeigen (Abb. 49) und nicht nur in der kurzen Zeitspanne in der Vitellogenin bei Drohnen in höheren Mengen vorhanden ist. Aber es ist genau dann in der Haemolymph vorhanden, wenn die Drohnen einem erhöhten Stress durch Erkundungsflüge, selbstständiges Fressen und ihre Geschlechtsreife ausgesetzt sind. Vitellogenin ist bei Arbeiterinnen mit der Resistenz gegen oxidativen Stress korreliert (Seehuus et al., 2006). Daher könnte die erhöhte Menge an Vitellogenin bei den Drohnen zur Stressresistenz beitragen.

### 5.5.2 Die lebenslange, starke Immunantwort von adulten Drohnen

Adulte Drohnen bilden nach einer Infektion eine starke humorale Immunreaktion aus. Dabei werden die AMPs Hymenoptaecin, Defensin 1 und Abaecin induziert (Abb. 44). AMPs funktionieren prinzipiell indem sie direkt mit den Mikroben interagieren und deren Membranen permeabilisieren. Lytische AMPs haben ein weites Wirkungsspektrum von Gram<sup>+</sup>- über Gram<sup>-</sup>-Bakterien bis hin zu Pilzen (Scocchi et al., 2011). Desweiteren bilden adulte Drohnen aber auch Immunfaktoren als Reaktion auf eine Infektion. Das sind im hochmolekularen Bereich die Carboxylesterase (CE 1), IRp30 (Abb. 43), eine Serinprotease, IRp42 und PGRP-S2 (Abb. 45). Im niedermolekularen Bereich werden zudem noch Lysozym 2

und OCLP1 hochreguliert (Abb. 45). Damit unterscheidet sich die humorale Immunantwort von adulten Drohnen deutlich von der der Drohnenlarven.

Für Peptidoglycan interagierende Proteine (PGRPs) wurde gezeigt, dass sie an die Zellwandkomponente Peptidoglycan (PGN) binden. Für Insekten PGRPs wurde die direkte Bindung an PGN bei *B.mori* und einigen PGRPs von *D.melanogaster* nachgewiesen (Steiner, 2004). Auch werden PGRP Transkripte in Organen gefunden, die stark mit der Immunantwort der Insekten in Zusammenhang stehen, wie der Fettkörper. Desweiteren sind bestimmte PGRPs an der Aktivierung der Phagozytose beteiligt, fungieren als Pattern recognition Rezeptoren (Steiner, 2004) und sind an der Aktivierung der Prophenoloxidase beteiligt (Steiner, 2004; Goto und Kurata, 2006). Bei PGRP-S2 ist die Funktion noch unbekannt (Viljakainen et al., 2009). Es wird aber erst nach Infektion hochreguliert und somit scheint es sich um ein Immuninduziertes Protein zu handeln. Daher wird es hier bei den Drohnen auch zu den hochmolekularen Immunfaktoren gezählt. Zuvor wurde PGRP-S2 bereits mit der Immunabwehr bei Arbeiterinnen assoziiert (Evans et al., 2006; Randolt et al., 2008; Viljakainen et al., 2009).

IRp30 wurde das erste Mal nach bakterieller Infektion bei Arbeiterinnen der Honigbiene nachgewiesen (Randolt et al., 2008). Es hat einen LRR („leucin rich repeat“) am N-terminalen Ende und zudem wie CE 1 ein klassisches Leucin-Reißverschlußmotiv, das am äußersten C-terminalen Ende des Proteins lokalisiert ist (Albert et al., 2011). Daher sind Interaktionen mit anderen Proteinen naheliegend, da einige Insektenproteine, die LRRs enthalten, mit der Oberfläche von Pathogenen zum Auslösen einer Immunantwort interagieren (Zhu et al., 2010). IRp30 scheint aber keine solchen Interaktionen mit Proteinen oder anderen Komponenten einzugehen (Albert et al., 2011). Die Expression von IRp30 ist in Sommer- und Winterbienen unterschiedlich ausgeprägt. In Sommerbienen taucht es nur nach Infektion gleichzeitig mit CE 1 auf. In Winterbienen ist es dagegen konstitutiv vorhanden (Azzami, 2011; Albert et al., 2011) und wird im Fettkörper synthetisiert (Albert et al., 2011). Bei adulten jungen Drohnen wird es zwischen 10 und 12 h nach Infektion hochreguliert (Abb. 44) aber es ist in sehr alten nicht infizierten Drohnen nicht vorhanden (Abb. 41). Bei IRp30 handelt es sich um ein leicht saures Glycoprotein.

Der Verlauf der Expression von IRp30 und CE 1 ist bei adulten Drohnen mit dem der AMPs vergleichbar (Abb. 44). Bei der Serinprotease, IRp42 und PGRP-S2 kann keine definierte Aussage über den Zeitpunkt der Expression gemacht werden.

Die Funktion von IRp42, das nach bakterieller Infektion exprimiert wird, ist unbekannt. Es enthält eine große Glycin-reiche Region (Abb. S1) und dürfte daher zu den Glycin-reichen Proteinen (GRPs) zählen, die hoch flexibel und ohne eine definierte Konformation sind (Mousavi und Hotta, 2005). GRPs werden in drei Klassen unterteilt: die Pflanzenzellwand GRPs, RNA-GRPs und die Cytokeratin-like Proteine (CL-GRPs). Es wird vermutet, dass Pflanzen GRPs und tierische Cytokeratine in Bezug auf Struktur und Funktion zueinander verwandt sind (Mousavi und Hotta, 2005). GRPs sollen bei Pflanzen Teil der Pathogenabwehr sein (Mousavi und Hotta, 2005; Mangeon et al., 2010). Daher ist eine Rolle in der Immunantwort von IRp42 nicht abwegig.

In adulten Drohnen wird nach einer Infektion mit *E.coli* Lysozym 2 gebildet. An der gleichen Stelle im Polyacrylamid-Gel nach 2D-Gelelektrophorese ist bei nicht infizierten Drohnen ein Kazal type Serin Protease Inhibitor (SPI) zu finden (Abb. 45). Nach einer Infektion ist dieser Inhibitor verschwunden. Der mittels nano HPLC/MS analysierte Spot enthielt nur noch Lysozym 2. Die einfachste Annahme ist, dass SPI stark herunterreguliert worden ist, so dass kein SPI mehr in der Haemolymphe 24 h p.i. *E.coli* vorhanden ist. Oder aber SPI wurde innerhalb von Signalkaskaden verbraucht, verändert oder gebunden.

Das Lysozym 2, das ich in der Haemolymphe von infizierten adulten Drohnen gefunden habe, gehört zu den „chicken (c)-type“ Lysozymen genauso wie das Lysozym 1. Im Genom der Honigbiene wurde außer Lysozym 1 und 2 noch ein drittes Lysozym (Lysozym i oder Lysozym 3) gefunden (Kunieda et al., 2006; Evans et al., 2006), das zu den Invertebraten (i)-spezifischen Lysozymen gehört. Lysozyme sind bakteriolytisch aktive Enzyme, die die  $\beta$ -1,4-glycosidische Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuramin in der Peptidoglycanschicht von Bakterien-Zellwänden spalten (Bachali et al., 2002). Daher dürften sie in der Immunabwehr eine Rolle spielen, wobei aber ihre Affinität zu Bakterien je nach Typ sehr unterschiedlich sein dürfte. Insekten Lysozyme werden oftmals zu den (c)-type Lysozymen gezählt aufgrund ihrer großen Homologie. Wie aber Yu und Kollegen (2002) zeigen konnten, unterscheiden sich die Insekten Lysozyme bei Lepidopteren doch geringfügig von den (c)-Typ Lysozymen. Vor allem sind sie nicht nur gegen Gram-positive Bakterien wirksam, sondern auch gegen Gram-negative (Yu et al., 2002) und Pilze (Prusko, 2006).

Wie durch die antibakterielle Aktivität im Hemmhoftest gezeigt, bleibt die humorale Immunantwort über die gesamte Lebensspanne eines Drohnes gleich, obwohl im Polyacrylamidgel die Banden der durch Infektion induzierten Proteine mit zunehmendem Alter schwächer werden (Abb. 49). Aber auch die Menge der anderen in der Haemolymphe enthaltenen Proteine lässt mit dem Alter der Drohnen nach, so dass aus der geringeren Menge an Immunpeptiden keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Sie muss immer auch in Relation zur Gesamtproteinmenge gesehen werden und mit den hier durchgeführten Untersuchungen kann nur eine qualitative und keine quantitative Aussage getroffen werden.

Die zelluläre Immunantwort bei adulten Drohnen wird bei der Elimination der Koloniebildenden Einheiten mit zunehmendem Alter immer effektiver (Abb. 50). Auch bei Arbeiterinnen von *Apis mellifera* konnte beobachtet werden, dass die Abnahme der Koloniebildenden Einheiten nach einer bakteriellen Infektion stärker wird je älter diese sind (Azzami, 2011). Die Zahl der Noduli pro Drohne, die 24 h nach einer bakteriellen Infektion gebildet werden, nimmt hingegen mit dem Alter der Drohnen stark ab (Tabelle 21, Abb. 75). Dennoch kann aber von einer starken zellulären Immunantwort bei adulten Drohnen gesprochen werden.

## 5.6 Nodulation, eine wichtige Komponente der zellulären Immunantwort

Die Fähigkeit zur Bildung von Noduli ist bei Honigbienen sowohl bei Arbeiterinnen, Drohnen und adulten Königinnen in den ersten Tagen am ausgeprägtesten und lässt mit dem Alter nach.

Nicht nur bezüglich der Größe der Noduli, die als Antwort auf eine bakterielle Infektion gebildet werden, unterscheiden sich die drei Bientypen der Honigbiene (Abb. 88), sondern auch in deren Anzahl. Die größten und wenigsten Noduli bilden Arbeiterinnen aus. Königinnen sind in Größe und Anzahl der Noduli in der Mitte zwischen den Arbeiterinnen und Drohnen. Diese bilden sehr viele (ca. 1000/Drohn), aber auch sehr kleine Noduli nach einer bakteriellen Infektion.

Mögliche Erklärungen für die Variation in der Größe der Noduli bieten die unterschiedliche Physiologie der Drohnen, Arbeiterinnen und Königinnen aber auch deren hormonelle Besonderheiten wie das Königinnenpheromon. Zusätzlich ist ihre Aufgabe im Bienenvolk sehr unterschiedlich und mit mehr oder weniger Risiko behaftet. Nur das Überleben der Drohnen und der Königin sind aber für die nächste Generation wichtig. Von daher sollten sie ein besonders effektives Immunsystem haben. Das zelluläre Immunsystem hat aber nicht nur den einen Teilaspekt Nodulation, sondern zudem noch die Phagozytose und die Wundverschlusreaktionen. Howard und Kollegen (1998) konnten zeigen, dass die Größe und das Gewicht eines Insektes keinen Einfluss auf die Nodulation haben. Die großen Drohnen haben mehr Noduli als die kleinen Arbeiterinnen. Aber bei der Größe der Noduli verhält es sich wiederum umgekehrt. Also kann hier auch nicht einfach von der Größe auf die resultierende Nodulationsreaktion geschlossen werden.

Nach Infektion mit *E.coli* kam es bei älteren Larven, jungen Arbeiterinnen, Drohnen und Königinnen zu einer Nodulationsreaktion. Bei der Infektion mit *M.flavus* kam es hingegen zu keiner Bildung von Noduli. Die Nodulationsreaktion ist nach Applikation verschiedener Bakterien unterschiedlich stark ausgeprägt (Howard et al., 1998). Sie vermuten, dass die Intensität der Nodulationsreaktion von der Interaktion des Bakteriums mit dem Wirtsinsekt in Zusammenhang stehen könnte.

Bei frisch geschlüpften Arbeiterinnen wurden 130 Noduli/Biene 4 h nach einer Applikation von gefriergetrockneten *S. marcescens* Bakterien gefunden (Bedick et al., 2001). Dies sind mehr Noduli als in meinen Experimenten mit lebenden *E.coli* Bakterien entdeckt wurden. Die unterschiedlich hohe Anzahl an Noduli kann nun mit den verschiedenen Bakterien zusammenhängen, die für die bakterielle Infektion verwendet wurden. Allerdings ist auch der Verlauf der Zunahme an Noduli bei mir nach einer Infektion bei Honigbienen stark abweichend von der angegebenen. So wird bei meinen Experimenten erst zwischen 4 und 6 Stunden nach Infektion mit *E.coli* langsam die Plateauphase erreicht (Abb. 69, Abb. 76) während bei Bedick und Kollegen (2001) das Maximum schon nach 4 h beobachtet wurde. Des Weiteren fanden sie bei Sammlerinnen keine Noduli und konnten bei diesen keine Haemolymph entnehmen. In meinen Experimenten fand ich dagegen sehr wohl Noduli bei Ammenbienen und Flugbienen (Tabelle 21). Nur in Winterbienen konnte auch ich keine Noduli nach *E.coli* Infektion entdecken. Aber sowohl bei Ammenbienen, Flugbienen und



Winterbienen konnte ohne Probleme ca. 5 $\mu$ l Haemolymph entnommen werden. Bei frisch geschlüpften Arbeiterinnen können etwa 5-10  $\mu$ l Haemolymph (Randolt et al., 2008) und bei Drohnen (1 d) ca. 5-12  $\mu$ l gewonnen werden.

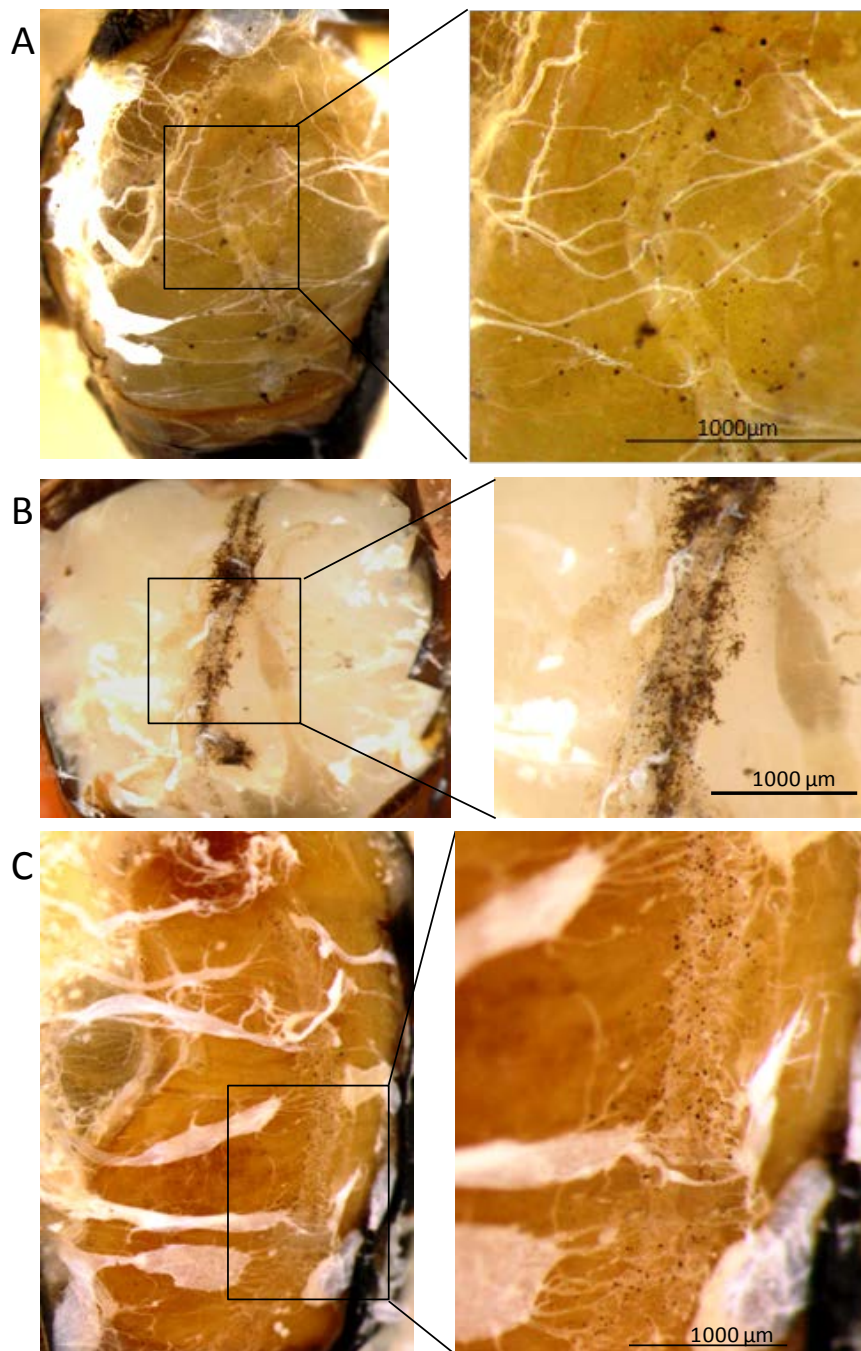


Abb. 88: Nodulibildung 24 h p.i. von  $10^5$  *E.coli* Zellen bei A) einer Arbeiterin (1 d), B) einem Drohn (1 d) und C) einer Königin (1d bis 3w).

Bei Experimenten mit Substanzen, die in die Eicosanoid-Biosynthese (Abb. 72) eingreifen, sind meine Ergebnisse (Abb. 73) auch nicht mit der Literatur konform. Nach der zusätzlichen Gabe von Phenidone sollte es zu einer deutlich geringeren Anzahl an Noduli nach einer Infektion kommen (Bedick et al., 2001, Tunaz et al., 2003). In meinen Experimenten war die Nodulibildung nach Bakterien plus Phenidone Applikation sehr uneinheitlich und nur einmal kam es zu einer leichten Absenkung der Nodulianzahl.

