

Die Auswirkungen des Neonicotinoids
Thiamethoxam auf den Glucosemetabolismus
der Honigbiene (*Apis mellifera*)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften der
Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III Chemie, Pharmazie, Bio- und
Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Sonja Dähn

Saarbrücken

2020

Tag des Kolloquiums: 09.10.2020

Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick

Berichterstatter: Prof. Dr. Uli Müller
Prof. Dr. Uwe Walldorf

Vorsitz: Prof. Dr. Bruce Morgan

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Jens Neunzig

Was zu unserem Gemuete spricht, entzieht sich der Messung.

Alexander von Humboldt (1769-1859)

Für Benno: Ich wünsche Dir Träume, weiter als der Himmel

Glück, heller als die Sonne

Und Liebe, tiefer als das Meer.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	2
1. Einleitung.....	3
1.1 Neonicotinoide.....	3
1.1.1 Auswirkungen von Neonicotinoiden auf den Metabolismus	6
1.2 Humane Glucosetransporter	11
1.2.1 Regulation der Glucosetransporter	12
1.3 Energiestoffwechsel bei Insekten	14
1.4 Fragestellung.....	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3. Geräte	22
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	23
2.1.5 Enzyme und Kits	25
2.1.6 Antikörper.....	25
2.1.7 Primer	26
2.1.8 Software und Datenbanken.....	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Haltung der Versuchstiere.....	26
2.2.2 Vorbereitung der Versuchstiere.....	27
2.2.3 Behandlung der Versuchstiere mit Thiamethoxam.....	27
2.2.4. Ermitteln der subletalen Dosis.....	27
2.2.5 Käfigversuche	28

2.2.6 Messung der HämolympH-Glucose	29
2.2.7 Messung der HämolympH-Glucose-Dynamik mittels 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG)	30
2.2.8 Untersuchung des Proventriculus mittels 2-NBDG.....	30
2.2.9 Untersuchung des Glucosetransports vom Mitteldarm in die Hämolymphe mittels 2-NBDG	31
2.2.10 Untersuchung der Glucosetransporter	32
2.2.11 Untersuchung der mRNA.....	35
3. Ergebnisse.....	39
3.1 Ermitteln der subletalen Dosis.....	39
3.1.1 Mortalität	39
3.1.2 Thiamethoxam reduziert die Zuckerwasserempfindlichkeit bei Winterbienen	41
3.2 Thiamethoxam verändert das Fraßverhalten der Winterbienen	45
3.3 Messung der HämolympH-Glucose	47
3.3.1 Thiamethoxam verändert den HämolympH-Glucosespiegel bei den Sommerbienen.....	48
3.3.2 Messung der HämolympH-Glucose Dynamik mittels 2-NBDG	51
3.4. Thiamethoxam hat keinen Einfluss auf die Funktion des Proventriculus bei den Winterbienen	54
3.5 Einfluss von Thiamethoxam auf die Morphologie des Mitteldarms.....	57
3.5.1 Thiamethoxam hat keinen Einfluss auf die Durchlässigkeit des Mitteldarms .	58
3.6 Untersuchung der Glucosetransporter	61
3.6.1 Thiamethoxam beeinflusst die Proteinmenge der Glucose Transporter GLUT 1a und GLUT 1b	61
3.6.2 Veränderung der mRNA Menge nach Behandlung mit Thiamethoxam.....	68
3.6.3 Thiamethoxam hat keinen Effekt auf die Histonmodifikationen im Mitteldarm der Biene.....	71

4. Diskussion	73
4.1 Thiamethoxam beeinflusst das Verhalten der Honigbiene	73
4.2 Thiamethoxam beeinflusst den Hämolymphe-Glucosespiegel in der Biene	75
4.2.1 Thiamethoxam hat keinen Einfluss auf die Glucose Zufuhr vom Kropf in den Mitteldarm	78
4.2.2 Thiamethoxam hat keinen Einfluss auf die Glucose Zufuhr aus dem Mitteldarm in die Hämolymphe	79
4.2.3 Thiamethoxam hat keinen Einfluss auf die Glucose Zufuhr aus dem isolierten Mitteldarm	80
4.2.4 Glucosetransporter als mögliches Target von Thiamethoxam	82
4.3 Thiamethoxam wirkt saisonal unterschiedlich	89
4.4 Zusammenfassung und Ausblick.....	97
Literaturverzeichnis	99
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	111
Abkürzungsverzeichnis.....	117
Danksagung	120
Lebenslauf und akademischer Werdegang	121
Eidesstattliche Versicherung	123

Zusammenfassung

Neonicotinoide sind Insektizide, welche als Agonisten zur Überstimulierung der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren und damit zum Tod des Zielorganismus führen. Ziel der vorliegenden Dissertation war es die Auswirkungen des Neonicotinoids Thiamethoxam auf den Glucosemetabolismus der Biene zu untersuchen. Dabei wurde erstmals der gesamte Organismus vom Verhalten über Physiologie bis hin zur molekularen Ebene untersucht.

In Verhaltensexperimenten zeigte sich, dass Thiamethoxam das Fraßverhalten verändert und nach Fütterung die Dynamik des Hämolymp-Glucosespiegels verändert. Diese physiologischen Veränderungen liefern erste Hinweise darauf, dass Thiamethoxam den Glucosemetabolismus der Biene beeinflusst. Um die veränderte Dynamik des Hämolymp-Glucosespiegels zu erklären, wurde der Verdauungstrakt untersucht. Es zeigte sich, dass Thiamethoxam keinen Einfluss auf die Funktion des Proventriculus und des Mitteldarms hat.

Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass Thiamethoxam die Proteinmenge der Glucosetransporter Glut1 a und Glut1 b und die mRNA Menge der Transporter beeinflusst.

Diese systemische Arbeit an der Honigbiene zeigt auf allen untersuchten Ebenen einen Einfluss von Thiamethoxam auf den Glucosemetabolismus. Obwohl Neonicotinoide spezifisch auf Insekten wirken, können auch im Säugetier heterogene Effekte beobachtet werden. Da der Glucosemetabolismus in Tieren konserviert ist, ist es denkbar, dass Neonicotinoide hier eingreifen und so zu den beobachteten Effekten führt.

Summary

Neonicotinoids are pesticides that act agonistically on insect nicotinic acetylcholine receptors leading to paralysis and death. Although neonicotinoids have been designed to bind specifically to insect receptors, chronic exposure to neonicotinoids is also connected to metabolic dysfunctions in mammals. This poses the hypothesis that neonicotinoids affect the regulation of glucose metabolism, which, in turn affects neuronal and cognitive functions. To address this question, I investigated the effects of Thiamethoxam on systemic and molecular aspects of glucose metabolism in the honeybee

It could be demonstrated that Thiamethoxam affects the consumption of sugar and water in honeybees. Determination of the glucose levels in the hemolymph demonstrates an effect of Thiamethoxam on the dynamic of the hemolymph glucose level after feeding. By using especially adapted techniques I could exclude that Thiamethoxam compromises the morphology or function of the proventriculus or the midgut, two main components of the digestive tract.

The subsequent investigation of the Glucosetransporters Glut1 a and Glut1 b, however showed that Thiamethoxam affects the amount of both transporters in different tissues of the honeybee. Moreover, Thiamethoxam lowered the level of mRNA of Glut1 b. A potential impact of Thiamethoxam on histone modifications and thus on the later processes could be excluded. In summary, this is the first investigation connecting behavioral with the molecular level and provides evidence that Thiamethoxam affects glucose metabolism in the honey bee.

1. Einleitung

1.1 Neonicotinoide

Die Ernährung der Weltbevölkerung stellt die Wirtschaft aufgrund der drastisch steigenden Anzahl der Menschen vor schwierige Herausforderungen. Ein Eckpfeiler der Ernährung stellen Nahrungsmittel auf pflanzlicher Basis dar. Zudem wird der Ackerbau genutzt, um Nutztiere zu ernähren. Damit der Ertrag möglichst hoch ausfällt, müssen die Nutzpflanzen wirksam vor Schädlingen geschützt werden. Hierfür werden diverse Pflanzenschutzmittel eingesetzt. Diese sollen die Nutzpflanze vor Schaden durch Insekten, aber auch Nager, Viren, Bakterien und Pilze schützen. In Deutschland werden jährlich pro Hektar Nutzfläche ca. neun Kilogramm Pflanzenschutzmittel ausgebracht (Statistisches Bundesamt, 2009). In Deutschland sind derzeit 1742 Pflanzenschutzmittel zugelassen, davon dienen 297 zur Bekämpfung von Schadinsekten (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2019). In den letzten Jahren gerieten vor allem die Wirkstoffe, welche zur Klasse der Neonicotinoide gehören, in Verruf. Die gängigsten sind: Clothianidin, Imidacloprid, Thiamethoxam, Thiacloprid und Acetamiprid. Die Absatzmenge Neonicotinoid-haltiger Pflanzenschutzmittel hat sich, ebenso wie die Absatzmenge der Neonicotinoide, von 2006 bis 2010 verdoppelt (von jährlich 652 t auf 1258 t bzw. von 108 t auf 257 t) (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2012). Dies gilt allein für Deutschland. Weltweit betrachtet sind Neonicotinoide die am weitesten verwendeten Pestizide, sie machen 11 % - 15 % des Marktes aus (Tomizawa und Casida, 2005). Diese Wirkstoffe werden als systemische Insektizide verwendet, einmal auf die Pflanze gebracht (durch z. B. Saatgutbeizung oder Ausbringen des Aerosols) wird das Neonicotinoid über das Leitgewebe in der gesamten Pflanze verteilt und dient somit als effektiver Schutz gegen Fraßschädlinge. Aufgrund der recht hohen selektiven Wirkung wurden die Neonicotinoide lange Zeit als vergleichsweise sicher für Säugetiere eingestuft. Sie wirken als Agonisten der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR). Da sie im Gegensatz zu Acetylcholin nicht durch Acetylcholinesterasen hydrolysiert werden können, verbleiben sie im Rezeptor und führen dadurch zur Überstimulierung, Paralyse und letztendlich zum Tod (Catae et al., 2017). Aufgrund struktureller Unterschiede zwischen den nAChRs von

Insekten und denen von Säugern scheinen Neonicotinoide sehr selektiv zu wirken: In Insekten kommt es zwischen der positiv geladenen Nitrogruppe des Rezeptors und der negativen Ladung des Neonicotinoids zu einer starken, nicht kovalenten Bindung. Da bei Säugetieren diese positiv geladene Ammoniakgruppe fehlt, kommt es hier nicht zu dieser Bindung (**Abbildung 1**) (Tomizawa und Casida, 2005).