Dexamethasone (Inhibitor der Phospholipase A2) wirkte zwar leicht absenkend, aber die Anzahl der Noduli unterschied sich nicht signifikant zur Kontrollgruppe und Indomethacine

hatte keinen Einfluss auf die Nodulianzahl nach Infektion mit *E.coli*. Bei der Honigbiene wurde aber gefunden, dass sowohl Dexamethasone, Phenidone und Indomethacine zur signifikanten Absenkung der Nodulianzahl führen (Bedick et al., 2001). Auch in anderen Insekten wurde eine signifikante Absenkung der Anzahl an Noduli gefunden, wenn Phenidone, Dexamethasone oder Indomethacine gleichzeitig zur Infektion (bakteriell oder viral) gegeben wurden (Tunaz et al., 2003; Garcia et al., 2004; Miller et al., 1999; Bedick et al., 2000; Durmuş et al., 2008).

Wenn Arachidonsäure zusätzlich zu Dexamethasone, das absenkend auf die Anzahl an Noduli wirkte, gegeben wurde, so kam es zur Ausbildung von genauso vielen Noduli wie ohne die Gabe von Dexamethasone nach bakterieller Infektion (Bedick et al., 2000; Miller et al., 1999; Howard et al., 1998) oder der mit pathogenem Pilz (Dean et al., 2002). Wenn man nun davon ausgeht, dass bei Winterbienen das Substrat zur Eicosanoid-Biosynthese fehlt, müssten nach der zusätzlichen Applikation von Arachidonsäure, die am Anfang der Eicosanoid-Biosynthese steht, auch in Winterbienen Noduli zu finden sein. Dies ist nicht der Fall. Folglich scheint es nicht an der Eicosanoid-Biosynthese zu liegen, dass in Winterbienen keine Noduli nach *E.coli* Infektion gebildet werden.

### 5.7 Zelluläre Immunreaktionen erfolgen vor humoraler Immunantwort

Aufgrund des Rückgangs der Haemozyten bei Sammelbienen wird davon ausgegangen, dass das zelluläre Immunsystem bei älteren Bienen herunter reguliert wird (Amdam et al., 2004). Aber die Abnahme an koloniebildenden Einheiten nimmt mit dem Alter der Drohnen zu. Sie ist in frisch geschlüpften schwächer als in 5 Tage und 11 Tage alten Drohnen (Abb. 50). Wobei es bei den 11 Tage alten Drohnen nach 72 h p.i. noch zu einer stärkeren Abnahme kommt als bei den 5 Tage alten Drohnen. Dies spricht nun dafür, dass das zelluläre Immunsystem eher stärker wird als schwächer. Aber gleichzeitig nimmt die Anzahl an gebildeten Noduli nach einer Infektion mit *E.coli* mit dem Alter der Drohnen ab (Abb. 75). Dies lässt die Vermutung zu, dass es verstärkt zur Phagozytose kommen muss. An der Nodulation ist eine große Anzahl an Zellen beteiligt, die das Pathogen einschließen. Dahingegen sind an der Phagozytose nur die phagozytotisch aktiven Zellen beteiligt.

Die Phenoloxidaseaktivität nimmt mit dem Alter zu (Schmid et al., 2008) und mit ihr sozusagen auch die Produkte ihrer Signalkaskade, die cytotoxische Wirkung aufweisen, wie die Chinone. Im Hemmhofstest kam es bei den Drohnen insbesondere bei den älteren nicht zu einer Melanisierung des Hemmhofes (Abb. 49) wie dies bei älteren Arbeiterinnen oder auch bei *Bombus terrestris* der Fall ist. Nun könnte man anführen, dass der Haemolymph PTU und Aprotinin zugesetzt wurde, um genau diese Braunfärbung zu verhindern. Obwohl dies der Fall ist, kommt es dennoch bei älteren Arbeiterinnen zur Braunfärbung der Hemmhöfe. Somit kann davon ausgegangen werden, dass in älteren Drohnen die Phenoloxidasemenge nicht analog zu den Arbeiterinnen erhöht ist. Damit kann auch die cytotoxische Wirkung von Stoffen der Phenoloxidase Kaskade nicht als Grund für die starke antibakterielle Aktivität der Haemolymph von alten Drohnen angeführt werden, wie bei älteren Arbeiterinnen.

Nach Infektion mit *Micrococcus flavus* (Gram-positiv) kam es nicht zu einer Bildung von Noduli bei frisch geschlüpften Arbeiterinnen (Tabelle 21). Bei der Messung koloniebildender Einheiten nach einer *M.flavus* Infektion von frisch geschlüpften Arbeiterinnen konnte gezeigt werden, dass die Bakterienzahl innerhalb der ersten zwei Stunden p.i. drastisch abnahm und sie fast vollständig aus der Haemolymph entfernt wurden (Azzami, 2011). Da Noduli nach einer bakteriellen Infektion frühestens nach drei bis vier Stunden bei Arbeiterinnen sichtbar sind (Abb. 69), muss hier eine andere zelluläre Abwehrreaktion greifen, die viel schneller gegen die eingedrungenen Bakterien aktiv wird. Dadurch kommt es vermutlich gar nicht erst zur Bildung von Noduli nach einer Infektion mit *M.flavus*. Die Bildung von AMPs und auch von Lysozym oder OCLP1 dauert ebenso viel zu lange, um die schnelle Unschädlichmachung der *M.flavus* Bakterien zu erklären. Als eine der Möglichkeiten käme die Phagozytose der Bakterien in Betracht, da es sich dabei um eine schnelle zelluläre Immunreaktion handelt, deren Signalwege sehr kurz und effektiv sind. Desweiteren sind an der Phagozytose nicht mehrere Zelltypen beteiligt wie beispielsweise bei der Nodulation oder Einkapselung. Auch bei älteren Drohnen, Arbeiterinnen und Königinnen ist zu beobachten, dass keine oder nur sehr wenige Noduli im Vergleich zu der Zahl bei frisch geschlüpften Arbeiterinnen, Drohnen oder Königinnen gebildet werden und trotzdem die Anzahl der koloniebildenden Einheiten bei Drohnen und Arbeiterinnen stark abnimmt (Tabelle 21, Tabelle 22). Winterbienen, die keine Noduli ausbilden (Tabelle 21), zeigen sogar eine besonders effektive Bakterienabwehr. Denn die Abnahme an koloniebildenden Einheiten ist bei ihnen stärker und schneller als bei Sommerbienen (Azzami 2011), und könnte mit ihrer konstitutiven Menge von IRp30, CE1 und Phenoloxidase in Zusammenhang stehen.

Während nach einer bakteriellen Infektion bei frisch geschlüpften Drohnen die Zahl der lebensfähigen Bakterien mit der Zeit abnimmt, steigt die Anzahl der Noduli pro Drohne an (Abb. 89). Dennoch wird deutlich, dass die Anzahl der Bakterien in der Haemolymph, die noch lebensfähig sind, nicht auf Null geht. Auch ist zu beobachten, dass die Nodulianzahl etwa 8-10 Stunden nach der *E.coli* Infektion eine Plateauphase erreicht. Aber die Abnahme der lebensfähigen Bakterien zeigt, dass schon in den ersten zwei Stunden nach Infektion ein Großteil der Bakterien aus der Haemolymph eliminiert wurde. Danach findet kaum noch eine Abnahme an koloniebildenden Einheiten statt.

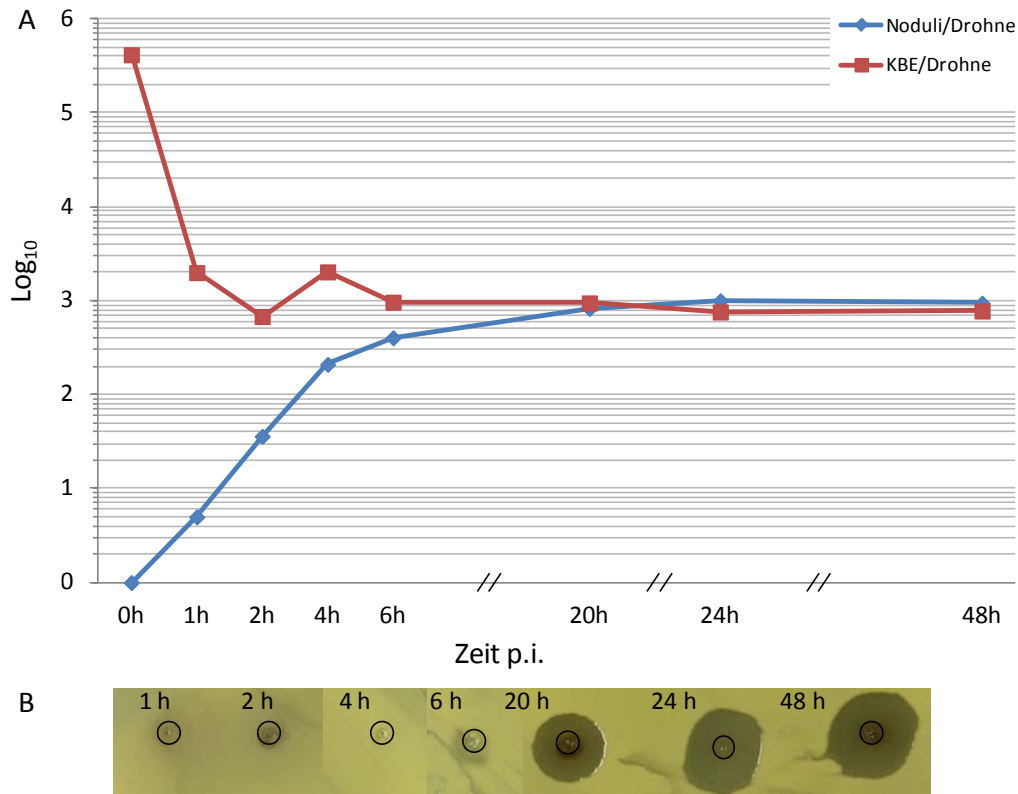


Abb. 89: Zeitlicher Verlauf der zellulären und humoralen Immunantwort nach Infektion junger adulter Drohnen (1d) mit  $4 \times 10^5$  E.coli Zellen. A) Abnahme lebensfähiger Bakterien (KBEs) und Bildung von Noduli; B) antibakterielle Aktivität der Haemolympe im Hemmhoftest

Antimikrobielle Peptide, die in der Haemolympe von Drohnenlarven und adulten Drohnen nachgewiesen werden konnten, tauchen frühesten 6-8 h p.i. auf (Abb. 44). Und auch die antibakterielle Wirkung der Haemolympe im Hemmhoftest konnte erst zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen werden (Abb. 44, Abb. 50B). Folglich fängt die humorale Immunantwort erst zu einem Zeitpunkt an Wirkung zu zeigen, wenn die zelluläre Immunantwort schon längst ihre Plateauphase erreicht hat (Abb. 89). Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen, die bei Untersuchungen mit dem Mehlkäfer *Tenebrio molitor* gemacht wurden. Dort sind innerhalb der ersten Stunde nach einer Infektion mit *S. aureus* 99,5 % der Bakterien aus der Haemolympe entfernt worden. Aber erst 12-48 h p.i. wird das Maximum bei der Synthese von AMPs erreicht (Haine et al., 2008). Und auch bei Larven von *Manduca sexta* wurde gefunden, dass es zu einer signifikanten Reduktion von lebensfähigen Bakterien nach Infektion mit drei unterschiedlichen Bakterien innerhalb der ersten Stunde p.i. kam. Danach kam es entweder zur kompletten Eliminierung der Bakterien oder aber zu deren Vermehrung und zum Tod der Wirtslarven (Dunn und Drake, 1983), ähnlich wie bei den Puppen der Honigbiene.

## 5.8 Entwicklungsspezifische Immunkompetenz

Während nach einer Infektion bei den Larven nur die AMPs hochreguliert werden, kommt es bei den adulten Drohnen noch zur Hochregulation weiterer immunspezifischer Proteine. Dies sind die hochmolekularen Immunfaktoren IRp30, CE 1, PGRP-S2 und zusätzlich noch das Peptidtoxin OCLP 1 (Abb. 51). Bei den Arbeiterinnen konnte schon gezeigt werden, dass die Larven außer den AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 keine weiteren humoralen Immunfaktoren nach einer Infektion mit *E.coli* bilden (Randolt et al., 2008). Es wurde weiterhin nachgewiesen, dass Larven weniger Hymenoptaecin exprimieren als adulte Arbeiterinnen und Drohnen (Chan et al., 2006). Auch die Aktivität der Phenoloxidase nimmt während der Entwicklung von Drohnen und Arbeiterinnen zum Adulttier hin zu (Laughton et al., 2011).

Für adulte Bienen der Honigbiene ist kein pathogenes Bakterium bekannt. Aber Larven sind dafür umso anfälliger, z.B. für die Amerikanische Faulbrut (AFB). Die Infektion mit *Paenibacillus larvae* erfolgt oral bei 12 bis 36 h alten Larven (Genersch, 2010b). Das Bakterium vermehrt sich dann zunächst massiv im Darm bevor es zum Durchbruch des Darmepithels kommt (Yue et al., 2008). Im Darm der Honigbienenlarven führen orale bakterielle Infektionen nicht zu einer Induktion von Immunproteinen (Geißendörfer, 2006), die das Bakterienwachstum hemmen könnten. Nach Durchbruch des Darmepithels gelangt eine enorme Anzahl von Bakterien ins Haemozoel, indem sie nur interzellulär zu finden sind (Yue et al., 2008). Diesem Ansturm ist dann weder das zelluläre noch das humorale Immunsystem der Larven bzw. Vorpuppen gewachsen. So zeigten Granulozyten und Makronukleuszellen bei leichten Infektionen mit *Paenibacillus larvae* phagozytische Größenzunahme, aber mit einem Anstieg der Infektion kam es zu einem Schrumpfen der Zellen (Zakaria, 2007).

Die Anfälligkeit von Larven gegenüber bakteriellen Erregern könnte auch damit zusammenhängen, dass Larven keine hochmolekularen Immunfaktoren exprimieren (Abb. 51) oder dass Larven nur mit einer schwachen Nodulationsreaktion reagieren (Abb. 64, Abb. 65). Aber auch ältere adulte Drohnen bilden nach einer Infektion kaum bzw. keine Noduli (Abb. 75). Im Kontrast dazu steht die beobachtete Abnahme der Koloniebildenden Einheiten, die in Larven (Abb. 32) und adulten Drohnen (Abb. 50) gleich stark ausgeprägt ist. Man könnte dies nun auf die Haemocytenzahl zurückführen, aber diese ist in Puppen am höchsten (Wilson-Rich et al., 2008), und wie bereits erwähnt nimmt die Bakterienanzahl nach Infektion zu und nicht ab (Abb. 35, Abb. 36, Abb. 38). Es wurde nachgewiesen, dass es im Vorpuppen und Puppenstadium zum Ausbruch der AFB kommt, die zuvor noch gehemmt werden konnte (Wedenig et al., 2003).

Die Haemocytenzahl ist in Larven höher als in Sammlerinnen (Wilson-Rich et al., 2008). Wohingegen die Haemocytenzahl in langlebigen Winterbienen, die bis zu 243 Tage alt werden können (Fluri, 1993), und in Ammenbienen höher ist als in Sammlerinnen (Amdam et al., 2004; Fluri et al., 1977). Ammen und Sammlerinnen oder vielmehr Sommerbienen können bis zu 70 Tage alt werden (Fluri, 1993) und Drohnen um die 6 Wochen (Fukuda und Ohtani, 1977). Allerdings ist die Gesamthaemocytenzahl untersucht worden und nicht die

Zusammensetzung der verschiedenen Haemozytentypen. So könnte die Zahl der phagozytisch aktiven Zellen in Larven und adulten Bienen höher sein und somit die Bakterienbekämpfung durch Phagozytose effektiver als in Drohnenpuppen. Für diese These spricht, dass Phagozytose bei Larven und adulten Honigbienen *in vitro* schon nachgewiesen werden konnte (Wienands und Madel, 1988; van Steenkiste, 1987).

## 5.9 Die Immunantwort von Arbeiterinnen und Drohnen der Honigbiene im Vergleich

Antimikrobielle Peptide (AMPs) werden im Fettkörper oder in Haemozyten exprimiert und in die Haemolymphe sekretiert, d.h. alle Analysen wurden daher mit Haemolympfproben durchgeführt. Die meisten Immunpeptide und Immunfaktoren sind in die Haemolymphe sekretierbar, so dass sie dort auch gefunden werden können.

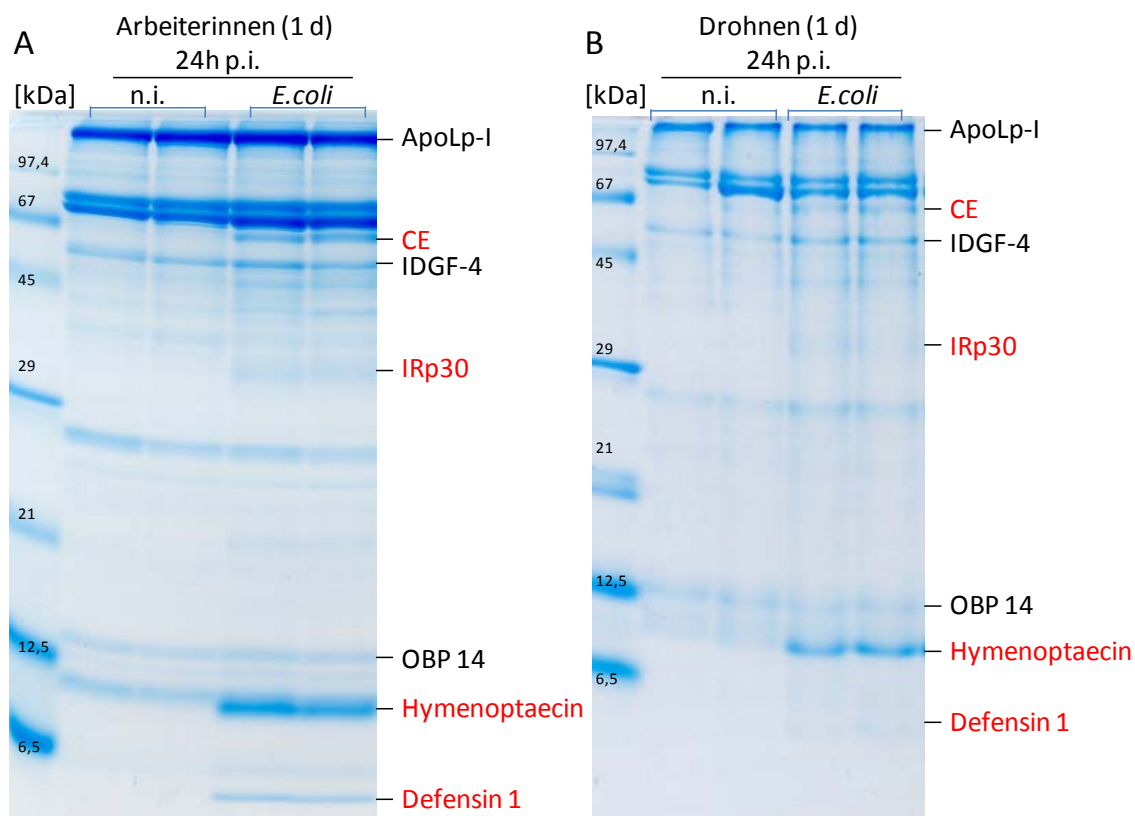


Abb. 90 Vergleich der Proteinmuster der Haemolymphe von frisch geschlüpften nicht infizierten Arbeiterinnen und Drohnen und nach Infektion mit *E.coli*. Die Haemolymphe wurde jeweils auf einem 15% PAA / 0.1 % SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie Blau G250 gefärbt.

Wie schon bei den adulten Arbeiterinnen der Honigbiene wurden nach bakterieller Infektion bei adulten Drohnen sowohl die AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1 als auch die Immunfaktoren IRp30, CE1, IRp42 und PGRP-S2 hochreguliert. In beiden Kästen konnte zudem nach Infektion das Peptidtoxin OCLP 1 im zweidimensionalen Polyacrylamidgel gefunden werden (Abb. 91). Dies bedeutet, dass die adulten Drohnen genauso wie die adulten Arbeiterinnen ein breites humorales Abwehrspektrum aufweisen.

Obwohl die Honigbiene verglichen mit den Mosquitos (*Anopheles*) und der Fruchtfliege (*Drosophila*) wenige Immungene besitzt (Evans et al., 2006; Viljakainen et al., 2009), zeigen Arbeiterinnen und Drohnen eine starke humorale Immunantwort. Vermutlich hängt das mit der hohen Rate an evolutionären Sequenzänderungen innerhalb dieser Immungene bei der Honigbiene und Ameisen zusammen (Viljakainen et al., 2009). Baer und Schmid-Hempel (2006) sehen in der Immunabwehr einen Schlüsselfaktor im Erfolg von sozialen Insekten. Aber diese haben nicht nur die humorale und zelluläre Immunantwort zur Pathogenabwehr, sondern auch die unterschiedlichen Barrieren der Sozialen Immunität.

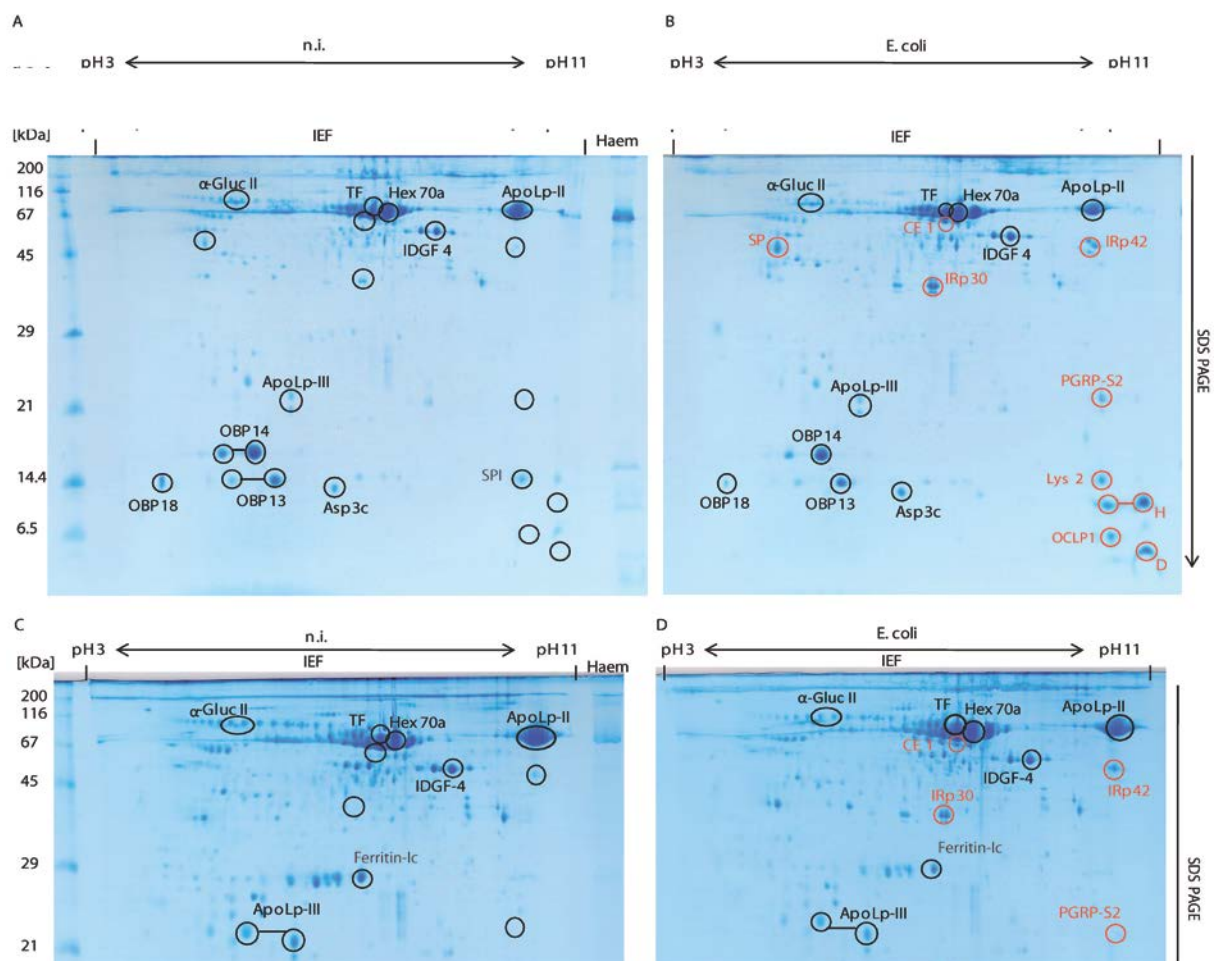


Abb. 91 Vergleich und Analyse der Proteinmuster der Haemolymphe von nicht infizierten und infizierten Drohnen (6 d) und Arbeiterinnen (14 d) mittels 2D-Gelelektrophorese. In A) und B) wurde die Haemolymphe von Drohnen aufgetrennt und in C) und D) die Haemolymphe von Arbeiterinnen. Infektionen: B) 24 h p.i. *E. coli* und D) 24 h p.i. LPS. Ausgewählte Spots wurden ausgeschnitten und mittels nano HPLC/MS analysiert. Leere Kreise geben die Positionen an, an denen nach einer Infektion Proteine Hochreguliert werden. Diese sind dann rot gekennzeichnet. 15 % PAA/0,1% SDS Gel, Laemmli, Coomassie Blau G250, 19cm. Haem = Haemolymphe; H = Hymenoptaecin; D = Defensin 1; SP = Serinprotease; TF = Transferrin; CE 1 = Carboxylesterase 1;  $\alpha$ -Gluc =  $\alpha$ -Glucosidase; Hex = Hexamerin; OBPs = Odorant binding Proteine; Lys 2 = Lysozym 2; ApoLp = Apolipoprotein; PGRP = Peptidoglycan recognition Protein; OCLP 1 =  $\omega$ -conotoxin-like Protein 1; SPI = Serin Protease Inhibitor; IDGF 4 = Imaginal disc growth factor 4; IRp = Immune responsive Protein.

Nach bakterieller Infektion sinkt sowohl bei den Arbeiterinnen als auch bei den Drohnen der Honigbiene die Haemolymphezuckerkonzentration im Gegensatz zu nicht infizierten Individuen ab. Nach *Nosema ceranae* Infektion wurde schon gefunden, dass die

Zuckerkonzentration in der Haemolymph absinkt (Mayack und Naug, 2010). Dadurch haben die infizierten Bienen weniger Energie z.B. zum Fliegen zur Verfügung. Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum kranke Bienen weniger häufig zum Stock zurückkommen (Higes et al., 2008; Kralj und Fuchs, 2010), da ihnen einfach die dazu nötige Energie fehlt. Die Immunantwort ist folglich für die Honigbiene sehr kostenintensiv, da zudem in einer Untersuchung von Lourenço und Kollegen (2009) gezeigt werden konnte, dass es nach einer bakteriellen Infektion zu einem Abbau von Speicherproteinen kommt. Desweiteren wird auch das assoziative Lernen durch eine Infektion negativ beeinflusst (Mallon et al., 2003).

### 5.10 Hummeln besitzen eine ähnliche Immunabwehr wie Honigbienen

In unterschiedlichen Hummelarten unter anderem in *Bombus ignitus* (Choi et al. 2008), in *Bombus pascuorum* (Rees et al., 1997) und in *Bombus terrestris* (Erler et al., 2011) konnten die vier AMPs Apidaecin, Abaecin, Defensin 1 und Hymenoptaecin nachgewiesen werden. Bei *B. terrestris* konnte zudem gezeigt werden, dass nach Injektion von LPS oder Laminarin zusätzlich zu den AMPs die Phenoloxidase hochreguliert wird (Korner und Schmid-Hempel, 2004).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, werden nach bakterieller Infektion von *Bombus terrestris* mit *E.coli* außer den AMPs Defensin 1 und Hymenoptaecin auch die hochmolekularen Immunfaktoren Carboxylesterase 1 und IRp30 wie bei der Honigbiene hochreguliert (Abb. 52, Abb. 55, Abb. 63). Die Hummel *Bombus terrestris* gehört zu den Apoidea wie die Honigbiene. So ist es nicht weiter verwunderlich, dass hier ein Homolog von IRp30 gefunden werden konnte (Albert et al., 2011). Nicht nur nach bakterieller Infektion werden CE 1 und IRp30 induziert, sondern auch nach Applikation von Laminarin und LPS. Allerdings wird nach PGN Injektion nur CE 1 stärker, nicht aber IRp30 exprimiert (Abb. 55). Scheinbar kommt es hier nicht zur Initiierung der Signalkaskade an deren Ende IRp30 gebildet wird.

Nach einer Infektion jeglicher Art kommt es zu einer antibakteriellen Aktivität der Haemolymph. Diese ist allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt, je nach Elizitor der Immunantwort, wobei sie nach *E.coli* am stärksten ist (Abb. 56B). Wiederum fällt auf, dass die Immunantwort auf das PGN, das Bestandteil von Zellwänden Gram-positiver Bakterien ist, bei der antibakteriellen Aktivität viel schwächer ist als die nach LPS, *E.coli* oder Laminarin. Andere Untersuchungen zeigen, dass die antibakterielle Aktivität auch 14 d nach Injektion von LPS oder Laminarin bei den Hummeln nicht nachlässt. Im Gegensatz dazu ist schon 5 d nach einer Ringerinjektion kein Hemmhof mehr vorhanden (Korner und Schmid-Hempel, 2004). Auch bei meinen Untersuchungen ließ die antibakterielle Aktivität nach Injektion von PBS, das eine Verwundung simulieren sollte, schon 48h p.i. drastisch nach (Abb. 56B).

Das Peptidtoxin OCLP 1 konnte erstmals auch bei der Hummel *Bombus terrestris* gefunden werden. Dieses weist große Homologie zu dem OCLP 1 der Honigbiene *Apis mellifera* auf (Abb. 53). Es wird vermutet, dass die APTs (Animale Peptidtoxine) zu denen OCLP 1 gehört, eine nahe evolutionäre Verwandtschaft zu den AMPs aufweisen (Kaplan et al., 2007). Also könnte die Expression von OCLP 1 nach Infektion bei *Apis mellifera* und *Bombus terrestris* über ähnliche Signalwege laufen wie die der AMPs.



Bei der Hummel *Bombus terrestris* werden die immuninduzierten AMPs Hymenoptaecin und Defensin 1, die hochmolekularen Immunfaktoren CE1 und IRp30 und das Peptidtoxin OCLP 1 als Antwort auf eine Infektion gebildet (Abb. 56). Diese Immunantwort fällt unterschiedlich stark aus je nach Auslöser der Infektion, da verschiedene Signalkaskaden zu deren Bildung führen. Die Hummel *Bombus terrestris* zeigt demnach eine ähnliche Immunantwort nach bakterieller Infektion wie adulte Honigbienen. Dabei ist auch für die Hummel die Immunantwort kostspielig, da es nach einer Infektion zu einem erhöhtem Futterkonsum (Tyler et al., 2006) und reduziertem Lernvermögen (Riddell und Mallon, 2004) im Vergleich zu gesunden Hummeln kommt. Das *Deformed Wing Virus* (DWV) der Honigbiene wurde auch bei Hummeln (*Bombus terrestris* und *Bombus pasuorum*) nachgewiesen und führt auch bei ihnen zu verkrüppelten Flügeln (Genersch et al., 2006). Dies zeigt, dass Hummeln und Honigbienen mitunter auch von den gleichen Pathogenen befallen werden.

Die zelluläre Immunantwort der Einkapselung von Fremdkörpern (Nylonfäden) war bei Hummeldrohnen signifikant geringer als bei Arbeiterinnen (Baer und Schmid-Hempel, 2006; Gerloff et al., 2003). Bei der Honigbiene zeigten hingegen die Drohnen bei der Nodulibildung eine stärkere zelluläre Immunantwort als die Arbeiterinnen. Aber in Hinblick auf die Eliminierung des bakteriellen Pathogens waren Drohnen und Arbeiterinnen gleich effektiv.

Bei der Hummel *Bombus terrestris* wurde in dieser Arbeit nur die starke humorale Immunantwort untersucht. Versuche zum zellulären Immunsystem insbesondere zur Nodulation bei *Bombus terrestris* müssten noch durchgeführt werden.

### 5.11 Soziale Wespen und solitäre Wildbienen zeigen kaum oder keine humorale Immunität

Weder die Sächsische Wespe *Dolichovespula saxonica* noch die Deutsche Wespe *Vespula germanica* haben eine humorale Immunantwort nach artifizieller *E.coli* Infektion in den von mir gemachten Untersuchungen gezeigt. Die Hochregulation von AMPs oder anderen Immunfaktoren wie IRp30 konnte bei den von mir untersuchten Wespen nicht gezeigt werden.

In der cDNA von *Vespula squamosa* konnte ein IRp30 Homolog gefunden werden. Obwohl mit speziellen Primern, die aus konservierten Regionen konstruiert wurden, die Wespe und Biene gemeinsam haben, die IRp30 cDNA Sequenz bei *Vespula germanica* und *Vespa mandarinia* erfolgreich amplifiziert werden konnte (Albert et al., 2011), wurde das IRp30 Protein dennoch nicht nach einer Infektion mit *E.coli* hochreguliert (Abb. 58). Auch bei den Papierwespen *P.canadensis* und *P.dominulus* konnte ein IRp30 Homolog im Genom identifiziert werden. Die Regulation und Funktion von IRp30 ist und bleibt dagegen unklar (Albert et al., 2011). Wie hier aber gezeigt werden konnte, scheint es bei Wespen kein immuninduziertes Protein zu sein.

Bei den Papierwespen *Polistes dominulus* wurde gezeigt, dass ihre Larven einen stärkeren Schutz gegen bakterielle Infektionen haben, wenn sie von *Xenos vesparum* parasitiert waren (Manfredini et al., 2010). Allerdings schwächen die Fächerflügler die erwachsenen Wespen nachhaltig. Bei *Polistes* konnte keine antimikrobielle Aktivität mittels Hemmhof nach *E.coli*

Infektion beobachtet werden (Manfredini et al., 2010) wie in meinen Untersuchungen mit *D.saxonica* (Abb. 57), und *V. germanica* (Abb. 59). Allerdings zeigte sich bei *P.dominulus* antibakterielle Aktivität nach Infektion mit einem Gram<sup>+</sup>-Bakterium (Manfredini et al., 2010). In dieser Arbeit wurden leider nur Infektionen mit dem Gram-negativen Bakterium *E.coli* durchgeführt.

Die solitären Wildbienen zeigen beim Hemmhoftest ein sehr uneinheitliches Bild (Abb. 62). Bei *Osmia rufa* kommt es zu einer leichten Braunfärbung um die Auftropfstelle, die bei Arbeiterinnen der Honigbiene und bei *Bombus terrestris* auf aktive Phenoloxidase zurückgeführt wird. Aber weder *Osmia rufa* noch *Osmia cornuta* bilden AMPs oder andere Immunfaktoren aus. Aber es könnte bei *Osmia rufa* zu einer leichten Expression von OCLP 1, einem Animal Peptidtoxin, das bei der Honigbiene *Apis mellifera* und der Hummel *Bombus terrestris* immuninduzierbar ist, gekommen sein, was aber noch zu bestätigen wäre.