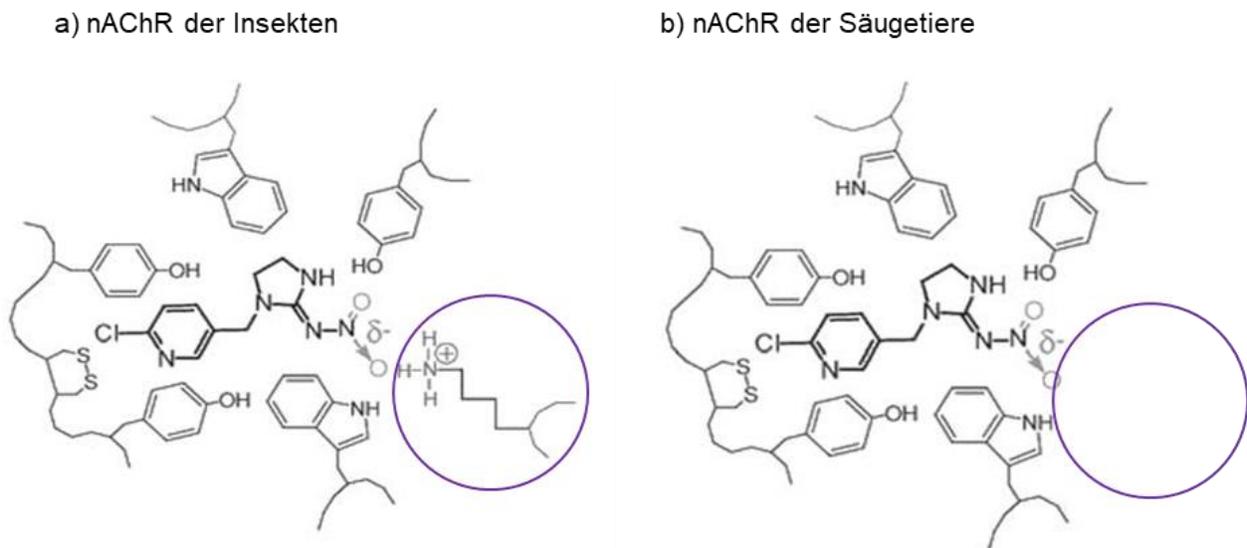


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bindung von Neonicotinoiden (in diesem Fall Imidacloprid) an den nAChR von a) Insekten und b) Säugetieren. Aufgrund der fehlenden Ammoniakgruppe im nAChR der Säugetiere kommt es hier zu keiner Bindung (Tomizawa und Casina, 2005; modifiziert).

Trotz strenger Vorschriften, die das Ausbringen der Neonicotinoide regeln, kommen neben den Schadinsekten auch nicht-Ziel Organismen mit den Insektiziden in Kontakt. Neben der Gefahr der topischen Exposition während des Ausbringens des Aerosols, kann es aufgrund der systemischen Wirkung der Neonicotinoide durchaus vorkommen, dass zum Beispiel Bienen kontaminierten Nektar und Pollen sammeln und diesen in den Stock bringen (Krupke et al., 2012; Botías et al., 2015). Botías et al. (2015) konnten zeigen, dass auch Pollen und Nektar von Wildblumen, welche in der Nähe von bewirtschafteten Feldern wachsen, mit Neonicotinoiden belastet sind. Tatsächlich können Spuren von Neonicotinoiden in eingelagertem Pollen und Nektar nachgewiesen werden (Chauzat et al., 2006; Krupke et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass der

Großteil des kontaminierten Pollens von Wildblumen stammt (Botías et al., 2015). Des Weiteren sind Neonicotinoide extrem stabil. So hat Clothianidin in der Erde eine Halbwertszeit von etwa 1386 Tagen, auch Imidacloprid hat eine Halbwertszeit von mehreren hundert Tagen und Thiacloprid ist im Wasser stabil (kann also weder durch Photo- noch durch Hydrolyse abgebaut werden) (Mason et al., 2013). Dies bedeutet, dass die Pestizide, einmal ausgebracht Monate bis Jahre eine Gefahr für die Umwelt darstellen. Bienen kommen also auf vielfältige Weise mit Pestiziden in Kontakt und obwohl die Dosen meist nicht letal sind, stehen sie dennoch in Verdacht Auswirkungen auf das Individuum und auf den Stock zu haben (Krupke et al., 2012). Wie bereits erwähnt, gelten die nAChRs als Target für die Neonicotinoide. Durch Überstimulierung dieser Rezeptoren kommt es zum Tod des Zielorganismus. Daneben gibt es weitere Effekte, welche durch subletale Dosen, also solche Dosen, die nicht tödlich sind, zustande kommen. Da die nAChRs vor allem in den Pilzkörpern (eine Region im Gehirn, welche für die Gedächtnisbildung verantwortlich ist) exprimiert werden, ist es nicht verwunderlich, dass subletale Dosen Lernen und Gedächtnis beeinflussen (Decourtye et al., 1999, 2004; Hassani et al., 2007). Des Weiteren reichen die Effekte sublethaler Dosen über die Beeinflussung des Futtersuchverhaltens (Bortolotti et al., 2003; Ramirez-Romero et al., 2005; Yang et al., 2008) bis hin zu einem geschwächten Immunsystem (Di Prisco et al., 2013; Brandt et al., 2016) und gestörtem Schwänzeltanz (Eiri et al., 2012; Tison et al., 2016). Imidacloprid, zum Beispiel, verzögert die Entwicklung der Larven (Decourtye et al., 2005), orale Exposition mit Thiamethoxam führt zu einer veränderten Thermoregulation (Tosi et al., 2016) und beeinträchtigt Heimflug (Bortolotti et al., 2003; Henry et al., 2012). Für Imidacloprid konnte beispielsweise in Freiflugexperimenten gezeigt werden, dass die Tiere nach oraler Aufnahme des Insektizids zum einen weniger Zuckerwasser konsumieren und zum anderen seltener die artifiziellen Futterquellen aufsuchen (Ramirez-Romero et al., 2005). Die Arbeitsgruppe um Yang et al. konnte 2008 zeigen, dass sich nach oraler Aufnahme von Imidacloprid das Zeitintervall zwischen den Besuchen einer Futterquelle signifikant verlängert. Dieser Effekt war dosisabhängig. Curé et al. konnten 2001 zeigen, dass nicht nur das Futtersuchverhalten der mit Imidacloprid behandelten Tiere beeinträchtigt ist, sondern auch, dass die Kommunikation über die Lage der Futterquelle zwischen Tieren gestört wird. Dadurch wird kurzfristig das Futtersuchverhalten mehrerer

Bienen unterbrochen. Bortolotti et al., konnten 2003 zeigen, dass Imidacloprid nicht nur das Futtersuchverhalten reduziert, sondern auch den Heimflug der Tiere verzögert. Solche Effekte können nicht nur nach der Kontamination mit Imidacloprid beobachtet werden. Auch Thiamethoxam beeinflusst das Flugverhalten der Honigbiene (Tosi et al., 2016). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die akute Exposition mit Thiamethoxam sowohl zu verlängerten Flugperioden als auch zu längeren Distanzen führt. Wohingegen die chronische Behandlung beide Parameter verkürzt. Henry und seine Arbeitsgruppe zeigten 2016, dass Thiamethoxam dazu führt, dass 10 % bis 30 % der Bienen nicht mehr zu ihrem Stock finden, nachdem sie an kontaminierten Pflanzen Pollen und Nektar gesammelt haben.

1.1.1 Auswirkungen von Neonicotinoiden auf den Metabolismus

Die große Diversität dieser Effekte legt den Verdacht nahe, dass nicht allein die agonistische Wirkung auf die nAChRs hierfür verantwortlich ist. Daher stellt sich die Frage nach einer gemeinsamen, basalen Ursache für die beobachteten Effekte. In der Tat konnten sowohl bei der Biene als auch im Säuger Effekte von Neonicotinoiden gefunden werden, die darauf schließen lassen, dass der Energiemetabolismus gestört wird. So führt die chronische Behandlung mit 1 ng/Biene Thiamethoxam über einen Zeitraum von 11 Tagen zu einer verminderten Reaktion auf Zuckerwasser (Aliouane et al., 2008). Die einmalige Behandlung mit derselben Menge Thiamethoxam dagegen, führte zu keiner Veränderung (Hassani et al., 2007). Für Acetamiprid konnte genau der gegenteilige Effekt beobachtet werden: hier wurde kein Unterschied in der Zuckerwasserempfindlichkeit festgestellt werden, wenn die Tiere kollektiv über 11 Tage behandelt wurden (Aliouane et al., 2007). Bei der akuten Behandlung mit derselben Dosis dagegen sank die Zuckerwasserempfindlichkeit signifikant (Hassani et al., 2007). Démares et al. (2016) konnten zeigen, dass *Apis mellifera scutellata* nach einer Langzeitbehandlung mit Thiamethoxam weniger stark auf Saccharoselösungen reagieren, als unbehandelte Tiere. Auch der Kontakt mit Imidacloprid wirkt sich auf die Zuckerwasserempfindlichkeit aus. In einer Studie von Eiri et al. aus dem Jahre 2012 wurden Nektar- und Pollen-Sammler untersucht. Die Tiere wurden beim Besuch künstlicher Futterquellen (angeboten wurden Nektar und Pollen) gefangen, individuell