Da die adulten Bienen der solitär lebenden *Osmia* keine oder kaum Immunkompetenz zu besitzen scheinen, wäre ein anderer Schutzmechanismus bei ihren Larven und Puppen zu vermuten. Wie ihn beispielsweise die Bienenwölfe haben, indem sie ihre Larven und Puppen durch eine Symbiose mit einem Bakterium schützen (Kroiss et al., 2010; Kaltenpoth et al., 2010). Aber es könnte auch sein, dass die Larven ein humorales Immunsystem besitzen. Weiter kann auch die zelluläre Immunantwort, die hier nicht untersucht worden ist, bei den *Osmia* besonders ausgeprägt sein. Da beim Hemmhoftest nicht wie bei den Wespen (Abb. 59) andere Bakterien an der Auftropfstelle gewachsen sind (Abb. 62), ist zu vermuten, dass auch andere Abwehrmechanismen aktiv sein könnten.

### 5.12 OCLP1, ein animales Peptidtoxin (APT) mit antimikrobiellen Eigenschaften

Bei der Honigbiene wurden von Kaplan und Kollegen (2007) 19 APT-ähnliche Proteine mit einem computergestützten Klassifizierprogramm gefunden. Davon haben 8 ein Signalpeptid wie für APTs erwartet. Zwei dieser Proteine sind bekannte Toxine des Bienengifts und zwar Apamin und MCDP, die als K<sup>+</sup>-Ionenkanal-Inhibitoren fungieren, wobei MCDP noch weitere Funktionen hat. Desweiteren wurden OCLP1 und Raalin bei dieser Analyse gefunden. OCLP1 hat große Sequenzähnlichkeit zu den Raubwanzentoxinen Ptu1, Ado1 und Iob1, die als spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanal-Inhibitoren fungieren und deren Faltung, der der ω-Conotoxine gleicht. Dieses Protein wurde in den Köpfen von Honigbienen nachgewiesen, also einem Teil der Biene, der normalerweise nicht mit Giften in Verbindung gebracht wird. Homologe Proteine von OCLP1 konnten auch in Organismen (z.B. *Anopheles gambiae*), die keine Gifte besitzen, identifiziert werden (Kaplan et al., 2007).

Das OCLP1 (ω-conotoxin-like Protein) konnte von mir in der Haemolymphe von Drohnenlarven (Abb. 28, Tabelle 20), adulten Drohnen (Abb. 48, Abb. 46, Tabelle 20), Arbeiterinnen und von Hummeln der Art *Bombus terrestris* (Abb. 52) nach einer bakteriellen Infektion oder der Applikation von Elizitoren (Abb. 46, Abb. 56) nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass OCLP 1 im Bienenhirn und nicht in der Giftdrüse exprimiert wird (Kaplan et al., 2007) und meine Beobachtungen, dass das OCLP 1 Peptid nach *E.coli*

Infektion induziert und in die Haemolymph sekretiert wird, läßt vermuten, dass es sich bei OCLP 1 um ein Peptidtoxin mit antimikrobiellen Eigenschaften und damit um eine neue Klasse von AMPs handelt.

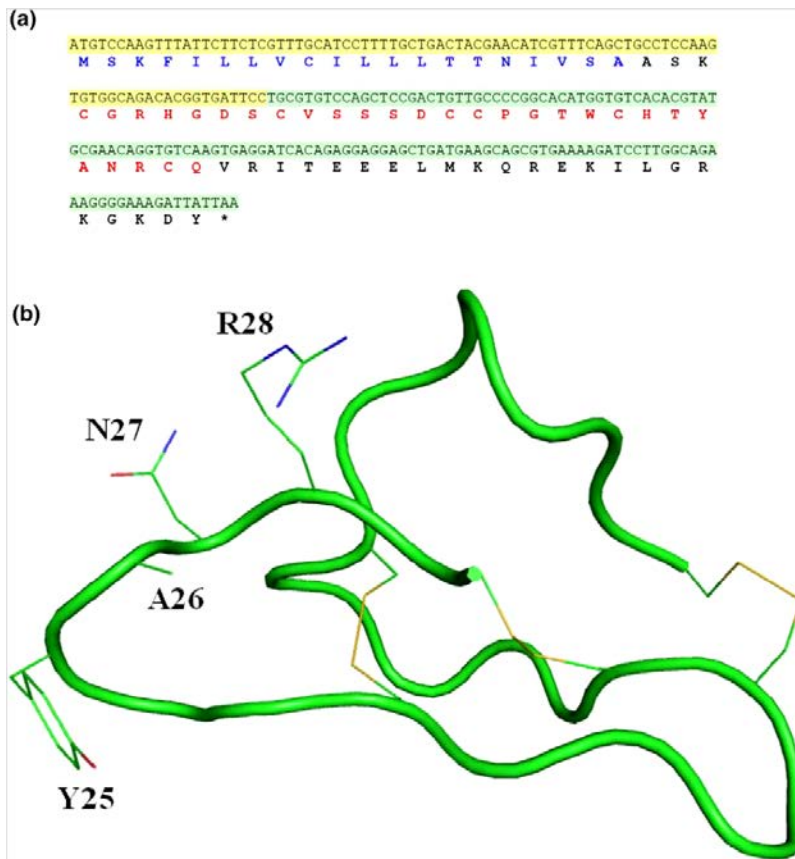


Abb. 92: Sequenz und voraussichtliche Struktur von OCLP 1 nach Kaplan et al. (2007). a) Grün und Gelb: erstes und zweites Exon, Blau: Signalpeptid (SignalP), Rot: Hauptpeptid und Schwarz dargestellt der verlängerte, unstrukturierte Endteil b) Seitenketten von sechs Cysteinresten (Disulfidbrücken in gelb) und die konservierte Region 25-28, die für OCLP 1 und Raubwanzentoxine einzigartig ist.

Nach einer Verletzung simuliert durch die Injektion von PBS wurde das OCLP1 analog zu IRp30 und Carboxylesterase nicht bei den adulten Drohnen und der Hummel hochreguliert (Abb. 46, Abb. 56). Das animale Peptidtoxin und die zwei hochmolekularen Immunfaktoren wurden aber nach bakterieller Infektion bei adulten Drohnen induziert. Bei Drohnenlarven wird hingegen nur das niedermolekulare OCLP1 nach bakterieller Infektion hochreguliert, nicht aber die Immunfaktoren IRp30 und Carboxylesterase (Abb. 27, Abb. 28).

Zhang und Kollegen (2010)

haben nach einer Parasitierung mit *Varroa* bei Vorpuppen der Honigbiene gefunden, dass das OCLP 1 Gen herunterreguliert wird. Somit bringen auch diese Autoren OCLP 1 in den Zusammenhang mit einer Immunreaktion. Allerdings stehen ihre Ergebnisse in starkem Widerspruch zu meinem Ergebnis. Denn das Toxinpeptid wurde in Larven nach einer Infektion stark hochreguliert, wohingegen es in der Haemolymph von nicht infizierten Larven nicht vorhanden war (Abb. 26, Abb. 28), wie durch MS/MS Analyse verifiziert werden konnte.

Bei OCLP1 handelt es sich um ein hochkonserviertes Peptid der Hymenopteren *Apis mellifera* und *Bombus terrestris* wie mittels Alignment (Abb. 53) nachgewiesen werden konnte. Zudem wurde mit einem multiplen Alignment gezeigt, dass es auch bei anderen Hymenopteren homologe Proteine gibt (Tabelle S4, Tabelle S5). Damit ist es dem IRp30 sehr ähnlich, das auch immuninduziert nur nach Infektionen und nicht schon nach Verletzungen auftaucht und innerhalb der Hymenopteren hoch konserviert ist (Albert et al., 2011).

### 5.13 *Nosema*, eine Darmerkrankung adulter Bienen

*Nosema cerana* ist das vorherrschende und virulentere Mikrosporidium verglichen mit *Nosema apis*. Dieses verursacht irreversible Schäden am Darmepithel der Bienen. Zusätzlich zu dieser direkten Schädigung kommt es zu einer Schwächung des Immunsystems nach *Nosema ceranae* Infektion (Antúnez et al., 2009). Hierdurch wird die schnelle Invasion des Darms durch *Nosema cerana* gefördert, aber auch die Virusvermehrung von bereits vorhandenen Viren, wie z.B. DWV, KBV kann gesteigert werden (Antúnez et al., 2009). Da unter natürlichen Bedingungen nicht ein einzelnes Pathogen in Reinform angreift, sondern immer mehrere Erreger vorhanden sind, wurde untersucht, ob *Nosema* z.B. Auswirkungen auf die Immunantwort der Honigbiene im Zusammenhang mit einer *E.coli* Infektion hat.

Bei meinen Versuchen war nur bei Individuen mit *Nosema cerana* Infektion, aber nicht bei den *E.coli* infizierten oder den nicht infizierten die prozessierte Form der Phenoloxidase zu beobachten. Zudem kam es bei gleichzeitiger Infektion von *Nosema cerana* und *E.coli* zu einer starken Expression von Defensin 1, Hymenoptaecin, OCLP 1 und IRp30. Diese Expression war noch dazu stärker ausgeprägt als nach einfacher *E.coli* Infektion (Abb. 84). Die starke Hochregulation von Defensin 1 und Hymenoptaecin nach der Doppelinfektion widerspricht den Resultaten von Antúnez et al. (2009) die keine höhere Genexpression von Defensin sieben Tage nach einer *Nosema cerana* Infektion fanden. Auch die Expression von Hymenoptaecin auf mRNA Ebene ging bei ihren Versuchen sieben Tage nach der Infektion eher nach unten. Bei *Nosema apis* Infektion kam es zu beiden Zeitpunkten nach der Infektion zu einer Hochregulierung der mRNA Expression von Hymenoptaecin und Defensin. Allerdings ist hier zu bemerken, dass die Autoren nur auf mRNA Ebene nach der Expression der AMPs geschaut haben und nicht auch auf Ebene der Synthese von Peptiden. Transkription und Translation und vor allem die Sekretion der AMPs in die Haemolymphe laufen in Insekten jedoch nicht immer synchron ab.

## 6. Zusammenfassung

Soziale Insekten wie die Honigbiene (*Apis mellifera*) besitzen ein breites Spektrum an Abwehrmechanismen gegen Pathogenbefall, sowohl auf der Ebene der Kolonie (soziale Immunität) als auch auf der Stufe des Individuums (angeborenes Immunsystem). Eine Bienenkolonie besteht in den frühen Sommermonaten aus ca. 50.000 Arbeiterinnen, einigen hundert Drohnen und einer einzigen Königin. Die Hauptaufgabe der relativ kurzlebigen Drohnen besteht in der Begattung von Jungköniginnen. Daher stellte sich die Frage, ob auch die Drohnen ähnlich den Arbeiterinnen mit energieaufwendigen Immunreaktionen auf Infektionen reagieren. Wie im Folgenden beschrieben, konnte ich nachweisen, dass Drohnen eine ausgeprägte Immunkompetenz besitzen. Die Honigbiene durchläuft als holometaboles Insekt eine Metamorphose vom Ei, über Larven- und Puppenstadien, bis zur Imago. Ich habe ein breites Spektrum an Immunreaktionen von Drohnenlarven, -puppen und adulten Drohnen untersucht und dabei festgestellt, dass sich die Immunkompetenz der drei Entwicklungsstadien beträchtlich unterscheidet.

Das angeborene Immunsystem setzt sich aus humoralen und zellulären Abwehrreaktionen zusammen. Bei der humoralen Immunantwort werden bestimmte evolutionär konservierte Signalkaskaden aktiviert, an deren Ende die Expression einer Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) und immunspezifischen Proteinen (IRPs) steht. Diese werden entweder von Fettkörperzellen oder von Haemozyten sekretiert und sind damit in der Haemolymphe entweder als Vorläuferproteine, die noch prozessiert werden müssen wie die Prophenoloxidase, oder als reife Endprodukte, vorhanden. Zur Analyse der humoralen Immunantwort wurden von mir zum einen Hemmhoftests durchgeführt, um die gesamte antimikrobielle Aktivität der Haemolymphe nach artifizieller Infektion zu ermitteln und zum anderen spezifische AMPs bzw. IRPs identifiziert. Hierzu wurden die Haemolympheproteine in ein- oder zwei-dimensionalen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und ausgewählte Proteinbanden bzw. -spots mittels nano HPLC/Massenspektrometrie analysiert.

Die Hauptkomponenten des zellulären Immunsystems sind Wundheilung, Phagozytose, Einkapselung und Nodulation. Diese zellulären Abwehrmechanismen zeichnen sich durch direkte Interaktion einzelner Haemozytentypen mit den eindringenden Pathogenen aus. In meiner Arbeit habe ich mich hauptsächlich auf die Nodulationsreaktion konzentriert und dabei zum ersten Mal Noduli bei infizierten Drohnen nachweisen können.

Frisch geschlüpfte adulte Drohnen (1d) weisen ein breites Spektrum an Immunreaktionen auf, das sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten umfasst.

Nach Infektion mit dem Gram-negativen Bakterium *E.coli* und verschiedenen bakteriellen Zellwandbestandteilen wie Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycan (PGN) und 1,3 $\beta$ -Glucan (Bestandteil von Pilzzellwänden), werden die AMPs Hymenoptaecin, Defensin 1 und Abaecin induziert. Desweiteren exprimieren junge adulte Drohnen eine Reihe hochmolekularer immunspezifischer Proteine (IRPs) wie z.B. Carboxylesterase (CE 1), eine Serinprotease, die

möglicherweise an der Prozessierung der Prophenoloxidase beteiligt ist, ein Peptidoglycan-interagierendes Protein (PGRP-S2) und zwei Proteine unbekannter Funktion, IRp42 und IRp30. Das IRp42 enthält Glycin-reiche Regionen und dürfte daher zu den Glycin-reichen Proteinen (GRPs) zählen, von denen bereits bekannt ist, dass sie in Pflanzen an der Pathogenabwehr beteiligt sind. Das IRp30, ein auf Hymenopteren beschränktes Protein, enthält eine Leucin-reiche Region und am C-terminalen Ende ein klassisches Leucin-Reißverschlusssmotiv und könnte daher Interaktionen mit anderen Proteinen, unter anderem mit Strukturen auf der Oberfläche von Pathogenen, eingehen.

Das bienenspezifische Lysozym 2, das ich in der Haemolymphe adulter Drohnen nach septischer Infektion gefunden habe, gehört wie auch das Lysozym 1 zu den chicken (c)-Typ Lysozymen, die in Insekten möglicherweise ein sehr breites Wirkungsspektrum sowohl gegen Gram-positive - und Gram-negative Bakterien als auch gegen Pilze haben.

Parallel zu bekannten bienenspezifischen AMPs wurde ein animales Peptidtoxin (APT) in Drohnenlarven, adulten Drohnen und adulten Hummeln nach *E.coli* Infektion in der Haemolymphe nachgewiesen. Von dem als OCLP 1 ( $\omega$ -conotoxin-like protein 1) benannten Peptid war bereits bekannt, dass es in Fischen paralytische und damit toxische Effekte auslöst. Meine Beobachtungen lassen vermuten, dass es sich bei OCLP 1 um ein Peptidtoxin mit antimikrobiellen Eigenschaften und damit um eine neue Klasse von AMPs handelt.

Die allgemeine humorale Immunkompetenz scheint während der gesamten Lebensspanne adulter Drohnen (~ 7 Wochen) konstant zu bleiben, wie durch die gleichbleibende antimikrobielle Aktivität im Hemmhoftest gezeigt wurde. Junge Drohnen reagieren auf eine *E.coli* Infektion mit der Bildung zahlreicher Noduli (~1000 Noduli/Drohn), die vor allem entlang des Herzschlauches zu finden sind. Diese zelluläre Immunantwort nimmt mit dem Alter der Drohnen ab, so dass bei 18 d alten Drohnen nur noch rund 10 Noduli/Drohn gefunden werden. Auf der anderen Seite nimmt die phagozytotische Aktivität bei älteren Drohnen scheinbar zu. Ermittelt man die verbleibende Anzahl an lebenden Bakterien, d.h. Koloniebildende Einheiten (KBEs) in der Haemolymphe zu verschiedenen Zeitpunkten nach *E.coli* Injektion, so habe ich festgestellt, dass die Anzahl an KBEs pro Drohn von  $\sim 10^5$  auf  $\sim 10^3$  bei jungen (1d) und bei 11 Tage alten Drohnen von  $\sim 10^5$  auf  $\sim 10^2$  abgenommen hat.

In diesem Zusammenhang ist eine von mir gemachte Beobachtung von großer Bedeutung. Die Proteinzusammensetzung der Haemolymphe adulter Drohnen ändert sich stark mit dem Alter. Dabei ist vor allem auffällig, dass Vitellogenin nur zwischen dem sechsten und zehnten Tag nach dem Schlupf in messbaren Mengen vorhanden ist, ganz im Gegensatz zu Arbeiterinnen und Königinnen, in denen die Menge an Vitellogenin mit zunehmendem Alter steigt. Daher wird Vitellogenin auch mit Langlebigkeit und Immunkompetenz in Verbindung gebracht. Diese Rolle kann Vitellogenin in Drohnen aufgrund der kurzen Zeitspanne und geringen Menge, in der es in der Haemolymphe vorhanden ist, nicht haben.

In einer Reihe von parallel laufenden Versuchsreihen konnte ich eindrucksvoll zeigen, dass zelluläre Immunreaktionen wie Phagozytose und Nodulation unmittelbar nach bakterieller

Infektion einsetzen. Hierbei erreicht die Nodulibildung 8-10 h p.i. eine Plateauphase, wohingegen die humorale Immunantwort erst 6 h p.i. schwach einsetzt, danach stetig zunimmt und noch 72 h p.i. nachweisbar ist.

Es ist mir gelungen, eine Methode zur künstlichen Aufzucht von Drohnenlarven zu etablieren. Diese ermöglichte konstante und sterile Versuchsbedingungen zur Untersuchung der Immunreaktionen von Larven. Nach Infektion mit *E.coli* reagieren Drohnenlarven mit einer starken Aktivierung ihrer humoralen Immunantwort durch die Expression von AMPs, jedoch werden keine hochmolekularen IRPs wie in adulten Drohnen hochreguliert. Zudem ist die Nodulibildung in Larven nur schwach ausgeprägt.

Völlig unerwartete Beobachtungen wurden beim Studium der Immunkompetenz von Drohnenpuppen gemacht. Das Gram-negative Bakterium *E.coli* wird generell als nichtpathogen für Bienen und andere Insekten eingestuft und tatsächlich habe ich gefunden, dass nach *E.coli* Injektion Drohnenlarven und adulte Drohnen keine äußerlich sichtbaren Krankheitssymptome aufweisen. Nach Injektion lebender *E.coli* Zellen in Drohnenpuppen stellte ich jedoch eine dramatische Veränderung im Aussehen der Puppen fest. Die Puppen verfärbten sich gräulich schwarz. Genauere Untersuchungen haben dann gezeigt, dass die Drohnenpuppen, wie auch die der Arbeiterinnen, offensichtlich keine zelluläre Abwehrreaktion aktivieren können und die humorale Immunantwort nur sehr schwach ausfällt und viel zu spät einsetzt. Aufgrund der fehlenden Immunkompetenz konnte sich *E.coli* ungehindert im Haemocoel vermehren und dadurch vermutlich einen tödlichen Kollaps der Puppen verursachen.

Es wurden auch Untersuchungen zur humoralen Immunreaktion der Hummel *Bombus terrestris* durchgeführt, die ebenso wie die Honigbiene zu den eusozialen Insekten zählt und nahe mit dieser verwandt ist. Nach *E.coli* Infektion kam es bei der Hummel zu einer starken Induktion der humoralen Immunreaktion in Form der Synthese von AMPs wie Defensin 1 und Hymenotaecin und darüber hinaus von IRPs wie Carboxylesterase und IRp30. Weder bei Wildbienen der Gattung *Osmia* noch den Wespen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden sind, kam es zu einer nachweisbaren humoralen Immunantwort

## 7. Summary

Social insects like honey bees (*Apis mellifera*) possess a wide range of defence mechanisms against pathogens on the colony level (social immunity) as well as on the individual level (innate immunity). In early summer, honey bee colonies consist of about 50.000 workers, a few hundred drones and one queen. The main task of the short-lived drones is to mate with a virgin queen. This raises a question: do drones, similar to workers mount an energy-intense immune reaction to fend off infections? In my thesis I could show that drones exhibit an effective immune competence. As holometabola, honey bees go through distinctive larval, pupal and adult stages. I have investigated a broad spectrum of immune responses in all three stages, and discovered huge differences between them.

The innate immune response is composed of a humoral and a cellular component. In the humoral immune response, evolutionally conserved signalling pathways are activated and lead to the induced synthesis of antimicrobial peptides (AMPs) and immune responsive proteins (IRPs). These are secreted into the haemolymph by the fat body or various haemocyte types. In order to analyse the humoral immune response, I conducted inhibition zone assays as well as one- and two-dimensional gelelectrophoresis. Afterwards, HPLC/MS was performed in order to identify specific protein spots.

Wound healing, phagocytosis, encapsulation and nodulation are the principal components of the cellular immune system. The cellular immune response is characterized through direct interaction of specific haemocyte types with invading pathogens. In my work, I was mainly interested in nodulation reactions, and I could ascertain this type of immune response in drones for the first time.

Newly emerged drones (1d) respond to infections with a wide range of immune reactions, including humoral and cellular defence mechanisms.

The AMPs hymenoptaecin, defensin 1 and abaecin are induced after infection with gram-negative *E.coli*, bacterial cell wall components like lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycan (PGN) and 1,3 $\beta$ -glucan (cell wall component of fungi). In addition, young drones express some high molecular immune responsive proteins (IRPs) like carboxylesterase (CE 1), a serine protease, that is potentially part of the prophenoloxidase activating system, further a peptidoglycan recognition protein (PGRP-S2) and with IRp30 and IRp42 two proteins of unknown function. IRp42 possibly belongs to the glycin-rich proteins (GRP) because of its glycin-rich regions. Glycin-rich proteins are known to participate in host defence in plants. IRp30 is a leucine-rich repeat containing protein with a C-terminal leucine zipper, which is common among Hymenoptera. Therefore it is possible for IRp30 to interact with other proteins, like cell wall structures of pathogens.

I detected the bee-specific lysozyme 2 in the haemolymph of adult drones after septic infection. It belongs to the chicken (c)-type lysozymes like lysozyme 1, which are potentially active against gram-positive and gram-negative bacteria and fungi in insects.



After *E.coli* infection, an animal peptide toxin (APT) was detected simultaneously to the known AMPs in the haemolymph of larvae, adult drones and adult bumble bees. It is known that this peptide, called OCLP 1 ( $\omega$ -conotoxin-like protein 1), triggers paralytic and thus toxic effects in fish. My observations suggest that OCLP 1 is probably a peptide toxin with antimicrobial characteristics, and thus could belong to a new class of AMPs.

Throughout their whole life ( $\sim 7$  weeks), adult drones maintain their immune competence. This was shown by the continuous antimicrobial activity of drone haemolymph in inhibition zone assays. After *E.coli* infection, young drones react with nodule formation ( $\sim 1000$  noduli/drone), which are mostly attached to the dorsal vessel. With increasing age, this type of cellular immune response weakens, so that 18d old drones only produce 10 noduli/drone. On the other hand, the phagocytic activity seems to increase in older drones. I found, that the remaining living bacteria, i.e. colony forming units (CFU) at different times post *E.coli* injection decreases. Indeed there is a decline of  $\sim 10^5$  to  $\sim 10^3$  CFU in young drones (1d) and from  $\sim 10^5$  to  $\sim 10^2$  CFU in 11 d old drones.

I observed, that the protein composition of the haemolymph of adult drones changes with age. This sheds a new light onto the role of vitellogenin in bees. Vitellogenin only appears between day six and day ten after emergence in measurable amounts in drones. In contrast, the amount of vitellogenin continuously rises in workers and queens with increasing age. Vitellogenin has been thought to play a role in longevity or immune competence. In drones, due to the short production period and the small amount of vitellogenin present in the haemolymph, this idea does not hold.

In an array of parallel tests, I showed the immediate onset of the cellular immune reactions phagocytosis and nodulation upon septic infections. Nodule formation reaches a plateau 8-10 h p.i., whereas humoral immune response just begins to start 6 h p.i., continuously rises and is still measurable 72 h p.i..

I succeeded in establishing a method for rearing honey bee drone larvae artificially. This enabled constant and sterile conditions for the testing of immune reactions in larvae. A strong activation of humoral immunity with the expression of AMPs resulted from *E.coli* infection, yet no immune responsive proteins were induced like in adult drones. Moreover, nodule formation in larvae is weak.

While studying immune competence of drone pupae, I made a surprising observation. I found that the gram-negative *E.coli*, generally thought to be non-pathogenic to bees and other insects, as expected caused no physical symptoms of disease in larvae and adult drones. But there is a dramatic change in the physical appearance of drone pupae after injecting living *E.coli* bacteria. They change colour to a greyish black. Precise examinations revealed that there is no cellular immune response in drone pupae as well as in worker pupae, only a weak humoral immune reaction which is initiated too late. Missing immune competence leads to an unregulated proliferation of *E.coli* and thus results presumably in a deadly collapse of the pupae.

Additionally, I carried out analyses of humoral immune reactions of the bumble bee (*Bombus terrestris*). The bumble bee is closely related to the honey bee and belongs also to the eusocial insects. After *E.coli* infection, I found a strong induction of humoral immune response: the synthesis of AMPs like defensin 1 and hymenoptaecin, and moreover of the IRPs carboxylesterase and IRp30. Neither in wild bees of the *Osmia* species nor in wasps could humoral immune reactions be observed during this study.

## 8. Literaturverzeichnis

- ALBERT, Š, KLAUDINY, J. UND ŠIMÚTH, J. (1999) Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 427-434.
- ALBERT, Š. UND KLAUDINY, J. (2004) The MRJP/YELLOWprotein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library. *J Insect Physiol* 50, 51-59.
- ALBERT, Š., GÄTSCHENBERGER, H., AZZAMI, K., GIMPLE, O., GRIMMER, G., FUJIYUKI, T., SUMNER, S., TAUTZ, J. UND MUELLER, M.J. (2011). Evidence of a novel immune responsive protein in the Hymenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 968-981.
- AMDAM, G. V., SIMÕES, Z.L.P., HAGEN, A., NORBERG, K., SCHRØDER, K., MIKKELSEN, Ø., KIRKWOODS, T.B.L. UND OMHOLT, S.W. (2004) Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Gerontol.* 39, 767-773.
- AMDAM, G.V., AASE, A. L. T. O., SEEHUUS, S.-C., FONDRK, M. K., NORBERG, K. UND HARTFELDER, K. (2005). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.* 40, 939-947.
- ANTÚNEZ, K., MARTIN-HERNÁNDEZ, R., PRIETO, L., MEANA, A., ZUNINO, P. UND HIGES, M. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiol.* 11, 2284-2290.
- ARONSTEIN, K.A. UND MURRAY, K.A. (2010) Chalkbrood disease in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S20-S29.
- AUPIENL, P., FORTINI, D., DUFOUR, H., TASEI, J.-N., MICHAUD, B., ODOUX, J.-F. UND PHAM-DELÈGUE, M.-H. (2005). Improvement of artificial feeding in a standart *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Buletin of Insectology* 58, 107-111
- AZZAMI, K., GÄTSCHENBERGER, H., GIMPLE, O., BEIER, H. UND TAUTZ, J. (2009) Do winter bees have an immune system that is weaker than that of summer bees? *Apidologie* 40, 660-661.
- AZZAMI, K. (2011) Antibakterielle und antivirale Abwehrreaktionen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Honigbiene (*Apis mellifera*). Dissertation, Universität Würzburg.
- BACHALI, S., JAGER, M., HASSANIN, A., SCHOENTGEN, F., JOLLÈS, P., FIALA-MEDIONI, A. UND DEUTSCH, J.S. (2002) Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J Mol Evol.* 54, 652-664.
- BAER, B. UND SCHMID-HEMPEL, P. (2006) Phenotypic variation in male and worker encapsulation response in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Ecol. Entomol.* 31, 591-596.
- BAILEY, L. UND BALL, B.V. (1991) Honey bee pathology. Second edition, *Academic Press*.

- BEDICK, J.C., PARDY, R.L., HOWARD, R.W. UND STANLEY, D.W. (2000) Insect cellular reactions to the lipopolysaccharide component of the bacterium *Serratia marcescens* are mediated by eicosanoids. *J Insect Physiol.* 46, 1481-1487.
- BEDICK, J.C., TUNAZ, H., NOR ALIZA, A.R., PUTNAM, S.M., ELLIS, M.D. UND STANLEY, D.W. (2001) Eicosanoids act in nodulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, *Apis mellifera*, but not in older foragers. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130, 107-117.
- BEHRENS, D., FORSGREN, E., FRIES, I. UND MORITZ, R.F.A. (2007). Infection of drone larvae (*Apis mellifera*) with American foulbrood. *Apidologie* 38, 281-288.
- BOOT, W.J., CALIS, J.N.M. UND BEETSMA, J. (1992) Differential periods of varroa mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Exp. Appl. Acarology* 16, 295-301.
- BRADFORD, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BRODSCHNEIDER, R., RIESSBERGER-GALLÉ, U. UND CRAILSHEIM, K. (2009) Flight performance of artificially reared honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 40, 441-449.
- BROUWERS, E.V.M., R. EBERT UND BEETSMA, J. (1987) Behavioural and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. *J. Apic. Res.* 26, 11–23.
- CALDERONE, N.W. UND KUENEN, L.P.S. (2001) Effects of western honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony, cell type, and larval sex on host acquisition by female *Varroa destructor* (Acari: Varroidea). *J. Economic Entomology* 94, 1022-1030.
- CASTEELS, P. AMPE, C., JACOBS, F. UND TEMPST, P. (1993) Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is injection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J Biol. Chem.* 268, 7044-7054.
- CASTEELS, P. AMPE, C., RIVIERE, L., DAMME VAN, J., ELICONE, C., FLEMMING, M., JACOBS, F. UND TEMPST, P. (1990) Isolation and characterization of abaecin, major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* 187, 381-386.
- CASTEELS, P., AMPPE, C., JACOBS, F., VAECK, M. UND TEMPST, P. (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J* 8:2387-2391.
- CASTEELS-JOSSON, K., ZHANG, W., CAPACI, T., CASTEELS, P. UND TEMPST, P. (1994) Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *J Biol Chem.* 269, 28569-28575.

- CERENIUS, L., LEE, B. L. UND SÖDERHÄLL, K. (2008) The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology* 29, 263-271.
- CHAN, Q.W.T., HOWES, C. G. UND FOSTER, L.J. (2006) Quantitative Comparison of caste differences in Honeybee haemolymph. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 2252-2262.
- CHOI, Y.S., CHOO, Y.M., LEE, K. S., YOON, H. J., KIM, I., JE, Y. H., SOHN, H.D. UND JIN, B.R. (2008) Cloning and expression profiling of four antibacterial peptide genes from the bumblebee *Bombus ignites*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 150, 141-146.
- COFFEY, M.F., BREEN, J., BROWN, M. J. F. UND McMULLAN, J. B. (2010) Brood-cell size has no influence on the population dynamics of *Varroa destructor* mites in the native western honey bee, *Apis mellifera mellifera*. *Apidologie* 41, 522-530.
- CORONA, M., VELARDE, R. A., REMOLINA, S., MORAN-LAUTER, A., WANG, Y., HUGHES, K. A. UND ROBINSON, G.E. (2007) Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7128-7133.
- COUVILLON, M.J. UND DORNHAUS, A. (2009) Location, location, location: larvae position inside the nest is correlated with adult size in worker bumble-bees (*Bombus impatiens*). *Proc. R. Soc. B* 276, 2411-2418.
- DEAN, P., GADSDEN, J.C., RICHARDS, E.H., EDWARDS, J.P., CHARNLEY, A.K. UND REYNOLDS, S.E. (2002) Modulation by eicosanoid biosynthesis inhibitors of immune responses by the insect *Manduca sexta* to the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* 79, 93-101.
- DUNN, P.E. UND DRAKE, D.R. (1983) Fate of bacteria injected into naïve and immunized larvae of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *J. Invert. Pathol.* 41, 77-85.
- DURMUŞ, Y., BÜYÜKGÜZEL, E., TERZI, B., TUNAZ, H., STANLEY, D. UND BÜYÜKGÜZEL, K. (2008) Eicosanoids mediate melanotic nodulation reactions to viral infection in larvae of the parasitic wasp, *Pimpla turionellae*. *J. Insect Physiol.* 54, 17-24.
- ENGSTRÖM, Y. (1999) Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 345-358.
- ERLER, S., POPP, M. UND LATTORFF, H.M.G. (2011) Dynamics of immune system gene expression upon bacterial challenge and wounding in a social insect (*Bombus terrestris*). *PLoS ONE* 6(3): e18126.
- EVANS, J.D., ARONSTEIN, K., CHEN, Y.P., HETRU, C., IMLER, J.-L., JIANG, H., KANOST, M., THOMPSON, G.J., ZOU, Z. UND HULTMARK, D. (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 15, 645-656.

- FLURI, P. (1993) Die Regulation der Lebensdauer bei Bienenarbeiterinnen. Schweiz. Bienenztg. 116, 624-629.
- FLURI, P., WILLE, H., GERIG, L. UND LÜSCHER, M. (1977) Juvenile hormone, vitellogenin and haemocyte composition in winter worker honeybees. *Experientia* 33, 1240-1241.
- FORSQVIST, E. (2010) European foulbrood in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S5-S9
- FOURNIER, D., BRIDE, J.M., POIRE, M., BERGE, J.-B. UND PLAPP, F.W. (1992) Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.* 267, 1840-1845.
- FREE, J.B. (1956) The food of adult drone honeybees (*Apis mellifera*). *Br. J. Anim. Behav.* 5, 7-11.
- FRIES, I. UND CAMAZINE, S. (2001) Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie* 32, 199-214.
- FRIES, I., IMDORF, A. UND ROSENKRANZ, P. (2006) Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie* 37, 564-570.
- FUCHS, S. (1990) Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud in colonies of *Apis mellifera carnica*. *Apidologie* 21, 193-199.
- FUKUDA, H. UND OHTANI, T. (1977) Survival and lifespan of drone honeybees. *Res. Popul. Ecol.* 19, 51-68.
- GARCIA, E.S., MACHADO, E.M.M. UND AZAMBUJA, P. (2004) Effects of Eicosanoid biosynthesis on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the haemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rageli*. *J. Insect Physiol.* 50, 157-165.
- GEIßENDÖRFER, J. (2006) Konstitutiv und transient exprimierte Immunproteine in Larven der Honigbienen (*Apis mellifera* L.). Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- GENERSCH, E., ASHIRALIEVA, A. UND FRIES, I. (2005). Strain- and Genotype-specific difference in virulence of *Paenibacillus larvae subsp. larvae*, a bacterial pathogen causing *American foulbrood* disease in honeybees. *Appl. Environmental Microbiol.* 71, 7551-7555.
- GENERSCH, E., YUE, C., FRIES, I. UND DE MIRANDA, J.R. (2006) Detection of deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 61-63.
- GENERSCH, E. (2010a) Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 87-97.