mit Imidacloprid gefüttert und die Reaktion auf Zuckerwasser getestet. Dabei fanden die Forscher heraus, dass die Tiere weniger stark auf Saccharose reagieren, wobei sich bei Pollen- und Nektar-Sammlern unterschiedliche Effekte zeigen. Die genannten Studien zeigen zwar die durch Neonicotinoide hervorgerufenen Veränderungen des Verhaltens der Biene, liefern aber keine Erklärung, wie es zu diesen kommt. Des Weiteren gibt es bisher keine Untersuchungen, die Verhaltensänderungen, wie zum Beispiel verändertes Fraßverhalten, mit Veränderungen auf molekularer Ebene, wie zum Beispiel Veränderungen im Glucosespiegel der Hämolymphe oder der Glucosetransporter, in Einklang bringt. Rether konnte 2012 zeigen, dass der Hämolymphe-Glucosespiegel negativ mit der Reaktion auf Zuckerwasser korreliert, so reagieren Tiere mit einem niedrigen Hämolymphe-Glucosespiegel stärker auf den dargebotenen Stimulus. Die beschriebenen Effekte lassen darauf schließen, dass der Energiehaushalt der Biene gestört sein könnte. Diese Idee wird dadurch bestärkt, dass Imidacloprid die Effizienz der Mitochondrien reduziert (Nicodemo et al., 2013). Hierfür wurden Mitochondrien aus Kopf oder Thorax der afrikanisierten Honigbiene *Apis mellifera scutellata* isoliert und mit verschiedenen Konzentrationen Imidacloprid inkubiert. Anschließend wurde sowohl der Sauerstoffverbrauch als auch die ATP Produktion gemessen. Mit Imidacloprid inkubierte Mitochondrien zeigten einen geringeren Sauerstoffverbrauch. Dabei waren die aus dem Kopf isolierten sensitiver, als solche, welche aus Thorax isoliert wurden. Ebenso war die ATP Produktion signifikant verringert, wobei sich auch hier wieder zeigte, dass Mitochondrien isoliert aus Kopf sensitiver gegenüber der Behandlung mit Imidacloprid waren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Imidacloprid zu einer erhöhten Aktivität der Cytochrom Oxidase in den Pilzkörpern der Biene führt (Decourtye et al., 2004). Dieses Enzym ist ein essenzieller Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette und ein Anstieg in dessen Aktivität ist ein Indikator für eine höhere neuronale Aktivität im Gehirn der Biene und damit auch ein Indikator für eine Veränderung im Energiehaushalt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Neonicotinoide das Potential zu besitzen scheinen den Energiemetabolismus der Biene negativ zu beeinträchtigen. Während dies in der Biene bisher nur indirekt gezeigt wurde, gibt es beim Säuger sowohl *in vivo* als auch *in vitro* diverse Studien, die gezielt die Glucoseaufnahme der Zellen und sogar die Glucosetransporter untersuchen. Kim und seine Arbeitsgruppe haben 2013 in einer Studie mit Zelllinien verschiedener Herkunft zeigen können, dass Imidacloprid

Insulinresistenz induziert. Mit Hilfe des fluoreszierenden Glucosederivats (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose) (2-NBDG) wurde die Glucoseaufnahme von Adipozyten (Maus), Myoblasten (Maus) und Hepatozyten (Menschen) unter Einfluss von Imidacloprid gemessen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine Inkubation über einen längeren Zeitraum mit Imidacloprid die Insulinabhängige Aufnahme von Glucose in Myozyten und Adipozyten verringert. Derselbe Effekt kann auch in Hepatocyten beobachtet werden. Daneben konnte gezeigt werden, dass Imidacloprid die Phosphorylierung der AKT durch Insulin hemmt. Da die pAKT unter anderem eine große Rolle beim intrazellulären Transport der GLUT4 spielt, wird davon ausgegangen, dass Imidacloprid den Insulinabhängigen Glucosetransport vermindert, indem es den Einbau von GLUT4 in die Zellmembran verhindert (**Abbildung 2**). Auch in Mäusen konnte eine Veränderung des Metabolismus unter Einfluss von Imidacloprid beobachtet werden (Sun et al., 2016). So legen Mäuse nach oraler Gabe des Pestizids bei hochkalorischer Nahrung mehr Gewicht zu, als unbehandelte Mäuse. Ebenso haben behandelte Mäuse einen höheren Blutglucose- und Insulinspiegel. Ebenso wurde gezeigt, dass nach einer Langzeitbehandlung mit Imidacloprid die mRNA Expression der GLUT4 in der Skelettmuskulatur signifikant reduziert ist. Bei männlichen Ratten konnte ebenso nach einer Behandlung mit Imidacloprid über 60 Tage ein erhöhter Blutglucosespiegel gemessen werden (Khalil et al., 2017). Der gemessene Insulinspiegel in der Leber dagegen war signifikant erniedrigt. Daneben konnte gezeigt werden, dass die mRNA Menge von GLUT4 in der Leber nach der Behandlung signifikant sinkt, während die mRNA Menge von GLUT2 im Fettgewebe der Testikel signifikant erhöht ist. Park et al. berichten, dass die Expression von GLUT4 in Adipozyten der Maus nach der Behandlung mit Imidacloprid hochreguliert ist. Die Effekte von Neonicotinoiden scheinen also je nach Gewebe unterschiedlich zu sein. Der Zusammenhang eines (durch Neonicotinoide) gestörten Energiehaushalts, mit den bisher gezeigten, sehr breitgefächerten Effekte der Neonicotinoide lässt sich durch diverse, vor allem im Menschen bekannte, metabolische Krankheiten erklären. Zum Beispiel leiden Diabetes Patienten aufgrund des gestörten Glucosehaushaltes unter anderem unter vaskulären Störungen, Neuropathien, Depressionen, geschwächtem Immunsystem und kognitiven Dysfunktionen (Infante-Garcia und Garcia-Alloza, 2019). Menschen mit einer Mutation im SLC2A1 Gen exprimieren signifikant weniger

Glucosetransporter GLUT1 im Gehirn (De Giorgis et al., 2019). Das Krankheitsbild des GLUT1-Defizit-Syndrom ist äußerst variabel. Die Betroffenen leiden unter anderem an Epilepsie, kognitiven Störungen, Mikrozephalie und Dyskinesie (Wang et al., 2002; Koch et al., 2019; De Giorgis et al., 2019). Aber auch neurodegenerative Erkrankungen spiegeln sich in einem gestörten Glucosemetabolismus wieder. So zeigen Huntington (HD) Patienten eine verringerte Glucoseaufnahme im Cortex und Striatum. Dies konnte bereits beobachtet werden, bevor die Patienten Symptome zeigten. Mit voranschreitendem Verlauf der Krankheit geriet auch der Glucosemetabolismus im Gehirn zunehmend aus der Balance (Ciarmiello et al., 2005). In *Drosophila* Fliegen mit HD Phänotyp konnte durch die Überexpression des Glucosetransporters GLUT1 die Neurodegeneration verbessert werden (Vittori et al., 2014). Auch bei Alzheimer Patienten scheint der Glucosemetabolismus im Gehirn beeinträchtigt zu sein (Chen und Zhong, 2013; Anandhan et al., 2017). So konnte bereits 1991 von Jagust und seiner Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Geschwindigkeitskonstante K_1 der GLUT1 im Gehirn von Alzheimer Patienten signifikant reduziert ist, im Vergleich zu gesunden Patienten.

Betrachtet man die Energieversorgung des Gehirns scheint dieser Zusammenhang auf der Hand zu liegen. Das Gehirn verbraucht ca. 20 % der Energie, die dem Körper zur Verfügung steht. Auch während Hungerperioden ist zumeist sichergestellt, dass das Gehirn ausreichend mit Energie versorgt wird (Rolfe und Brown, 1997). Während Skelett- und Herzmuskulatur zum Beispiel über β -Oxidation Energie aus Fettsäuren gewinnen können (Eaton et al., 1996), steht dem Gehirn als Energiequelle nur Glucose zur Verfügung (Duelli et al., 2001; Anandhan et al., 2017). Nur in größten Stresssituationen (wie in langen Fastenperioden) können zudem auch andere Energiequellen wie Lactat oder Ketonkörper genutzt werden (Hasselbalch et al., 1995; Anandhan et al., 2017). Doch Glucose ist nicht nur für das Gehirn der Hauptenergieträger, auch der restliche Organismus nutzt überwiegend Glucose zur Energiegewinnung (Mayoux et al., 2014). Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass ein gestörter Glucosemetabolismus zu diversen Dysfunktionen führen kann. Obwohl der Glucosemetabolismus von Säugern und Insekten nur bedingt vergleichbar ist, so gibt es dennoch Parallelen der genannten Krankheitsbilder zu den subletalen Effekten der Neonicotinoide auf die Biene: so leiden die Tiere nach Kontamination unter

diversen kognitiven Störungen, das Verhalten ist beeinträchtigt und das Immunsystem geschwächt.

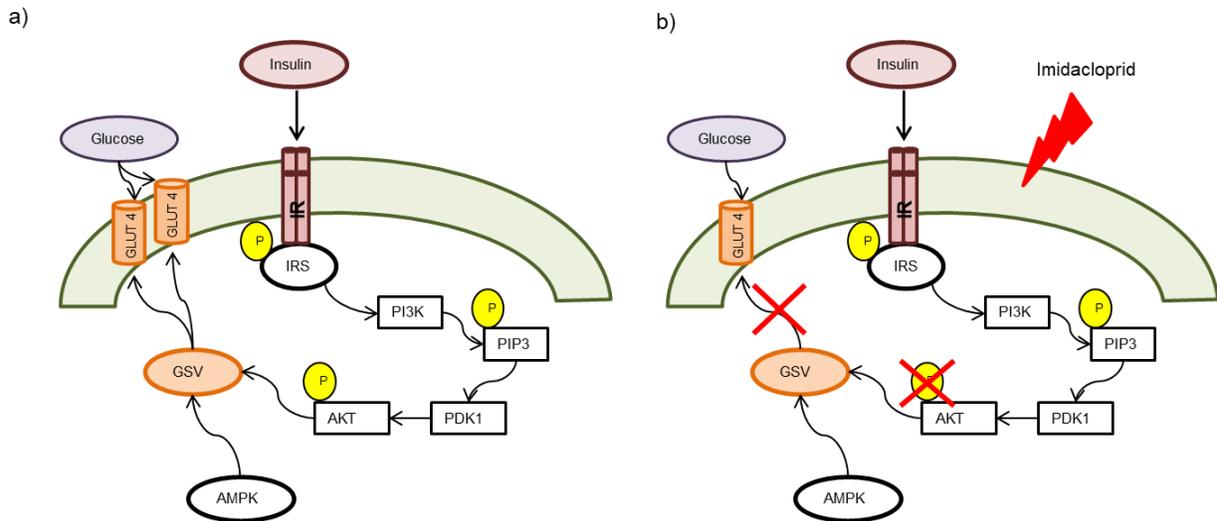


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Insulin vermittelten Translokation von GLUT4. a) unter natürlichen Bedingungen: Durch die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor (IR) wird eine Phosphorylierungskaskade über die Insulinrezeptor Substrate (IRS) in Gang gesetzt. Durch die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) wird Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) umgesetzt. Dadurch wird wiederum die Phosphoinositide-abhängige Kinase 1 (PDK1) aktiviert, was zur Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT) führt. Am Ende dieser Kaskade werden die GLUT4 Speichervesikel (GSV) transloziert und GLUT4 wird in die Plasmamembran eingebaut. Welche Rolle die AMP-abhängige Kinase (AMPK) dabei spielt, gilt es noch aufzuklären. b) unter Einfluss von Imidacloprid wird die Phosphorylierung der AKT verhindert, dadurch werden weniger GLUT4 in die Membran eingebaut.

1.2 Humane Glucosetransporter

Säugetiere sind auf Glucose als Hauptenergieträger angewiesen. Normalerweise wird diese aus der Nahrung gewonnen, indem die darin enthaltenen Polysaccharide enzymatisch gespalten werden oder sie wird in der Leber aus anderen Quellen bezogen (Wood et al., 2004). Und obwohl Glucose die Hauptenergiequelle aller Säugetierzellen ist, benötigt sie aufgrund ihrer hydrophilen Struktur spezielle Transporter, die den Transport vom extrazellulären Raum in die Zelle ermöglichen (Scheepers et al., 2004; Mayoux et al., 2014). Der Transport erfolgt dabei sowohl aktiv über die so genannten sodium-driven sugar cotransporters (SGLT), als auch passiv durch die verschiedenen GLUTs (Mueckler, 1990; Scheepers et al., 2004). SGLTs fungieren über den Cotransport von Na^+ , Galaktose oder Mannose und Glucose. Der für den Transport benötigte Na^+ Gradient wird durch die ATP getriebene Na^+/K^+ -ATPase erzeugt. Dabei wird aktiv Natrium von der apikalen Seite des Epithels auf die basolaterale Seite gepumpt (Wood et al., 2004). Die GLUT Proteinfamilie besteht aus drei verschiedenen Familien, die aufgrund der Sequenzhomologien eingeteilt werden: Klasse I beinhaltet die weit bekannten Transporter GLUT1 - 4 und GLUT14 (Genduplikation von GLUT3), Klasse II beinhaltet die Isoformen GLUT5, 7, 9 und 11, Klasse III beinhaltet GLUT6, 8, 10, 12 und 13 (Joost et al., 2001; Thorens et al., 2009, Deng et al., 2015). Während SGLT1 und 2 für die Absorption im Verdauungstrakt bzw. für die Reabsorption in den Nieren verantwortlich sind, sorgen die GLUTs für eine stabile Homöostase im restlichen Körper (Mueckler, 1990; Carruthers, 1990; Mayoux et al., 2014). Allen GLUTs gemein sind deren 12 Transmembran Helices, sie besitzen eine extrazelluläre N-Glykosylierungsstelle und sind hoch glykolysiert (Mueckler et al., 1985; Augustin, 2010; Mayoux et al., 2014). Beim Säuger sind GLUT1-4 die am besten beschriebenen Glucosetransporter. GLUT1 war der erste Transporter, welcher isoliert und kloniert werden konnte und ist in fast allen Geweben vorhanden (Mueckler et al., 2009). In Erythrozyten ist er allerdings hoch exprimiert, und wird daher auch als der Erythrozyten Zuckertransporter bezeichnet (Baldwin et al., 1980). Dieser Transporter ist aber auch in Endothelien und Epithelien (wie Bluthirnschranke), im Auge, peripheren Nerven und der Placenta vorhanden (Mueckler, 1994; Mayoux et al., 2014). So ist GLUT1 neben GLUT3 der wichtigste

Glucosetransporter im Gehirn und zumeist in Astrocyten und in der Bluthirnschranke zu finden (Duell et al., 2001). Die meisten in den Laboren verwendeten Zelllinien exprimieren diesen Transporter. GLUT3 befindet sich im Allgemeinen in allen Geweben, die einen hohen Glucoseverbrauch haben, wie zum Beispiel Testes, Plazenta, Embryos und in den meisten Krebszellen (Maher et al., 1994; Illsley, 2000; Choeirie et al., 2002; Mayoux et al., 2014).

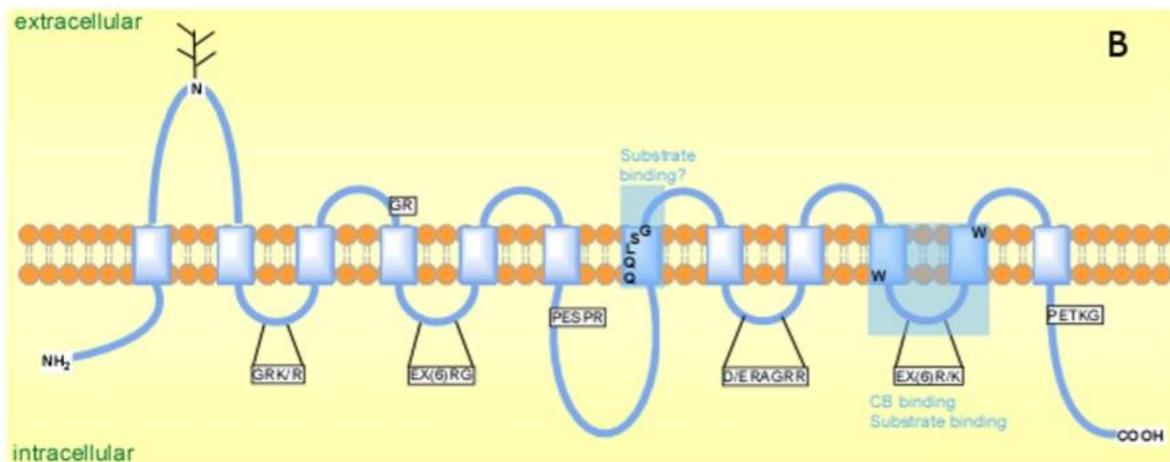


Abbildung 3: Vermutliche sekundäre Struktur der Glucosetransporter Klasse I und II. CB: Cytochalasin B. Die Glycosylierung ist von großer Bedeutung beim Transport der Glucose, da sie die Struktur der Transporter aufrechterhält. (Modifiziert nach Augustin und Mayoux, 2014).

1.2.1 Regulation der Glucosetransporter

Der Organismus ist in der Lage auf einen veränderten metabolischen Status rasch durch Regulation der Glucosetransporter zu reagieren. Der wohl bekannteste Regulationsmechanismus ist die insulinabhängige Glucoseaufnahme durch GLUT4. GLUT4 befindet sich sowohl in braunem als auch weißem Fettgewebe und ist zudem in der Skelettmuskulatur und der Herzmuskulatur zu finden (Huang et al., 2007). Dieser Transporter befindet sich nicht nur in der Plasmamembran, sondern auch in Vesikeln verpackt im Cytoplasma und wird als Reaktion verschiedener Stimuli intrazellulär transportiert und transloziert (Friedman et al., 1991; Gumà et al., 1995). Dabei spielt Insulin die größte Rolle. Insulin wird als Antwort auf Nahrungsaufnahme in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas ausgeschüttet: wird der Insulinrezeptor durch

die Bindung von Insulin aktiviert, kommt es über die PI3-Kinase zur Translokation der Vesikel und die Transporter werden in die Plasmamembran eingebaut. Bereits 1939 konnte Lundsgaard zeigen, dass Insulin die Glucoseaufnahme in der Muskulatur von Nagern stimuliert. In den 1980er Jahren konnte gezeigt werden, dass Insulin sowohl in Adipocyten als auch in Muskelzellen den Einbau der Transporter in die Plasmamembran stimuliert. In Adipocyten liegt GLUT4 überwiegend in Vesikeln vor, welche sich sowohl im *trans* Golgi Netzwerk (TGN) aber auch verteilt im Zytosol befinden. Dabei wird das Protein zunächst von der Plasmamembran aus in Recycling Endosomen (markiert durch den *Transferrin* Rezeptor *TfR*) überführt und anschließend in die so genannten GLUT4 Speicher Vesikel (GSVs) verpackt. Aus den GSVs werden durch Insulin Stimulation ca. 50 % dieser verpackten Transporter in die Plasmamembran eingebaut. In der Abwesenheit von Insulin befinden sich 5 % der Transporter in der Membran (Leto und Saltiel, 2012). Die Tatsache, dass sich GLUT4 in Abwesenheit von Insulin überwiegend in den GSVs befindet, spielt vermutlich eine entscheidende Rolle bei der vergleichsweise langen Halbwertszeit dieses Proteins (Shawver et al., 1987; Sargeant et al., 1991). Entsprechend des Transportweges durch die Zelle, konnten diverse Aminosäure Motive gefunden werden, welche sowohl die Endozytose als auch die Zuordnung zu GSVs regulieren. Die genauen Mechanismen hinter diesen Transportwegen konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Ebenso wenig aufgeklärt ist bisher der Prozess der Exozytose (Klip et al., 2019).