- GENERSCH, E. (2010b) American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. J. Invertebr. Pathology 103, S10-S19.
- GENERSCH, E. UND AUBERT, M. (2010) Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Vet. Res. 41:54.
- GERLOFF, C.U., OTTMER, B.K. UND SCHMID-HEMPPEL, P. (2003) Effects of inbreeding on immune response and body size in a social insect, *Bombus terrestris*. Functional Ecol. 17, 582-589.
- GISDER, S., AUMEIER, P. UND GENERSCH, E. (2009) Deformed wing virus (DWV): viral load and replication in mites (*Varroa destructor*). J. Gen. Virol. 90, 463-467.
- GOTO, A. UND KURATA, S. (2006) The multiple functions of the PGRP family in *Drosophila* immunity. Inv. Surv. J. 3, 103-110.
- GOULSON, D. (2010) Bumblebees: behavior, ecology, and conservation. 2nd edn; Oxford University Press; Oxford; New York.
- GROH, C., TAUTZ, J. UND RÖSSLER, W. (2004) Synaptic organization in adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. Proc. Natl. Acad. Soc. USA 101, 4268-4273.
- GULLAN, P.J. UND CRANSTON, P.S. (1994) The Insects: An Outline of Entomology. Chapman & Hall, London.
- HAINÉ, E.R., MORET, Y., SIVA-JOTHY, M.T. UND ROLFF, J. (2008) antimicrobial defense and persistent infection in insects. Science 322, 1257-1259.
- HARRISON, J.M. (1987) Roles of individual honeybee workers and drones in colonial thermogenesis. J. Exp. Biol. 129, 53-61.
- HERTER, E.K. (2010) Inaktivierung von Genen in Larven der Honigbiene *Apis mellifera* mittels RNA-Interferenz. Diplomarbeit Universität Würzburg.
- HIGES, M., MARTIN, R. UND MEANA, A. (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. J. Invertebr. Pathol. 92, 93-95.
- HIGES, M., MARTIN-HERNÁNDEZ, R., BOTIAS, C., BAILÓN, E.G., GONZÁLEZ-PORTO, A.V., BARRIOS, L., NOZAL, M.J.D., BERNAL, J.L. JIMÉNEZ, J.J., PALENCIA, P.G. UND MEANA, A. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environmental Microbiol. 10, 2659-2669.
- HINTERMEIER, H. UND HINTERMEIER, M. (2009) Bienen, Hummeln, Wespen im Garten und in der Landschaft. Obst- und Gartenbauverlag.

- HIRTZ, N. (2011) Beiträge zur Ernährungsbiologie der Drohnen (*Apis mellifera*). Bachelorarbeit Universität Würzburg.
- HOFFMANN, J. A. (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38.
- HOWARD, R.W., MILLER, J.S. UND STANLEY, D.W. (1998) The influence of bacterial species and intensity of infections on nodule formation in insects. *J. Insect Physiol.* 44,157-164.
- HRASSNIGG, N. UND CRAILSHEIM, K. (2005), Differences in drone and worker physiology in honeybee (*Apis Mellifera*), *Apidologie* 36, 255-277.
- JAY, S. (1963). The development of honeybees in their cells. *J. Apic. Res.* 2, 117-134.
- JOHNSON, B.J., LE, T.T.T., DOBIN, C.D., BANOVIC, T., HOWARD, C.B., LEON FLORES, F. DE M., VANAGS, D., NAYLOR, D. J., HILL, G.R. UND SUHRBIER, A. (2005) Heat shock Protein 10 inhibits Lipopolysaccharid-induced inflammatory mediator production. *J. Biol. Chem.* 280, 4037-4047.
- KALLBERG, Y., OPPERMAN, U., JÖRNVAL, H. UND PERSSON, B. (2002) Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: A large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. *Protein Science* 11, 636-641.
- KALTENPOTH, M., SCHMITT, T., POLIDORI, C., KOEDAM, D. UND STROHM, E. (2010) Symbiotic streptomycetes in antennal glands of south american digger wasp genus *Trachypus* (Hymenoptera, Crabronidae). *Physiol. Entomol.* 35, 196-200.
- KAPLAN, N., MORPURGO, N. UND LINIAL, M. (2007) Novel families of toxin-like peptides in insects and mammals: A computational approach. *J. Mol. Biol.* 369, 553-566.
- KLOSE, J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 231-243.
- KONRAD, M., VYLETA, M.L., THEIS, F.J., STOCK, M., TRAGUST, S., KLATT, M., DRESCHER, V., MARR, C., UGELVIG, L.V. UND CREMER, S. (2012) Social Transfer of Pathogenic Fungus Promotes Active Immunisation in Ant Colonies. *PLoS Biol.* 10(4): e1001300.
- KORNER, P. UND SCHMID-HEMPEL, P. (2004) *In vivo* dynamics of an immune response in the bumble bee *Bombus terrestris*. *J Invertebr. Pathol.* 87, 59-66.
- KOVAC, H., STABENTHEINER, A. UND BRODSCHNEIDER, R. (2009) Contribution of honeybee drones of different age to colonial thermoregulation. *Apidologie* 40, 82-95.
- KRALJ, J. UND FUCHS, S. (2010) *Nosema* sp. Influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie* 41, 21-28.



- KROISS, J., KALTENPOTH, M., SCHNEIDER, B., SCHWINGER, M.-G., HERTWECK, C., MADDULA, R.K., STROHM, E. UND SVATOŠ (2010) Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. *Nature Cem. Biol.* 6, 261-263.
- KUBOTA, M., TSUJI, M., NISHIMOTO, M., WONGCHAWALIT, J., OKUYAMA, M., MORI, H., MATSUI, H., SURARIT, R., SVASTI, J., KIMURA, A. UND CHIBA, S. (2004). Localization of  $\alpha$ -glucosidases I, II, and III in organs of european honeybees, *Apis mellifera* L., and the origin of  $\alpha$ -glucosidase in honey. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 68,2346-2352.
- KUNIEDA, T., FUJIYUKI, T., KUCHARSKI, R., FORET, S., AMENT, S.A., TOTH, A.L., OHASHI, K., TAKEUCHI, H., KAMIKOUCHI, A., KAGE, E., MORIOKA, M., BEYE, M., KUBO, T., ROBINSON, G.E. UND MALESZKA, R. (2006) Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Mol. Biol.* 15, 563-576.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LAUGHTON, A.M., BOOTS, M. UND SIVA-JOTHY, M.T. (2011) The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *J Insect Physiol.* 57, 1023-1032.
- LAVINE, M.D. UND STRAND, M. R. (2002) Insect hemocytes and their role in cellular immune responses. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1237-1242.
- LEMAITRE, B., REICHART, J.-M. UND HOFFMANN, J. A. (1997) *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94, 14614-14619.
- LEMAITRE, B. UND HOFMANN, J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697-743.
- LOURENÇO, A.P., ZUFELATO, M.S., BITONDI, M.M.G., UND SIMÕES, Z.L.P. (2005) Molecular characterization of cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 35, 541-552.
- LOURENÇO, A.P., MARTINS, J.R., BITONDI, M.M.G., UND SIMÕES, Z.L.P. (2009) Trade-off between immune stimulation and expression of storage protein genes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 71, 70-87.
- LOW, W. Y., NG, H.L., MORTON, C.J., PARKER, M.W., BATTERHAM, P. UND ROBIN, C. (2007). Molecular evolution of glutathione S-transferases in the genus *Drosophila*. *Genetics* 177, 1363-1375.

- MA, C. UND KANOST, M. R. (2000) A  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. J. Biol. Chem. 275, 7505-7514.
- MANFREDINI, F., BEANI, L., TAORMINA, M. UND VANNINI, L. (2010). Parasitic infection protects wasp larvae against a bacterial challenge. Microbes and Infection 12, 727-735.
- MANGEON, A., JUNQUIERA, R.M. UND SACHETTO-MARTINS, G. (2010) Functional diversity of plant glycine-rich proteins superfamily. Plant Signaling & Behavior 5,99-104.
- MALLON, E.B., BROCKMANN, A. UND SCHMID-HEMPEL, P. (2003) Immune response inhibits associative learning in insects. Proc. R. Soc. Lond. B 270, 2471-2473.
- MARMARAS, V.J. UND LAMPROPOULOU, M. (2009) Regulators and signaling in insect haemocyte immunity. Cellular Signalling 21, 186-195.
- Mayack, C. und Naug, D. (2010) Parasitic infection leads to decline in haemolymph sugar levels in honeybee foragers. J. Insect Physiol.
- MILLER, J.S., HOWARD, R.W., RANA, R.L., TUNAZ, H. UND STANLEY, D.W. (1999) Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of the cricket, *Gryllus assimilis*. J. Insect Physiol. 45, 75-83
- MOUSAVI, A. UND HOTTA, Y. (2005) Gycin-Rich Proteins A Class of Novel Proteins. Appl. Biochem. Biotechn. 120, 169-174.
- NAPPI, A.J. UND CHRISTENSEN, B.M. (2005) Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. Insect. Biochem Mol. Biol. 35, 443-459.
- NITSCHMANN, J. UND HÜSING, J.O. (1987) Lexikon der Bienenkunde. tosa Verlag.
- O'FARRELL, P. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.
- OTVOS, L., O, I., ROGERS, M.E., CONSOLVO, P. J. CONDIE, B. A., LOVAS, S., BULET, P. UND BLASZCYK-THURIN, M. (2000) Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. Biochemistry 39, 14150-14159.
- PECH, L.L., TRUDEAU, D. UND STRAND, M.R. (1994) Separation and behavior in vitro of hemocytes from the moth, *Pseudoplusia includens*. Cell Tissue Res. 277, 159-167.
- PECH, L.L. UND STRAND, M.R. (1995) Encapsulation of foreign targets by hemocytes of the moth *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) involves an RGD-dependend cell adhesion mechanism. J. Insect Physiol. 41,481-488.
- PENG, Y. C., MUSSEN, E., FONG, A., MAONTAGUE, M. A. UND TYLER, T. (1992) Effects of chlortetracycline of honey bee worker reared *in vitro*. J. Invertebr. Pathol. 60, 127-133.

- PERSSON, B., BRAY, J.E., BRUFORD, E., DELLAPORTA, S.L., FAVIA, A.D., GONZALEZ DUARTE, R., JÖRNVALL, H., KALLBERG, Y., KAVANAGH, K.L., KEDISHVILI, N., KISIELA, M., MASER, E., MINDNICH, R., ORCHARD, S., PENNING, T.M., THORNTON, J.M., ADAMSKI, J. UND OPPERMANN, U. (2009) The SDR ( short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem. Biol. Interact.* 178, 94-98.
- POHL, F. (1995) *Bienenkrankheiten, Diagnose und Behandlung.* Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin.
- PRUSKO, C. (2006) Evolutionary diversification of protein functions: from translation in prokaryotes to innate immunity in invertebrates. Dissertation, Universität Würzburg.
- RANDOLT, K., GIMPLE, O., GEISSENDÖRFER, J., REINDERS, J., PRUSKO, C., MUELLER, M. J. ALBERT, S., TAUTZ, J. UND BEIER, H. (2008) Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 69:155-167.
- REES, J.A., MONIATTE, M. UND BULET, P. (1997) Novel antibacterial peptides isolated from a European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27, 413-422.
- REHM, H. UND LETZEL, T. (2010) *Der Experimentator, Proteinbiochemie/Proteomics*, 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- RHODES, J.W., HARDEN, S., SPOONER-HART, R., ANDERSON, D.L. UND WHEEN, G. (2011) Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie* 42, 29-38.
- RIDDELL, C.E. UND MALLON, E.B. (2006) Insect psychoneuroimmunology: Immune response reduces learning in protein starved bumblebees (*Bombus terrestris*). *Brain, Behav., Immun.* 20, 135-138.
- RÖSELER, F. (2005) *Der Hummelgarten. Lebensraum und Biologie der Hummel.* TRIGA Verlag Gelnhausen.
- SCHÄGGER, H. UND VON JAGOW, (1987) Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoreses for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- SCHMID, M.R., BROCKMANN, A., PIRK, C.W.W., STANLEY, D.W. UND TAUTZ, J. (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *J. Insect Physiol.* 54, 439-444.
- SCHMID-HEMPEL, R. UND SCHMID-HEMPEL, P. (1998) Colony performance and immunocompetence of a social insect, *Bombus terrestris*, in poor and variable environments. *Funct. Ecol.* 12, 22-30.

- SCHMITZOVÁ, J., KLAUDINY, J., ALBERT, Š., SCHRÖDER, W., SCHRECKENGOST, W., HANES, J., JÚDÓVA, J. UND ŠIMÚTH, J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L.. Cell. Mol. Life Sci. 54, 1020-1030.
- SCOCCHI, M., TOSSI, A. UND GENNARO, R. (2011) Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. Cell. Mol. Life Sci. 68, 2317-2330.
- SEEHUUS, S.-C., NORBERG, K., GIMSA, U., KREKLING, T., AMDAM, G.V. (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 103, 962-967.
- SEELEY, T.D. (1995) Honigbienen. Birkhäuser Verlag Berlin.
- SHIPMANN, B.A., RYAN, R.O., SCHMIDT, J. O. UND LAW, J.H. (1987) Purification and properties of a very high density lipoprotein from the haemolymph of the honeybee *Apis mellifera*. Biochemistry, 26: 1885-1889.
- SIMONE, M., EVANS, J.D. UND SPIVAK, M. (2009) Resin collection and social immunity in honey bees. Evolution 63, 3016-3022.
- SÖDERHÄLL, K UND CERENIUS, L. (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr. Opin. Immunol. 10, 23-28.
- SPAETHE, J. UND WEIDENMÜLLER, A. (2002) Size variation and foraging rate in bumblebees (*Bombus terrestris*). Insectes soc. 49, 142-146.
- STANLEY, D. W. (2011) Eicosanoids: progress towards manipulating insect immunity. J. Appl. Entomol. 135, 534-545.
- STANLEY, D. W. UND MILLER, J.S. (2006) Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. Entomologia Experimentalis et Applicata 119, 1-13.
- STEENKISTE VAN, D. (1987-1988) De Hemocyten von de Honingbij (*Apis mellifera* L.) Proefschrift, Faculteit der Wetenschappen Rijksuniversiteit Gent.
- STEINER, H. (2004) Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. Immunol. Rev. 198, 83-96.
- STRAND, M.R. (2008) The Insect cellular immune response. Insect science 15, 1-14.
- SUGUMARAN, M., DUGGARAJU, R., GENEROZOVA, F., UND ITO, S. (1999). Insect melanogenesis. II. Inability of Manduca phenoloxidase to act on 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. Pigment Cell Res. 12, 118-125.
- TABER S. (1964) Factors influencing the circadian flight rhythm of drone honey bees, Annu. Entomol. Soc. Amer. 57, 769-775
- TAUTZ, J. (2007) Phänomen Honigbiene. Spektrum Akademischer Verlag

- THOMAS, A. (2008) Untersuchung verschiedener Aspekte des Immunsystems der Honigbiene (*Apis mellifera carnica*) bezüglich unterschiedlicher Fütterungsansätze. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- TRENCZEK, T. (1998). Endogenous defense mechanisms of insects. *Zoology* 101, 298-315.
- TRENCZEK, T., ZILLIKENS, A. UND ENGELS, W. (1989). Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 35, 475-481.
- TUNAZ, H., İŞIKBER, A.A. UND ER, M.K. (2003) The role of eicosanoids in nodulation reactions to bacterium *Serratia marcescens* in larvae of *Ostrinia nubilalis*. *Turk J. Agric For* 27, 269-275.
- TYLER, E.R., ADAMS, A. UND MALLON, E.B. (2006) An immune response in the bumblebee, *Bombus terrestris* leads to increased food consumption. *BMC Physiol.* 6:6.
- VILJAKAINEN, L., EVANS, J.D., HASSELMANN, M., RUEPPEL, O., TINGEK, S UND PAMILO, P. (2009) Rapid evolution of immune proteins in social insects. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1791-1801.
- WEDENIG, M., RIESSBERGER-GALLÉ, U. UND CRAILSHEIM, K. (2003) A substance in honey bee larvae inhibits the growth of *Paenibacillus* larvae larvae. *Apidologie* 34, 43-51.
- WEGENER, J., BIENEFELD, K. (2007) Eine Methode zur *in vitro*-Aufzucht von Drohnen, Poster AG Tagung Liebenwalde.
- WEIDENMÜLLER, A. (2004) The control of nest climate in bumblebee (*Bombus terrestris*) colonies: interindividual variability and self reinforcement in fanning response. *Behav. Ecol.* 15, 120-128.
- WERREN, J. H. UND LOEHLIN, D.W. (2009). The parasitoid wasp *nasonia*: an emerging model system with haploid male genetics. *Cold Spring Harb Protoc.* pdb.emol134. doi:10.1101.
- WESTRICH, P. (2011) Wildbienen: Die anderen Bienen, Pfeil Verlag.
- WIENANDS, A. UND MADEL, G. (1988) Hämozyten der Honigbiene, *Apis mellifera*, und ihre Veränderungen durch Varroatose (Hymenoptera: Apidae) *Entomol. Gener.* 14, 81-92.
- WILSON-RICH, N., DRES, S.T. UND STARKS, P.T. (2008) The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 54, 1392-1399.
- WINSTON, M.L. (1987) The biology of the honey bee. Harvard University Press London.
- WITT, R. (2009) Wespen. Oldenburg, Vademecum-Verlag.

- YANG, X. UND COX-FOSTER, D.L. (2005) Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7470-7475.
- YU, F., MAO, F. UND JIANKE, L. (2010) Royal jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. *J. Prot. Res.* 9, 2207-2215.
- YUE, D., NORDHOFF, M., WHIELER, L.H. UND GENERSCH, E. (2008) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 10, 1612-1620.
- ZAKARIA, M.E. (2007) The cellular immunity responses in the haemolymph of honey bee workers infected by American foulbrood disease (AFB). *J. Appl. Sci. Res.* 3, 56-63.
- ZHANG, Y., LIU, X., ZHANG, W. UND HAN, R. (2010). Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. *J. Insect Physiol.* 56, 1207-1218.
- ZUFELATO, M. S., LOURENÇO, A. P., SIMÕES, Z. L. P., JORGE, J. A. UND BITONDI, M.M.G. (2004) Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1257-1268.

## 9. Anhang

### 9.1 Haemolymphproteine von Honigbiendrohnen

Es wurden Proteinbanden aus SDS Gelen mittels nano HPLC/MS analysiert.