Der Insulinrezeptor ist in jeder Zelle unterschiedlich stark exprimiert. Rote Blutkörperchen haben nur wenige dieser Rezeptoren in der Plasmamembran eingebaut, wohingegen Zellen des Fett- und Muskelgewebes Unmengen an Insulinrezeptoren in der Plasmamembran besitzen. Bei dem Rezeptor handelt es sich um ein Heterotetramer, bestehend aus je zwei α - (extrazellulär) und β - (Transmembran befindlich bzw. intrazellulär) Untereinheiten. Die β -Untereinheit besitzt eine Tyrosinkinaseaktivität, kann also Tyrosinreste phosphorylieren. Bindet Insulin an seinen Rezeptor, so kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch sich die beiden β -Untereinheiten einander nähern und autophosphorylieren. Durch diese Phosphorylierung kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinase. Die aktivierte Tyrosinkinase phosphoryliert ihrerseits wiederum eine Vielzahl von Transmittermolekülen, welche dann als Bindestellen für Effektor-Proteine fungieren.

Hierzu gehören unter anderem die vier Insulin Rezeptor Substrate IRS 1,2,3 und 4. Binden IRS an den aktivierten Insulinrezeptor, so wird die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert und wandelt Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) um. PIP₃ wiederum dient als Andockstelle für Phosphoinositide-abhängige Kinase 1 (PDK1) und AKT. PDK1 phosphoryliert AKT, welche im aktiven Zustand die Exocytose der GSVs anregt. GTPasen stehen in der Diskussion maßgeblich an dem finalen Schritt der Verschmelzung der GSVs mit der Plasmamembran beteiligt zu sein (**Abbildung 2**). Daneben führen verstärkte Muskelkontraktionen zu einer Translokation von GLUT4 (Huang et al., 2007). Dies geschieht vermutlich über das veränderte AMP/ATP Verhältnis (Huang et al., 2007). Daneben verändert auch chronische Hypo- oder Hyperglycämie die Expression der Glucosetransporter. So führt Hyperglycämie zu einer verringerten Expression von GLUT4 (Dimitrakoudis et al., 1992), wohingegen Hypoglycämie zu einer erhöhten Expression von GLUT1 führt (Simpson et al., 1999).

1.3 Energiestoffwechsel bei Insekten

Im Unterschied zu Säugern ist der Hauptzucker in der Hämolymphe bei Insekten zumeist Trehalose. Dieser Zucker ist ein Disaccharid, welches aus zwei α,α' -1,1-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen besteht. Durch Hydrolyse wird aus Trehalose Glucose gewonnen. Da der Transport von Glucose in die Zellen überwiegend durch Diffusion entlang eines Konzentrationsgefälles stattfindet, wird Glucose in der Hämolymphe entweder rasch von den Zellen verbraucht, in Trehalose umgewandelt, oder über die Fettsäuresynthese in Fett umgewandelt und im Fettkörper eingelagert. Die Honigbiene bildet hier eine Ausnahme innerhalb der Insekten: da diese nur wenig Glycogenspeicher besitzen, und beim Fliegen schnell Energie zur Verfügung gestellt werden muss, ist der Glucosegehalt in der Hämolymphe verhältnismäßig hoch. Während die Glucosetransporter bei Säugetieren sehr gut untersucht sind, ist bei Insekten dagegen weitaus weniger bekannt. Dennoch sind einige Insekten zu nennen, in denen GLUT ähnliche Transporter beschrieben wurden: *Drosophila melanogaster* (Wang et al., 1993), Feuerwanzen *Dysdercus peruvianus* (Bifano et al., 2010); Zikade *Nilaparvata lugens* (Price et al., 2007); Schlupfwespe *Aphidius ervi* (Caccia et al., 2007);

Feuerameise *Solenopsis invicta* (Chen et al., 2006) und *Apis mellifera* (Rether, 2012). Der am besten charakterisierte Glucosetransporter innerhalb der Klasse der Insekten ist ein Glucosetransporter, der in den Kenyon Zellen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* exprimiert wird (Wang et al., 1993). Dieser zeigt in der Funktionalität große Übereinstimmung mit den GLUTs in Säugetierzellen auf. So kann dieser Transporter, ähnlich wie beim Säuger, mit Cytochalasin B inhibiert werden und hat eine vergleichbare K_m für D-Glucose. Neben D-Glucose kann auch D-Fructose und D-Galaktose transportiert werden. Sequenzanalysen zeigen zudem, dass *Drosophila melanogaster* ein Gen besitzt, welches für Dmglut1 kodiert (Escher, 1999; Weizmann et al., 2009). Hierbei handelt es sich um einen Glucosetransporter, ähnlich dem GLUT1 in Säugern. Die Aminosäuren bilden wie beim Säugetier Transporter 12 Transmembranhelices, die Sequenz stimmt zu 50 % mit der des GLUT1 und zu 67 % mit der des GLUT3 überein. Die Expression dieses Gens konnte vor allem im embryonalen Gewebe aber auch im adulten Gehirn gezeigt werden und scheint daher essenziell für den Glucosetransport im Nervensystem des Insekts zu sein (Escher, 1999; Weizmann et al., 2009). Während sich diese Studien darauf konzentrieren den Transport der Glucose aus der Hämolymphe in die Zellen zu beschreiben, gibt es bisher nur wenige Untersuchungen, die den Transport der Glucose aus dem Darm in die Hämolymphe untersuchen. Denn auch für den Transport der durch die Nahrung bereitgestellten Glucose aus dem Darm in die Hämolymphe sind Glucosetransporter essenziell. Während beim Säuger hinreichend bekannt ist, dass für die Absorption der Glucose aus dem Darm ins Blut die SGLTs (sodium-driven sugar cotransporters) verantwortlich sind (Augustin und Mayoux, 2014), gibt es hierzu bei Insekten nur wenige Studien. Eine Arbeit von Caccia et al. aus dem Jahr 2007 zeigt, dass die Glucose Absorption bei der parasitoiden Wespe *Aphidius ervi* hohe Ähnlichkeiten zum Säuger aufweist. So konnte hier ebenso die Anwesenheit von GLUT2 und eines SGLT1 ähnlichen Proteins gezeigt werden. Ebenso konnte ein SGLT ähnlicher Transporter in der Wanze *Dysdercus perivianus* gefunden werden (Bifano et al., 2010). Bei der Honigbiene sind bisher keine SGLTs beschrieben. Der Darm spielt sowohl beim Säuger als auch beim Insekt eine Schlüsselrolle in der Versorgung des Organismus mit Energie. Hier wird die aufgenommene Nahrung durch Verdauungsenzyme in deren verwertbare Bestandteile aufgeschlüsselt und somit die

nötige Energie für den Organismus bereitgestellt. Anschließend gelangt unter anderem die gewonnene Glucose mittels Transporter aus dem Darm in die Hämolymphe. Der Darm ist somit wichtigster Bestandteil bei der Versorgung des Organismus mit Glucose. Der Verdauungstrakt des Insektes besteht in der Regel aus drei Teilen (**Abbildung 4**):

1. der Vorderdarm: dieser fasst Pharynx, Oesophagus, Kropf und Proventriculus zusammen. Der Kropf dient als Speicherorgan. Der Proventriculus fungiert als Schließmuskel und sorgt für die zielgerichtete Weiterleitung der Nahrung vom Kropf in den Mitteldarm. Der Vorderdarm ist von einer Cuticula ausgekleidet.
2. der Mitteldarm: dieser umfasst den Ventrikel und bei einigen Insektenarten auch die blindendenden Zäka. Der größte Teil der Verdauung und der Absorption findet im Ventrikel statt. Dieser ist in der Regel von der sogenannten peritrophischen Membran ausgekleidet. Diese chitinhaltige Membran bildet zum einen mechanischen Schutz gegen schädliche Nahrungsbestandteile und zum anderen werden hier die Verdauungsenzyme sezerniert. Das am häufigsten vorkommende Protein ist das Peritrophin. Dies wird von den posterioren Zellen des Mitteldarms gebildet, sobald Nahrung in den Verdauungstrakt gelangt und dient unter anderem dem Schutz des Darmgewebes vor unverdaulichen Nahrungsbestandteilen und schädlichen Mikroorganismen (Jimenez und Gilliam, 1990). Daneben spielt die peritrophische Membran eine wichtige Rolle in der Verdauung. So sorgt sie für die essenzielle Kompartimentierung des Darmlumens in ectoperitrophischen Raum (Raum zwischen Epithel und peritrophischer Membran) und endoperitrophischen Raum (Raum innerhalb der peritrophischen Membran)
3. der Enddarm: umfasst die Malpighi Gefäße, das Ileum und das Rektum. Die Malpighi Gefäße sind exkretorische Organe, während Ileum und Rektum an der Resorption von Wasser und Ionen beteiligt sind. (Snodgrass, 1910; Terra und Ferreira, 1994).

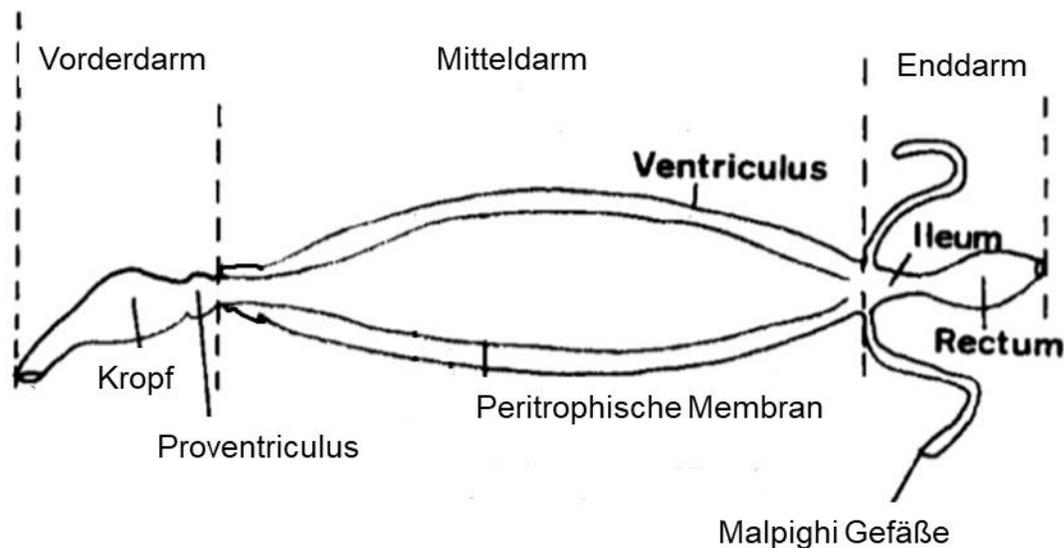


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Verdauungstraktes der Honigbiene (modifiziert nach Terra und Ferreira, 1994). Vorderdarm: bestehend aus Kropf und Proventriculus; Mitteldarm: bestehend aus Ventrikel und peritrophischer Membran und Enddarm: bestehend aus Ileum, Rektum und Malpighi Gefäßen.

Die Nahrung der Honigbiene besteht im Wesentlichen aus Pollen, Nektar und Honig. Während der Pollen die Protein- und Fettquelle darstellt, dienen Nektar und Honig als Kohlenhydratquelle. Die Nahrung gelangt zunächst über die Mandibeln (Pollen) oder über den Rüssel (Nektar und Honig) in den Mund, und gelangt dann weiter über den Oesophagus in den Kropf. Der Kropf dient hauptsächlich zum Speichern gesammelter Nahrung, bevor die Arbeiterin zurück zum Stock kehrt. Dennoch ist er ebenso in Königinnen und auch in Drohnen zu finden. Im Stock angelangt wird nahezu der gesamte im Kropf gespeicherte Nektar in eine Futterwabe eingelagert. Im Ventrikel angelangt, beginnt die Verdauung der Nahrung. Über das Darmepithel werden anschließend die gewonnenen Mikro- und Makronährstoffe in die Hämolymphe transportiert und gelangen mit dieser anschließend in die Zellen des Organismus, wo sie verbraucht werden.

1.4 Fragestellung

Eine reibungslos funktionierende Energiehomöostase ist essenziell für den Organismus. Gelangt diese aus der Balance, hat dies weitreichende Folgen. Ein essenzieller Baustein für die Energieversorgung ist Glucose. Die Auswirkungen von Neonicotinoiden

auf den Glucosemetabolismus sind im Säuger recht gut beschrieben. Studien, die sich mit der Biene beschäftigen, zeigen bisher immer nur indirekte Auswirkungen auf den Glucosemetabolismus. Viele der bereits gezeigten subletalen Effekte könnten damit erklärt werden, dass der Glucosemetabolismus durch Neonicotinoide gestört wird. Da sich bisherige Arbeiten jeweils nur mit Teilaspekten beschäftigen (zum Beispiel ausschließlich Verhalten oder molekulare Effekte), es aber bisher keine Studien gibt, die Verhaltensänderungen mit molekularen Effekten verknüpfen, soll in der vorliegenden Dissertation auf beide Ebenen eingegangen werden. Studien, welche den Effekt auf die Glucosetransporter in der Biene untersuchen fehlen gänzlich. Bisherige Untersuchungen im Säuger beschäftigen sich ausschließlich mit den Auswirkungen von Neonicotinoiden auf den Glucose Verbrauch einzelner Zellen, wohingegen die Glucoseaufnahme vom Darm und die Weiterleitung in das Blut bzw. die Hämolymphe noch nicht untersucht wurden. In dieser Arbeit soll also der Effekt des Neonicotinoids Thiamethoxam auf den Glucosemetabolismus der Biene untersucht werden. Dabei werden erstmals Verhaltensveränderungen mit molekularen Effekten verknüpft und die Effekte eines Neonicotinoids auf die Glucose Absorption im intakten Organismus untersucht. Im Zentrum steht die Hypothese, dass Thiamethoxam die Energiehomöostase stört und somit nicht nur das Verhalten der einzelnen Biene verändert, sondern auch die Überlebensfähigkeit des gesamten Stocks mindert. Dabei sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Verändert Thiamethoxam das Fraßverhalten der Biene?
2. Gibt es Auswirkungen auf den Glucosespiegel in der Hämolymphe?
3. Nimmt die Behandlung mit Thiamethoxam Einfluss auf die Funktionalität des Verdauungstraktes?
4. Gibt es Veränderungen in der Expression der Glucosetransporter GLUT 1a und GLUT 1b in Gehirn, Abdomen und Mitteldarm?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG)	Cayman Chemical Company, Ann Arbor
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Sigma Aldrich, München
Biotinazid	Jena Bioscience, Jena
BSA (Rinder Albumin Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Calciumchlorid-2-Hydrat)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Z-Chem, Saarbrücken
D-(+)-Glucose	Z-Chem, Saarbrücken
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
dNTP Mix (10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Z-Chem, Saarbrücken
EDTA (Dinatriumsalz-Dihydrat)	Z-Chem, Saarbrücken
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, München
Formaldehyd	Z-Chem, Saarbrücken
Glycerin	Z-Chem, Saarbrücken
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Z-Chem, Saarbrücken
H ₂ O (DNase/RNase frei)	Invitrogen, Darmstadt
Harnstoff	Z-Chem, Saarbrücken
HCL (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
KCL (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
Isopropylalkohol	Z-Chem, Saarbrücken

2. Material und Methoden

Methanol	Z-Chem, Saarbrücken
MgCl ₂ x6H ₂ O (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt
NaCl	Z-Chem, Saarbrücken
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat-2-Hydrat)	Z-Chem, Saarbrücken
NaN ₃ (Natriumazid)	Acros Organics, Geel
NaOH (Natriumhydroxid)	Z-Chem, Saarbrücken
Natriumacetat	Z-Chem, Saarbrücken
Natriumbutyrat	Sigma Aldrich, München
Nelkenöl	Apotheke, Saarbrücken
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma Aldrich, München
Paraffin Histowax	Leica, Solms
p-NPP (para-Nitrophenylphosphat)	AppliChem, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, München
RNase-Dekontaminationsreagenz	AppliChem, Darmstadt
Saccharose	Lebensmittelhandel
SYBR® Green 10000X	Sigma Aldrich, München
Thiamethoxam	Bayer
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma Aldrich, München
Triton-X-100	Fluka, Neu-Ulm
TRIzol™ Reagent	Fisher Scientific, Schwerte
Wasser UltraPure DNase/RNase frei	Fisher Scientific, Schwerte

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

96-well PCR Platten High Profile	Biozym, Oldendorf
96-well Platten Immuno-Plate	Nunc, Wiesbaden

2. Material und Methoden

96-well Platten Immuno-Plate (schwarz)	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Dentalwachs (medium)	Ubert, Raesfeld
Einwegskalpell	Braun, Melsungen
Falconröhrchen (steril, 15 ml und 50 ml)	Greiner, Solingen
Filterspitzen	Biozym, Oldendorf
Glaskapillaren Capilettor (1 - 5 µl)	Selzer, Waghäusel
Glucoseteststreifen	Bayer vital GmbH, Leverkusen
Glasobjektträger	Roth, Karlsruhe
Hamilton Spritze	Roth, Karlsruhe
Haushaltszucker	Lebensmittelgeschäft, Saarbrücken
Kanülen	Braun, Melsungen
Klebefilm für Multiplate 96	Biozym, Oldendorf
Metallstößel für Glaskapillaren	Selzer, Waghäusel
Modellierwachs Super Pink	Gebdi Dental-Products GmbH, Engen
Nitrocellulose-Membran (Optitran BA-S 85)	Schleicher/Schuell, Dassel
Optical adhesive film (für PCR Platten)	Finnzymes, Vantaa FIN
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Safe-seal Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (2 ml)	Braun, Melsungen
Rasierklingen	Drogerie, Saarbrücken
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml und 5 ml)	Eppendorf, Wesseling
Reaktionsgefäße (braun, 1,5 ml)	Greiner, Solingen
Textilklebeband	Tesa, Hamburg
Zahnstocher	Drogerie, Saarbrücken
Zellstofftücher	Kimberly-Clark, Roswell