Tabelle S1: Charakterisierung von Proteinen der Haemolymph von Drohnenlarven, -puppen und adulten Drohnen.

| Protein   | Accession (NCBI) | MW                    | pI            | SP | Exprimiert in: |       |       |
|---|------------------|-----------------------|---------------|----|----------------|-------|-------|
|   |                  |                       |               |    | Larve          | Puppe | Adult |
| Apolipoporphin I                                  | 328780884        | 200933,9              | 8,65          | -  |                |       | +     |
| Vitellogenin                                      | 58585104         | 201047,7/<br>199405,5 | 6,29/<br>6,29 | 16 |                |       | +     |
| VHDL (HP 175)                                     | 110762106        | 175689,4              | 6,57          | -  | +              | +     |       |
| Hexamerin 110                                     | 155369750        | 112187,7/<br>110339,3 | 6,43/<br>6,37 | 16 | +              | +     |       |
| Similar to trehalose 6-phosphate synthase         | 156547621        | 89751/<br>88896       | 6,74/<br>6,74 | 7  |                | +     |       |
| Neuropeptide Y receptor like CG 5811              | 110764421        | 87333,4 /<br>85168,6  | 8,79/<br>8,79 | 19 | +              |       |       |
| Apolipoporphin II (1-747)                         | 66513966         | 82899,2               | 9,22          | -  | +              |       | +     |
| Hexamerin 70a                                     | 160425209        | 81487,0 /<br>79090,1  | 6,43/<br>6,56 | 21 | +              | +     | +     |
| Hexamerin   | 149939405        | 81372/<br>79533       | 8,19/<br>8,02 | 19 |                | +     |       |
| Hexamerin 70c                                     | 148887477        | 81372,3 /<br>79215,9  | 8,19/<br>8,20 | 19 | +              | +     |       |
| ProPo   | 58585196         | 80094,0               | 6,28          | -  |                |       | +     |
| Hexamerin 70b                                     | 58585148         | 79529,3 /<br>77047,5  | 6,72/<br>6,60 | 21 | +              | +     |       |
| Transferrin                                       | 58585086         | 78657,3 /<br>75759,8  | 6,77/<br>6,60 | 25 |                |       | +     |
| Toll-like receptor 13 like isoform CG5195 → HP 75 | 110755367        | 75705,4 /<br>73990,2  | 6,09/<br>6,09 | 17 |                |       | +     |
| Heat shock protein cognate 4                      | 229892210        | 71085                 | 5,42          | -  |                | +     |       |
| α-Glucosidase II                                  | 94400901         | 66567,6/<br>64376,9   | 5,84/<br>5,84 | 21 |                |       | +     |
| Carboxylesterase 1 (CG4382)                       | 66512983         | 65249,3 /<br>63326,9  | 6,11/<br>6,01 | 18 |                |       | +     |

| Protein   | Accession (NCBI)                   | MW                   | pI            | SP | Exprimiert in: |       |       |
|---|------------------------------------|----------------------|---------------|----|----------------|-------|-------|
|   |                                    |                      |               |    | Larve          | Puppe | Adult |
| Similar to Glucose-6-Phosphate (GPI) (Phosphoglucose isomerase) (PGI) (Phosphohexose isomerase) (PHI) | 66499293                           | 62967,4              | 7,73          | -  |                |       | +     |
| Phosphoglucomutase  | 66561330                           | 61958                | 6,06          | -  |                | +     |       |
| 60 kDa heat shock protein, mitochondrial-like   | 66547450                           | 60412/<br>57918      | 5,64/<br>5,25 | 21 |                | +     |       |
| t-complex protein 1 subunit epsilon   | 66522349                           | 59414                | 5,70          | -  |                |       |       |
| UGP CG4347  | 66536233                           | 58253,9              | 7,68          | -  |                |       | +     |
| t-complex protein 1 subunit beta-like   | 66533395                           | 57902                | 6,22          |    |                | +     |       |
| Proteindisulfide-isomerase-like   | 66546657                           | 55856/<br>53574      | 5,57/<br>5,57 | 18 |                | +     |       |
| Pyruvate kinase CG7070  | 66548684                           | 55814,6              | 6,93          | -  |                |       | +     |
| Hypothetical protein LOC725960  | 110755329                          | 52003/<br>49859      | 4,56/<br>4,53 | 20 |                | +     |       |
| Similar to lethal(1) G003CG3861   | 66521738                           | 51930,0              | 9,07          | -  |                |       | +     |
| HP 51/HP41  | 110761334                          | 51302,1 /<br>48767,9 | 4,59/<br>4,44 | 22 |                |       | +     |
| MRJP II   | 58585108                           | 51073,5 /<br>49191,1 | 6,83/<br>6,65 | 17 |                |       | +     |
| IDGF-4  | 66514614                           | 48741,2 /<br>46226,0 | 8,06/<br>7,25 | 23 | +              |       |       |
| Serine protease (CG5390)  | 110758534 (alt)<br>328776929 (neu) | 45503,5 /<br>4353,9  | 5,37/<br>5,20 | 18 |                |       | +     |
| Phosphoglycerate kinase   | 110763826                          | 44991,9              | 8,15          | -  |                |       | +     |
| Dehydrogenase   | 66514540                           | 44804,2              | 6,76          |    |                | +     |       |
| Beta-ureidopropionase   | 66513629                           | 42957                | 5,6           | -  |                | +     |       |
| Yippee interacting Protein  | 48097100                           | 42503,9 /<br>34587,7 | 8,89/<br>7,11 | 75 |                | +     |       |
| Actin 5c  | 48137684                           | 41805,7              | 5,30          | -  |                | +     | +     |
| IRp42 Hypothetical Protein  | 66519003                           | 41491,2              | 9,3           | -  |                |       | +     |
| Enolase CG17654   | 110761968                          | 40149,0              | 5,51          | -  |                |       | +     |



| Protein   | Accession (NCBI) | MW                | pI         | SP | Exprimiert in: |       |       |
|---|------------------|-------------------|------------|----|----------------|-------|-------|
|   |                  |                   |            |    | Larve          | Puppe | Adult |
| Arginine kinase   | 58585146         | 40008,3           | 5,66       | -  |                |       | +     |
| Aldolase CG6058-PF<br>= Fructose-bisphosphate aldolase-like | 110748949        | 39600,2           | 7,57       | -  |                | +     | +     |
| Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase                     | 488142692        | 35883,2 / 27186,1 | 8,12/ 7,78 | 78 |                |       | +     |
| Phosphoglycerate mutase 2-like                              | 66550890         | 35360             | 9,36       | -  |                | +     |       |
| Hypothetical Protein LOC 724216                             | 110756101        | 33003             | 5,86       | -  |                | +     |       |
| Thioredoxin1-like isoform 1                                 | 66524108         | 31651             | 4,94       | -  |                |       |       |
| Voltage-dependent anion-selective channel                   | 66521459         | 30482             | 8,25       | -  |                |       |       |
| IRp30 (reticulon-4 receptor-like)                           | 66507096         | 30421,1/ 28698,9  | 6,36/ 6,05 | 17 |                |       | +     |
| HP 31   | 110750159        | 30392,2 / 27349,5 | 5,52/ 5,26 | 28 |                |       | +     |
| Take-out-carrier protein                                    | 58585222         | 29212/ 26800      | 8,49/ 7,72 | 21 |                |       |       |
| SDR Short chain dehydrogenase/reductase                     | 58585184         | 27191,9           | 5,24       | -  |                | +     |       |
| Heat shock protein beta-1-like isoform 1                    | 110757651        | 25565             | 6,01       | -  |                | +     |       |
| 60S ribosomal protein L 13 isoform 1                        | 66551967         | 25302             | 10,93      | -  |                |       |       |
| Ferritin 2 light chain homologue CG1469                     | 66524161         | 25185,7/ 23475,5  | 6,10/ 6,11 | 16 | +              |       |       |
| Peroxiredoxin   | 66535082         | 25133,7           | 5,88       | -  |                | +     |       |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like                    | 66534750         | 22809,1/ 18465    | 9,27/ 7,93 | 39 |                | +     |       |
| Peptidoglycan-recognition protein SA                        | 254910928        | 21489/ 19242      | 7,67/ 7,19 | 19 |                | +     |       |
| ApoLp III like Protein                                      | 166795901        | 21348/ 19447,6    | 5,48/ 5,45 | 17 | +              | +     |       |
| Probable signal peptidase complex subunit 2-like            | 48097144         | 21300             | 5,86       | -  |                |       |       |

| Protein   | Accession (NCBI)        | MW                   | pI            | SP | Exprimiert in: |       |       |
|---|-------------------------|----------------------|---------------|----|----------------|-------|-------|
|   |                         |                      |               |    | Larve          | Puppe | Adult |
| PGRP-S2 (CG14745)   | (66522804)<br>254910931 | 21550,6 /<br>19385,8 | 8,94/<br>8,95 | 19 |                |       | +     |
| Programmed cell death protein 6-like isoform 3                | 48094929                | 20609                | 4,89          | -  |                | +     |       |
| Uncharacterized protein CG16817-like                          | 66547438                | 20122                | 4,32          | -  |                | +     |       |
| Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor homolog   | 66533332                | 20068/<br>17838      | 7,46/<br>7,64 | 21 |                | +     |       |
| Globin 1  | 118150510               | 19543                | 8,63          | -  |                | +     |       |
| Glutathione peroxidase-like 1                                 | 295842195               | 19156                | 7,63          | -  |                | +     |       |
| Hypothetical Protein LOC725712 isoform 1                      | 110766777               | 18893                | 9,83          | -  |                | +     |       |
| Low molekular weight phosphotyrosine protein phosphatase-like | 110766109               | 18328                | 8,66          | -  |                | +     |       |
| 60S ribosomal protein L21                                     | 110767298               | 18315                | 10,64         | -  |                | +     |       |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1        | 66563115                | 18051                | 6,97          | -  |                | +     |       |
| 60S ribosomal protein L12                                     | 66564518                | 17917                | 9,71          | -  |                | +     |       |
| 40S ribosomal protein S10-like isoform 1                      | 48106363                | 17875                | 9,84          | -  |                | +     |       |
| Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a                          | 66531797                | 17866                | 9,83          | -  |                | +     |       |
| Prefoldin subunit 5-like                                      | 48102645                | 17756                | 4,77          | -  |                | +     |       |
| GST S1  | 66534655                | 17700,1              | 5,4           | -  |                | +     |       |
| 40S ribosomal protein s18                                     | 66548968                | 17661                | 10,31         | -  |                | +     |       |
| Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial                | 48095960                | 1762/<br>14034       | 5,64/<br>4,81 | 30 |                | +     |       |
| Eukaryotic translation initiation factor 5A-like              | 110767655               | 17592                | 5,19          |    |                | +     |       |

| Protein   | Accession (NCBI) | MW                   | pI              | SP  | Exprimiert in: |       |       |
|---|------------------|----------------------|-----------------|-----|----------------|-------|-------|
|   |                  |                      |                 |     | Larve          | Puppe | Adult |
| 60S ribosomal Protein L14                                       | 66565929         | 17505                | 10,74           | -   |                | +     |       |
| 40S ribosomal Protein S19a-like                                 | 48140499         | 17342                | 10,43           | -   |                | +     |       |
| Ferritin 1<br>Ferritin heavy chain<br>homologue CG2216          | 110762641        | 17351,3/<br>15179,6  | 5,79/<br>5,53   | 19  | +              |       |       |
| 40S ribosomal protein S13                                       | 66562243         | 17210/<br>13988      | 10,36/<br>10,21 | 29  |                | +     |       |
| Microsomal<br>gluthathione S-<br>transferase 1 isoform<br>1     | 48094957         | 17121/<br>14465      | 9,74/<br>9,79   | 24  |                | +     |       |
| Lysozyme isoform 1  | 66565246         | 17081/<br>14095      | 4,73/<br>4,83   | 27  |                | +     |       |
| CCHC-type zinc finger<br>protein CG3800-like                    | 110759374        | 17060                | 8,63            | -   |                | +     |       |
| C1q-like venom<br>protein precursor                             | 221325614        | 17042/<br>15008      | 6,04/<br>6,95   | 19  |                |       | +     |
| 40S ribosomal protein S 16                                      | 110756571        | 16877                | 10,20           | -   |                | +     |       |
| Protein NPC2<br>homolog   | 110756965        | 16793                | 6,10            | -   |                | +     |       |
| 60S ribosomal protein L27a                                      | 66526748         | 16739                | 10,54           | -   |                | +     |       |
| Ubiquitin-conjugating<br>enzyme E2 variant 2-<br>like isoform 1 | 48138568         | 16359                | 6,58            | -   |                | +     |       |
| HP 16<br>(Protein NPC<br>homolog)                               | 110756609        | 16122,8 /<br>13774,9 | 7,54/<br>7,73   | 21  | +              | +     |       |
| lysozyme c-1  | 110762162        | 16037/<br>13775      | 9,07/<br>9,09   | 21  |                |       | +     |
| 60S ribosomal protein L28                                       | 66552169         | 15756/<br>2495       | 11,32/<br>11,22 | 115 |                | +     |       |
| Superoxide dismutase<br>1                                       | 295849268        | 15633                | 6,21            | -   |                | +     |       |
| FABP-like protein   | 58585214         | 15549                | 5,46            | -   |                | +     | +     |
| 40S ribosomal protein S 17                                      | 110748820        | 15377                | 9,83            | -   |                | +     |       |
| OBP 15  | 94158668         | 15217,7 /<br>13586,6 | 6,10 /<br>5,66  | 16  | +              |       |       |
| OBP 14  | 94158822         | 15200,7 /<br>13517,5 | 5,71 /<br>5,41  | 16  | +              | +     | +     |

| Protein   | Accession (NCBI) | MW  | pI                                   | SP                    | Exprimiert in: |       |       |
|---|------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|----------------|-------|-------|
|   |                  |   |                                      |                       | Larve          | Puppe | Adult |
| OBP 13  | 94158810         | 15104,5 /<br>13222,0                        | 6,37 /<br>5,67                       | 17                    |                | +     | +     |
| FABP  | 58585202         | 15035                                       | 6,36                                 | -                     |                |       | +     |
| OBP 18  | 94158830         | 15000,3/<br>13363,2                         | 4,59/<br>4,51                        | 16                    |                |       | +     |
| ASP 3c =<br>Chemosensory<br>protein 3 precursor     | 58585106         | 14954,4 /<br>13013,8                        | 7,56 /<br>6,80                       | 19                    | +              |       | +     |
| 40S ribosomal protein<br>S 15Aa-like isoform 3      | 110755382        | 14762                                       | 10,07                                | -                     |                | +     |       |
| Thioredoxin domain-<br>containing protein 17        | 48104995         | 14566                                       | 5,39                                 | -                     |                | +     |       |
| Cytochrome b5-like<br>isoform 1                     | 110759577        | 14496                                       | 5,1                                  | -                     |                | +     |       |
| Hymenoptaecin                                       | 58585174         | 14492,4 /<br>12636/<br>10286,4              | 9,44 /<br>9,47/<br>9,85              | 17<br>19 <sup>1</sup> | +              | +     | +     |
| 60S ribosomal protein<br>L31                        | 48142237         | 14231                                       | 10,49                                | -                     |                | +     |       |
| Profilin  | 147902613        | 13802,7                                     | 5,64                                 | -                     |                | +     |       |
| Histone H2B.3-like                                  | 110749558        | 13693                                       | 10,39                                | -                     |                |       | +     |
| 40S ribosomal protein<br>20                         | 110766823        | 13676                                       | 9,95                                 | -                     |                | +     |       |
| 40S ribosomal protein<br>S25 isoform 1              | 110756725        | 13435                                       | 10,37                                | -                     |                | +     |       |
| 60S ribosomal protein<br>L30 isoform 1              | 66543659         | 12544                                       | 9,84                                 | -                     |                | +     |       |
| FABP-like protein                                   | 5114221          | 12024                                       | 4,90                                 | -                     |                | +     | +     |
| Thioredoxin-2<br>isoform 2                          | 48104680         | 12016                                       | 4,82                                 | -                     |                | +     |       |
| 60S acidic ribosomal<br>protein P2                  | 110765226        | 11999/<br>10291                             | 4,50/<br>4,34                        | 16                    |                | +     |       |
| Cytochrom C   | 353338           | 11771                                       | 9,50                                 | -                     |                |       | +     |
| 10 kDa heat shock<br>protein,<br>mitochondrial-like | 66547447         | 11403                                       | 8,01                                 | -<br>18mTP            |                |       | +     |
| Defensin 1  | 37703274         | 10717,4 /<br>8572,6/<br>5582,4 <sup>1</sup> | 6,27 /<br>5,89/<br>8,64 <sup>1</sup> | 19<br>24 <sup>1</sup> | +              |       |       |
| Protein transport<br>protein Sec61 subunit<br>beta  | 110755262        | 9991/<br>7642                               | 11,00/<br>9,99                       | 24                    |                | +     |       |

| Protein                                 | Accession (NCBI) | MW            | pI            | SP | Exprimiert in: |       |       |
|---|------------------|---------------|---------------|----|----------------|-------|-------|
|   |                  |               |               |    | Larve          | Puppe | Adult |
| Cytochrom b-c 1 complex subunit 8-like  | 110751008        | 9312/<br>4626 | 9,75/<br>5,43 | 42 |                | +     |       |
| OCLP 1 = Hypothetical protein LOC725074 | 110756431        | 8297/<br>6122 | 8,77/<br>8,63 | 20 | +              |       | +     |
| Chymotrypsin inhibitor                  | 5902765          | 5972          | 4,77          | -  |                | +     |       |

In der Tabelle wurden die NCBI-Accession-Nummern (gi-Nummern) verwendet, die bei der nano HPLC/MS Analyse ermittelt wurden. Änderungen wurden vorgenommen, wenn ein Protein zu einem späteren Zeitpunkt unter anderer Nummer oder Namen nochmals identifiziert worden ist und wenn die Aminosäuresequenz des Proteins exakt mit der Ursprünglichen übereinstimmte. Die molekulare Masse (MW) und der Isoelektrischer Punkt (pI) wurden mithilfe von ExPASy/ProtParam erhalten. Voraussagen für vorhandene Signalpeptide (SP) und Spaltstellen wurden mit dem TargetP Programm ermittelt. Die Obere Zahl gibt jeweils den Wert mit Signalpeptid und die Untere ohne Signalpeptid an. Bei den AMPs Hymenoptacin und Defensin 1 wurde zudem die Preprosequenz<sup>1</sup> (Casteels-Josson et al., 1994) entfernt.