2.1.3. Geräte

1 ml Glashomogenisator mit Glas S-Stößel	braun, Melsungen
Bechergläser	VWR, Darmstadt
Bienenracks	eigene Herstellung
Bienenröhrchen	eigene Herstellung
Binokular S6D	Leica, Solms
Bio-Rad CFX connect	
Real Time System	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Block-Heizgerät (Accu Block)	Labnet, Ried im Innkreis
Blotkammer	Owl Separation System
Blutzuckermessgerät Contour Set	Bayer vital GmbH, Leverkusen
Brutschrank	Horo, Ostfildern
Cool Snap HQ ²⁺ Kamera	Photometrics, München
ELISA Reader safire ²	Tecan, Crailsheim
Fangröhrchen PS-Röhrchen (68 ml)	Greiner, Solingen
Fangpyramide	eigene Herstellung
Fluoreszenzmikroskop Filtersatz	Chroma, Olching
Inkubationsschüttler Th15	Johanna Otto GmbH, Bodelshausen
Inverses Fluoreszenzmikroskop Axiovert	
200M	Carl Zeiss, Oberkochen
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott AG, Mainz
Klingenbrecher	Nopa Instruments, Tuttlingen
Kühlzentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Lötkolben	Baumarkt, Saarbrücken
Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikropipetten Puller Model P-87	Sutter Instrument, Freiburg
Mikroskop Leitz DMRB	Leica, Wetzlar

2. Material und Methoden

MX3000P QPCR System	Stratagene, Waldbronn
MyiQ2 Two-Color RT-PCR Detection System	Bio-Rad, München
pH-Meter (inoLab pH 730)	WTW, Weilheim
Pinzetten (Dumont)	neolab, Heidelberg
Pipetten (Einkanal: 10, 100, 200, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
Plastikwanne mit Deckel	eigene Herstellung
Präparationsbesteck	Laborbedarf, Hamburg
Rührheizgerät RCT basic	IKA-Labortechnik, Staufen
Schüttler KS501 digital	IKA-Labortechnik, Staufen
Semi Dry Elektroblotting	Owl, Rochester NY
Tischzentrifuge Spectrafuge 24D	Labnet, Berlin
Vortex VX 100	Labnet, Berlin
Waage CP3202S und CP225D	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Wesseling
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Wesseling

2.1.4 Puffer und Lösungen

Probenvorbereitung

PBS	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	8 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; pH 7,3-7,4

ELISA

Blockpuffer:	1 X PBS
	2 % [w/v] BSA
Färbelösung	1 mM p-NPP in RXN Puffer
Histonhomogenisierungspuffer	1 X PBS
	1 mM EDTA

2. Material und Methoden

	5 mM Na-Butyrat
Proteinhomogenisierungspuffer	1 X PBS
	1 mM EDTA
Proteinhomogenisierungspuffer mit Harnstoff	1 X PBS
	1mM EDTA
	8 M Harnstoff
RXN Puffer	1 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O
	100 mM Tris-HCL (pH 8,7)

HämolympH-Glucose-Bestimmung

Humanringer, NaCHO ₃ gepuffert	147 mM NaCl
10 fach	4 mM KCl
	2,2 mM CaCl ₂
	24 mM NaHCO ₃
	pH 7,4

Dot Blot

Blotpuffer	0,2 M Glycin
	20 % [v/v] Methanol
	0,25 M Tris
Blockpuffer	2 % [w/v] BSA in PBS
Waschpuffer	1xPBS
Färbelösung	0,1223 µM NBT in RXN
	122,53 µM BCIP in DMSO

Untersuchung des Mitteldarms

"angepasster" Bienenringer (100ml)	
pH 6,7 und 0,296 osmolar	760 mg NaCl
24	

45 mg KCl
74 mg CaCl₂x2H₂O
81 mg MgCl₂x6H₂O
240 mg Hepes
95 mg Glucose

2.1.5 Enzyme und Kits

Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Quant-it™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit	Invitrogen, Darmstadt
Quant-it™ RiboGreen® RNA Assay Kit	Invitrogen, Darmstadt
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase Free DNase Set	Qiagen, Hilden

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 primäre Antikörper

Glut1 b Antikörper aus Ratte (polyklonal)	eigene Herstellung
Glut1 a Antikörper aus Ratte (polyklonal)	eigene Herstellung
R1H7 Antikörper aus Maus (polyklonal)	eigene Herstellung
Anti-acetylated Tubulin aus Maus (monoclonal)	Sigma-Aldrich, München
Histone H3K4me3 aus Kaninchen (polyklonal)	Abcam, Cambridge
Tri-Methyl-Histone H3 (Lys27) aus Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling, Cambridge
Acetyl-Histone H3 (Lys18) aus Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling, Cambridge
Histone H3 (Acetyl-Lys9) aus Kaninchen (polyklonal)	Sigma-Aldrich, München

2.1.6.2 sekundäre Antikörper

Anti-Maus IgG, alkalische

Phosphatase-gekoppelt aus Ziege Sigma Aldrich, München

Anti-Ratte IgG, alkalische

Phosphatase-gekoppelt aus Ziege Sigma Aldrich, München

Anti-Kaninchen IgG, alkalische

Phosphatase-gekoppelt aus Ziege Sigma Aldrich, München

2.1.7 Primer

Die Primer für die real-time PCR wurden HPLC-gereinigt in einer Konzentration von je 100 M geliefert. Sie stammten von der Firma Sigma Aldrich, München. Die Sequenzen der Primer sind **Tabelle 1** zu entnehmen.

2.1.8 Software und Datenbanken

- BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- ImageJ (Bildverarbeitung und -analyse in Java)
- Microsoft Excel
- VassarStats (<http://vassarstats.net/>)
- National Center for Biotechnology Information, NCBI (Molekularbiologische Datenbank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung der Versuchstiere

Im Sommer, von April bis September, wurden die Bienenstöcke im botanischen Garten der Universität des Saarlandes gehalten. Die benötigten Versuchstiere wurden mit einer Plexiglaspyramide von dem Einflugloch des Stockes abgefangen, jeweils fünf Tiere in ein Fangröhrchen überführt und anschließend in das Labor gebracht. Im Folgenden werden Tiere aus diesem Zeitraum als „Sommerbienen“ bezeichnet.

Im Winter, von Oktober bis März, wurden die Stöcke in einem mit Gaze eingefassten Flugraum gehalten. Dieser befand sich in einem Gewächshaus. Licht, Temperatur (23-25 °C mit Nachtabenkung) und Luftfeuchtigkeit (ca. 50 %) wurden künstlich konstant gehalten. Als Nahrungsquelle dienten zum einen eine Zuckerwasserlösung und zum anderen fein gemahlener Pollen. Die für die Experimente benötigten Tiere wurden mit Hilfe eines Fangröhrchens aus dem Flugraum gefangen und anschließend ins Labor gebracht. Im Folgenden werden Tieren aus diesem Zeitraum als „Winterbienen“ bezeichnet.

Für die Experimente wurden sowohl im Sommer als auch im Winter nur Sammlerbienen verwendet.

2.2.2 Vorbereitung der Versuchstiere

Vor der Versuchsdurchführung wurden die Bienen in kleine Plastik- bzw. Metallröhrchen eingespannt. Hierfür wurden die Tiere zunächst auf Eis immobilisiert und dann mit Hilfe von Textilklebeband in den Röhrchen fixiert, so dass nur noch der Kopf mit den Antennen und der Proboscis frei beweglich war. Mit Hilfe einer Spritze wurden die Bienen mit einer 1 M Saccharose-Lösung gefüttert. Die jeweilige Futtermenge und -Zeit war abhängig vom durchgeführten Experiment. Zwischen den Experimenten wurden die Tiere in einer feuchten Plastikwanne aufbewahrt, die mit einem schwarzen Plastikdeckel abgedunkelt wurde.

2.2.3 Behandlung der Versuchstiere mit Thiamethoxam

Um die Auswirkungen der Neonicotinoide auf die Biene zu untersuchen, wurden die Tiere vor Beginn der eigentlichen Experimente mit den entsprechenden Substanzen gefüttert. Hierfür wurden die Substanzen in 1 M Saccharose-Lösung angesetzt. Die jeweils verwendete Konzentration und Fraßmenge unterschied sich in den verschiedenen Experimenten und ist dem entsprechenden Methodenteil zu entnehmen. Für die Kontrollgruppe wurde die entsprechende Menge Lösungsmittel (0,0045 % DMSO) ebenfalls in 1 M Saccharose-Lösung gefüttert.

2.2.4. Ermitteln der subletalen Dosis

Da bezüglich der subletalen Dosis die in der Literatur angegebenen Werte stark variieren (von 0,1 ng/b (Hassani et al., 2007) bis hin zu 4,53 ng/b (Tosi et al., 2017)),

musste diese zunächst ermittelt werden. Hierfür wurden die Bienen mit 0,3 ng, 0,6 ng, 1 ng und 1,2 ng Thiamethoxam in 2 µl 1 M Saccharose-Lösung und 0,0045 % DMSO gefüttert. Die Kontrollgruppe erhielt 2 µl einer 1 M Saccharose-Lösung mit 0,0045 % DMSO. Anschließend wurde sowohl die Sterberate als auch die Proboscis extension response (PER) 2 h und 24 h nach der Behandlung dokumentiert.

2.2.4.1 Zuckerwasserempfindlichkeit

Hierbei wurde die sogenannte proboscis extension response (PER), also das Herausstrecken des Rüssels als Antwort auf einen gustatorischen Reiz, gemessen. Hierfür wurden die Antennen der Tiere mit Wasser und Saccharose-Lösungen in aufsteigenden Konzentrationen (0 M, 0,03 M, 0,1 M, 0,3 M und 1 M) berührt und notiert, ob die Biene PER zeigt. Zwischen den Stimulationen wurde etwa 2 min pausiert. Die positiven Reaktionen auf Wasser und Zuckerwasser der einzelnen Individuen addiert und ergaben den sogenannten „Score“. Alternativ wurden die Reaktionen der einzelnen Individuen je Konzentration prozentual angegeben. Getestet wurde 2 h und 24 h nach der Behandlung mit dem Neonicotinoid.