## 9.2 Statistik zum Vergleich der Noduligröße bei der Honigbiene

Tabelle S2: T-test der Nodulidurchmesser ( $\mu\text{m}$ ) bei Honigbienenköniginnen, Arbeiterinnen und Drohnen, durchgeführt mit Statistica 9.2

|                              | Mittelw. Gruppe1 | Mittelw. Gruppe2 | t-Wert   | FG   | p        | Gült. N Gruppe1 | Gült. N Gruppe2 | Stdabw. Gruppe1 | Stdabw. Gruppe2 | F-Quot. Varianzen | p Varianzen |
|------------------------------|------------------|------------------|----------|------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------|
| Arbeiterinnen vs. Königinnen | 20,25621         | 15,41184         | 10,26162 | 582  | 0,000000 | 280             | 304             | 6,959823        | 4,218007        | 2,722587          | 0,000000    |
| Arbeiterinnen vs. Drohnen    | 20,25621         | 13,38244         | 20,92148 | 1420 | 0,000000 | 280             | 1142            | 6,959823        | 4,285358        | 2,637680          | 0,000000    |
| Königinnen vs. Drohnen       | 15,41184         | 13,38244         | 7,3619   | 1444 | 0,000000 | 304             | 1142            | 4,218007        | 4,285358        | 1,032190          | 0,743100    |
| Königinnen vs. Arbeiterinnen | 15,41184         | 20,25621         | -10,2616 | 582  | 0,000000 | 304             | 280             | 4,218007        | 6,959823        | 2,722587          | 0,000000    |
| Drohnen vs. Königinnen       | 13,38244         | 15,41184         | -7,3619  | 1444 | 0,000000 | 1142            | 304             | 4,285358        | 4,218007        | 1,032190          | 0,743100    |
| Drohnen vs. Arbeiterinnen    | 13,38244         | 20,25621         | -20,9215 | 1420 | 0,000000 | 1142            | 280             | 4,285358        | 6,959823        | 2,637680          | 0,000000    |

Tabelle S3: Statistische Tests zu den Durchmessern von Noduli durchgeführt mit GraphPad Prism

|  |                        |                        |                        |         |                  |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|---------|------------------|
| One-way analysis of variance               |                        |                        |                        |         |                  |
| P value                                    | < 0,0001               |                        |                        |         |                  |
| P value summary                            | ****                   |                        |                        |         |                  |
| Are means signif. different? (P < 0.05)    | Yes                    |                        |                        |         |                  |
| Number of groups                           | 3                      |                        |                        |         |                  |
| F  | 232,1                  |                        |                        |         |                  |
| R square                                   | 0,2122                 |                        |                        |         |                  |
| Bartlett's test for equal variances        |                        |                        |                        |         |                  |
| Bartlett's statistic (corrected)           | 136,6                  |                        |                        |         |                  |
| P value                                    | < 0,0001               |                        |                        |         |                  |
| P value summary                            | ****                   |                        |                        |         |                  |
| Do the variances differ signif. (P < 0.05) | Yes                    |                        |                        |         |                  |
| ANOVA Table                                |                        |                        |                        |         |                  |
|  | SS                     | df                     | MS                     |         |                  |
| Treatment (between columns)                | 10739                  | 2                      | 5370                   |         |                  |
| Residual (within columns)                  | 39859                  | 1723                   | 23,13                  |         |                  |
| Total                                      | 50598                  | 1725                   |                        |         |                  |
| Tukey's Multiple Comparison Test           |                        |                        |                        |         |                  |
|  | Mean Diff,             | q                      | Significant? P < 0,05? | Summary | 95% CI of diff   |
| Drohn vs Arbeiterin                        | -6,874                 | 30,31                  | Yes                    | ***     | -7,630 to -6,118 |
| Drohn vs Königin                           | -2,029                 | 9,246                  | Yes                    | ***     | -2,761 to -1,298 |
| Arbeiterin vs Königin                      | 4,844                  | 17,2                   | Yes                    | ***     | 3,906 to 5,783   |
| Bonferroni's Multiple Comparison Test      |                        |                        |                        |         |                  |
|  | Mean Diff,             | t                      | Significant? P < 0,05? | Summary | 95% CI of diff   |
| Drohn vs Arbeiterin                        | -6,874                 | 21,43                  | Yes                    | ****    | -7,642 to -6,105 |
| Drohn vs Königin                           | -2,029                 | 6,538                  | Yes                    | ****    | -2,773 to -1,286 |
| Arbeiterin vs Königin                      | 4,844                  | 12,16                  | Yes                    | ****    | 3,890 to 5,799   |
| Kruskal-Wallis test                        |                        |                        |                        |         |                  |
| P value                                    | < 0,0001               |                        |                        |         |                  |
| Exact or approximate P value?              | Gaussian Approximation |                        |                        |         |                  |
| P value summary                            | ****                   |                        |                        |         |                  |
| Do the medians vary signif. (P < 0.05)     | Yes                    |                        |                        |         |                  |
| Number of groups                           | 3                      |                        |                        |         |                  |
| Kruskal-Wallis statistic                   | 285,7                  |                        |                        |         |                  |
| Dunn's Multiple Comparison Test            |                        |                        |                        |         |                  |
|  | Difference in rank sum | Significant? P < 0,05? | Summary                |         |                  |
| Drohn vs Arbeiterin                        | -538,8                 | Yes                    | ***                    |         |                  |
| Drohn vs Königin                           | -226,3                 | Yes                    | ***                    |         |                  |
| Arbeiterin vs Königin                      | 312,5                  | Yes                    | ***                    |         |                  |

### 9.3 Alignment von OCLP 1 Proteinsequenzen bei Hymenopteren

Nachdem OCLP 1 in *Apis mellifera* und *Bombus terrestris* gefunden worden waren, wurde eine Blastsuche auf NCBI durchgeführt.

Tabelle S4: Ergebnisse 1-6 aus Blastsuche auf NCBI

| Accession                      | Description   | Max score            | Total score | Query coverage | E value |
|--------------------------------|---|----------------------|-------------|----------------|---------|
| <a href="#">XP_001120252.1</a> | PREDICTED: hypothetical protein LOC725074<br>[ <i>Apis mellifera</i> ]  | <a href="#">154</a>  | 154         | 100%           | 9e-49   |
| <a href="#">XP_003395762.1</a> | PREDICTED: hypothetical protein LOC100644886<br>[ <i>Bombus terrestris</i> ] >ref XP_003395763.1 <br>PREDICTED: hypothetical protein LOC100644886 [Bombus terrestris] >ref XP_003395764.1  PREDICTED: hypothetical protein LOC100644886 [Bombus terrestris] | <a href="#">112</a>  | 112         | 100%           | 3e-32   |
| <a href="#">EFZ18410.1</a>     | hypothetical protein SINV_07967<br>[ <i>Solenopsis invicta</i> ]  | <a href="#">102</a>  | 102         | 100%           | 6e-28   |
| <a href="#">XP_001600083.1</a> | PREDICTED: hypothetical protein LOC100117759<br>[ <i>Nasonia vitripennis</i> ]  | <a href="#">97.8</a> | 97.8        | 100%           | 4e-26   |
| <a href="#">EFN67538.1</a>     | hypothetical protein EAG_16219<br>[ <i>Camponotus floridanus</i> ]  | <a href="#">73.9</a> | 73.9        | 59%            | 4e-17   |
| <a href="#">EFN87732.1</a>     | hypothetical protein EAI_02660<br>[ <i>Harpegnathos saltator</i> ]  | <a href="#">73.2</a> | 73.2        | 59%            | 7e-17   |

*Apis mellifera* = Honigbiene; *Bombus terrestris* = Erdhummel; *Solenopsis invicta* = Rote Feuerameise; *Nasonia vitripennis* = Wespe; *Camponotus floridanus* = Rossameise; *Harpegnathos saltator* = Ameise

Anschließend wurde ein Multiples Alignment gemacht mit den Proteinen aus der Blastsuche (Tabelle S5). Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich um ein Protein handelt, das bei den Hymenopteren stark konserviert ist.

Tabelle S5: Multiple Alignment mit ClustalW2 auf EMBL-EBI

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
gi|110756431|ref|XP_001120252.-----MSKFILLVCILLLTNIVSAAS---K 23
gi|156551015|ref|XP_001600083.-----MSKVILFALVLLATTLISAATSDNK 26
gi|340714492|ref|XP_003395762.-----MSKFMLFVCVLLATTVITAVPS--S 24
gi|307179066|gb|EFN67538.1|-----
gi|307211737|gb|EFN87732.1|-----
gi|322795731|gb|EFZ18410.1|MNQALMNHPIPVTCYAKYDTAEKMAKLMMYVFVALLAASLIMAAPDKAT 50

gi|110756431|ref|XP_001120252. CGRHGDSCVSSSDCCPG--TWCHTYANRCQVRI TEELMKQREKILGRKG 71
gi|156551015|ref|XP_001600083. CGRHGDPCVSVSDCCPVKQMACNRFKRCQIQITKEELLAQREKILGRG 76
gi|340714492|ref|XP_003395762. CGRHGDPCVSNRDCCTN--TKCHIYANRCQVQITEEDLMAAREKILGRKG 72
gi|307179066|gb|EFN67538.1|-----CVSDSQCCTN--IKCHRYANRCQVQITEELMAQREKILGRG 41
gi|307211737|gb|EFN87732.1|-----CISDSQCCTN--IKCHRYANRCQVQITEELMAQREKILGRG 41
gi|322795731|gb|EFZ18410.1|CKRHGDPCVGSSECCPN--MRCHMYANRCQVIITEELMAQREKILGRKG 98
          *: .   **: .   *:  :*:***:  **:***:  *****:*

gi|110756431|ref|XP_001120252. KDY-- 74
gi|156551015|ref|XP_001600083. PDYRK 81
gi|340714492|ref|XP_003395762. KDY-- 75
gi|307179066|gb|EFN67538.1| KDY-- 44
gi|307211737|gb|EFN87732.1| KDY-- 44
gi|322795731|gb|EFZ18410.1| KDY-- 101
          **

```

Von oben nach unten wurden die Proteinsequenzen von *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis*, *Bombus terrestris*, *Camponotus floridanus*, *Harpegnathos saltator* und *Solenopsis invicta* verglichen.

## 9.4 IRp42

Das Peptid IRp42 gi|66519003, das nach Infektion bei adulten Drohnen gefunden worden ist, wurde mit Hilfe von ScanProsite (ExpASY) analysiert.

ORIGIN

```

1 MSLDLGQCLI PKVIVTRFAF TDVQKYSLRRL YAMLLTLLAQ QRGYGGGAGG GAGGYGGAGG
61 GAGGHGAGAG GAGGYGGAGG GAGGHGGGAG GAGGGAGGYG GAGSGAGGGA GGYGGAGGGA
121 GGYGGAGGRG SAGAGGGAGG YGAGAGGGA GYGGAGGRG SAGAGGGAGG YGGAGGGAGG
181 HGGAGGGAGG YGGAGGGGGA GGYSGAGSGA GGYSGAGASS GAGVGGYGKL GCSGGSCGAG
241 GGAGGRGGAG AGGYGGAGGG GGAGGYGGAG SGGGAGGYGG AGAGGGAGAH GGSAGIIKTA
301 PGGPGGYGGA GGGAGSGGYG GSGGYGGAGA GAGSGGYGGA GAGSGGYGGA GAGGGSGGGR
361 GGAGGYGGAG GYGGAGGGGA GHHGSSGGGS CPGGCKGGYG GASANANAYA SANANANANA
421 RATAASANANA FSSASASANA NANA GGGGFG SGFD DFGPPG HGVDLFNRMG SIDEGVSKSG
481 SVDKAKGVYS NSAANIDSTO RGFYRVSAGK IA

```

//

Abb. S1: Schematische Darstellung der Proteinanalyse von IRp42 mit ScanProsite. Gefundene Peptide sind rot markiert.

Glycine-rich region profile (43-401)

Alanine-rich region profile (402-444)

Protein Kinase C Phosphorylation site (37-39, 499-501, 503-505)

Casein kinase II phosphorylation site (451-454, 471-474)

N-myristoylation site



## 10. Publikationen

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

ALBERT, Š., **GÄTSCHENBERGER, H.**, AZZAMI, K., GIMPLE, O., GRIMMER, G., FUJIYUKI, T., SUMNER, S., TAUTZ, J., MUELLER, M.J. (2011). Evidence of a novel immune responsive protein in the Hymenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 968-981.

HÖCHERL, N., SIEDE, R., ILLIES, I., **GÄTSCHENBERGER, H.**, TAUTZ, J. (2012). Evaluation of the nutritive value of maize for honey bees. *J Insect Physiol.* 58, 278-285.

**GÄTSCHENBERGER, H.**, GIMPLE, O., TAUTZ, J., BEIER, H. (2012) Honey bee drones maintain humoral immune competence throughout all life stages in the absence of vitellogenin production. *J. Exp. Biol.* 215, 313-322.

### Poster und Tagungsbeiträge

R. ESDAR, S. WILDEN, W. WETZEL, **H. GÄTSCHENBERGER**, J. TAUTZ (2006). Doping for the Honeybee: A test to optimize food compositions. *Apidologie* 37, 631-632.

K. RANDOLT, O. GIMPLE, **H. GÄTSCHENBERGER**, H. BEIER, J. TAUTZ (2008) Developmental stage-specific expression of antimicrobial proteins in the hemolymph of the honey bee after artificial infection. *Apidologie* 39, 599-600.

P. ROSENKRANZ, E. FREY, F.B. KRAUS, **H. GÄTSCHENBERGER**, O. GIMPLE, D. AHRENS, H. BEIER, J. TAUTZ, R.F.A. MORITZ (2008). FUGAPIS - Funktionelle Genom Analyse auf Krankheitsresistenzen in *Apis mellifera*. 1. Fugato Statusseminar, Postdam.

F.B. KRAUS, D. BEHRENS, E. FREY, R. ODEMER, **H. GÄTSCHENBERGER**, O. GIMPLE, P. ROSENKRANZ, J. TAUTZ, R.F.A. MORITZ (2009). FUGAPIS - Funktionelle Genom Analyse auf Krankheitsresistenzen in *Apis mellifera*. 2. Fugato Statusseminar, Kassel.

**H. GÄTSCHENBERGER**, O.GIMPLE, J.TAUTZ (2009). Proteomanalyse der Haemolymphe von Drohnenlarven, -puppen und adulten Drohnen. 2. Fugato Statusseminar, Kassel.

**H. GÄTSCHENBERGER**, O.GIMPLE, J.TAUTZ (2009). Drones respond with a humoral immune reaction after septic injury. *Apidologie* 40, 660.

K. AZZAMI, **H. GÄTSCHENBERGER**, O.GIMPLE, H.BEIER, J. TAUTZ (2009). Do winter bees have an immune system that is weaker than that of summer bees? *Apidologie* 40,660-661.

S. ALBERT, K. AZZAMI, **H. GÄTSCHENBERGER**, G. GRIMMER, O. GIMPLE, M.J. MUELLER, J. TAUTZ (2009). Hypothetical protein of 30 kDa (HP30), a bee-specific immune factor. *Apidologie* 40, 661.

S. STEIGERWALD, I. ILLIES, K. AZZAMI, **H. GÄTSCHENBERGER**, J. TAUTZ (2009). The influence of different pollen diets on the life span and the immune system of the honey bee. *Apidologie* 40, 661-662.

D. AHRENS, N. HÖCHERL, **H. GÄTSCHENBERGER**, K. AZZAMI, J. TAUTZ (2010). Honeybees are not tea drinkers. *Apidologie* 41, 687-688.

**H. GÄTSCHENBERGER**, O. GIMPLE, J. TAUTZ (2011) Humorale und zelluläre Immunreaktionen: Expression in Drohnenlarven und adulten Drohnen. 3. Fugato Statusseminar, Kassel.

**H. GÄTSCHENBERGER**, D. MICHELBERGER, G. FIEDLER, O. GIMPLE, J. TAUTZ (2011). Die Expression humoraler und zellulärer Immunreaktionen in Drohnenlarven und adulten Drohnen. 58. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, Berlin.

N. HIRTZ, D. AHRENS, **H. GÄTSCHENBERGER**, N. HÖCHERL, M. PAHL, J. TAUTZ (2012). An Tag sechs beginnt für Drohnen der Ernst des Lebens. 59. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, Bonn.

## 11. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Heike Gätschenberger  
Anschrift: Röhrleinshof 1  
74842 Billigheim / Katzental  
Geburtsdatum: 20.07.1980  
Geburtsort: Mosbach (Baden)

### Bildungsweg

1991-2000 Nikolaus Kistner Gymnasium Mosbach

2000-2006 Studium der Biologie (Diplom) an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Diplomarbeit: "Untersuchungen zur Beziehung zwischen  
Futterzusammensetzung und Fitness bei der Honigbiene (*Apis mellifera L.*)"  
Betreuer: Prof. Dr. J. Tautz; Prof. Dr. H. J. Gross

Seit 2006 Lehramtsstudium (Biologie / Chemie) an der Universität Würzburg

Seit 2008 Promotion an der Universität Würzburg:  
"Die Expression humoraler und zellulärer Immunreaktionen bei  
Drohnenlarven und adulten Drohnen der Honigbiene (*Apis mellifera*)"  
Betreuer:  
Prof. Dr. Jürgen Tautz (BEEgroup, Zoologie II, Biozentrum)  
Prof. Dr. Hildburg Beier (Lehrstuhl für Biochemie, Biozentrum)