2.2.5 Käfigversuche

Um die Auswirkung der Neonicotinoide auf das Fraßverhalten der Biene zu untersuchen, wurden Käfigversuche durchgeführt. Hierbei wurden die Bienen in gleich großen Gruppen von 15-20 Tieren für 72 h in kleinen Käfigen gehalten (10 cm x 6 cm x 8 cm), wobei die Flächen 10 cm x 8 cm mit Gaze bespannt waren. Die Käfige entstammten aus eigener Herstellung. Als Futterquelle diente 1 M Saccharose-Lösung, sowie Wasser. Diese wurden in einzelnen Reihen einer 96 Well Platte dargeboten. Diese wurden mittig auf dem Boden des Käfigs platziert, dabei wurde darauf geachtet, dass die Futterquelle für die Tiere von allen Seiten frei zugänglich war. Die bereitgestellte Menge an Zuckerwasser wurde vor Experimentbeginn gewogen. Die Bienen konnten über den gesamten Zeitraum ad libidum fressen/trinken und frei zwischen Wasser und Zucker wählen. Um die Verdampfung des Zuckerwassers zu berücksichtigen wurde zu jedem Experiment ein Käfig ohne Bienen, mit Wasser und Zuckerwasser im Inkubator mitgeführt. Die konsumierte Menge an Zucker wurde nach 2

h, 24 h, 48 h und 72 h gemessen. Hierfür wurde zum jeweiligen Zeitpunkt die Menge an Zuckerwasser gewogen und die Differenz zur Anfangsmenge gebildet. Zusätzlich wurde die Evaporationsmenge des leeren Käfigs abgezogen. Anschließend wurde die Fraßmenge pro Biene pro Stunde errechnet. Die Bienen wurden am Vortag gefangen, eingespannt und satt gefüttert. Am Tag des Versuchsbeginns wurden die Bienen zunächst anhand des PER in zwei gleiche Gruppen eingeteilt. Anschließend erfolgte die entsprechende Behandlung entweder mit Lösungsmittel-Kontrolle oder mit dem Neonicotinoid. Um die Bienen aus den Röhrchen in die Käfige zu überführen, wurden sie zunächst einzeln auf Eis immobilisiert, mit Hilfe einer Federstahlpinzette vorsichtig aus dem Röhrchen herausgeholt und in dem Käfig platziert. Die Käfige wurden in einem feuchten Inkubator bei 37°C und Dunkelheit über den gesamten Versuchszeitraum gehalten.

2.2.6 Messung der Hämolymphe-Glucose

Zur Messung des Hämolymphe-Glucosespiegels wurde jeder Biene 2 µl Hämolymphe entnommen. Hierfür wurde zunächst der Chitinpanzer am Thorax mit einer Injektionsnadel punktiert und anschließend mit einer Hamilton-Spritze die Hämolymphe entnommen. Die Messung erfolgte mit einem kommerziell erwerbbaaren Blutzuckermessgerät von Bayer. Dieses schließt einen Messbereich von 0,1 bis 6 mg/ml Glucose ein. Die entnommene Hämolymphe wurde auf einen Objektträger gegeben, unverzüglich mit carbonatgepuffertem Humanringer verdünnt (mindestens 1:1 [v/v]) und gemessen.

Um durch Neonicotinoide verursachte Veränderungen der Hämolymphe-Glucose zu untersuchen, wurde zunächst bei jeder Biene eine Messung vorgenommen und die Bienen anschließend mit der entsprechenden Behandlungslösung gefüttert. Die zweite Messung fand dann entweder 3 h oder 24 h nach der Behandlung statt (siehe **Abbildung 5**).

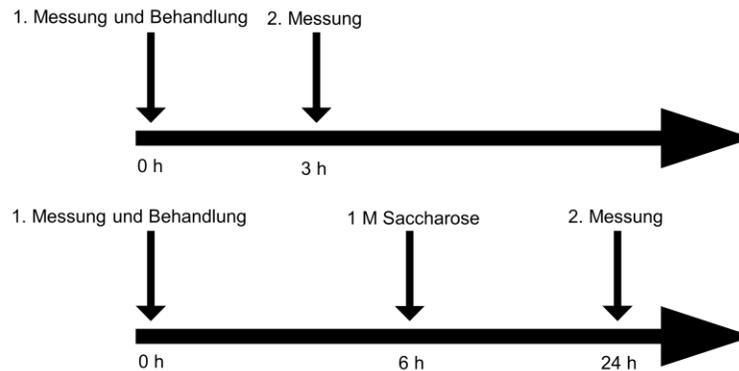


Abbildung 5: Zeitstrahl zum Ablauf der Hämolymphe-Glucose-Messung

2.2.7 Messung der Hämolymphe-Glucose-Dynamik mittels 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG)

Um den Glucose Verbrauch der Honigbiene unter Einfluss von Thiamethoxam zu messen, wurden die Tiere zunächst am Tag vorher gefangen und mit 2-3 Tropfen 1 M Saccharose-Lösung gefüttert. Am darauffolgenden Tag wurden die Tiere zunächst mit Thiamethoxam behandelt (0,3 ng/Biene) und anschließend mit 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG) gefüttert. Hierfür wurde die Stocklösung (3 mM 2-NBDG in H₂O) 1:1 mit einer 1 M Saccharose-Lösung verdünnt. Von dieser 1,5 mM 2-NBDG Lösung wurde jeder Biene 7,5 µl gefüttert. Anschließend wurde den Bienen wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben nach 30 min, 60 min und nach 3 h je 1 µl Hämolymphe entnommen und in eine schwarze 96 Well Platte gegeben, in welche vorher je Well 49 µl angepasster Bienenringer vorgelegt wurde. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal mit dem ELISA Reader safire² von Tecan gemessen (Anregung: 485 nm; Emission: 535 nm).

2.2.8 Untersuchung des Proventriculus mittels 2-NBDG

Um zu überprüfen, ob Thiamethoxam Einfluss auf den Transport von Glucose vom Kropf in den Mitteldarm nimmt, wurde der Verdauungstrakt der Biene mit Hilfe von 2-NBDG untersucht. Hierfür wurden Bienen gefangen, in Plastikröhrchen eingespannt und mit 2-3 Tropfen einer 1 M Saccharose Lösung gefüttert. Am nächsten Tag wurde den Bienen je 7 µl einer 1,5 mM 2-NBDG Lösung gefüttert (Die Lösung wurde wie in Kapitel 2.2.7

beschrieben angesetzt). Zum Zeitpunkt 30 min bzw. 180 min nach der Fütterung mit 2-NBDG wurden die Bienen einzeln auf Eis betäubt und der Verdauungstrakt vorsichtig heraus präpariert. Hierfür wurden zunächst Kopf, Flügel und Beine mit einem scharfen Skalpell entfernt. Anschließend wurde der Torso mit Hilfe einer Stecknadel auf einem Silikonkissen fixiert. Um den Verdauungstrakt ohne Beschädigungen zu entfernen, wurde mit Hilfe eines Klingenbrechers und einer Rasierklinge zunächst der Chitinpanzer entfernt. Hierfür wurde dieser seitlich aufgeschnitten und vorsichtig, Segment für Segment vom Rest des Torsos abgetrennt. Der nun freiliegende Verdauungstrakt konnte dann vorsichtig aus dem Torso entfernt werden. Hierbei war sorgfältig darauf zu achten, dass der Kropf nicht vom Mitteldarm abreißt. Anschließend wurde der Verdauungstrakt auf einen Objektträger mit Hohlschliff gegeben. Damit das Präparat während der Messung am Fluoreszenzmikroskop nicht austrocknet, wurden 100 µl Humanringer ohne Glucose auf den Objektträger gegeben. Der so präparierte Verdauungstrakt wurde anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht und fotografiert. Mit Hilfe des Computerprogramms Image J konnte das Verhältnis des Fluoreszenzsignals von Mitteldarm zu Kropf ermittelt werden. Hierfür wurden die entsprechenden Strukturen markiert und die Helligkeit gemessen.

2.2.9 Untersuchung des Glucosetransports vom Mitteldarm in die Hämolymphe mittels 2-NBDG

Um zu überprüfen, ob Thiamethoxam den Glucosetransport vom Mitteldarm in die Hämolymphe beeinflusst, wurde abermals mit 2-NBDG gearbeitet. Die Bienen wurden am Vortag gefangen, eingespannt und mit 2-3 Tropfen 1 M Saccharose Lösung gefüttert. Am Versuchstag wurden die Bienen mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam bzw. der entsprechenden Menge DMSO behandelt und mit 7 µl einer 1,5 mM 2-NBDG Lösung gefüttert (siehe Kapitel 2.2.7). Zum Zeitpunkt 30 min bzw. 180 min nach der Gabe der 2-NBDG Lösung wurde der Mitteldarm wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben präpariert. Nach Entnahme des Mitteldarms wurde dieser sowohl am Übergang zum Kropf als auch am Übergang zum Rektum mit einem Haar abgebunden. Kropf und Rektum wurden dann vorsichtig mit einem scharfen Skalpell abgeschnitten. Der so verschlossene Mitteldarm

wurde anschließend einmal in 400 µl Bienenringer gewaschen und in ein Well einer schwarzen 96 Well Platte überführt. Vorher wurden je Well 100 µl angepasster Bienenringer vorgelegt. Der Bienenringer wurde angepasst, indem die Glucosemenge an die Messungen aus Kapitel 2.2.5 angepasst wurde und zudem die Osmolarität an die der Hämolymphe angeglichen. Hierfür wurde sowohl hungrigen als auch satten Bienen Hämolymphe abgenommen und in einem Osmometer die Osmolarität bestimmt. Diese lag im Mittel bei 0,296 osmolar. Zusätzlich wurde Thiamethoxam bzw. DMSO zum Ringer hinzugegeben. Ausgehend davon, dass die Biene in etwa 100 mg wiegt (Snodgrass, 1910) wurden je Well 2 ng Thiamethoxam bzw. die entsprechende Menge DMSO hinzugefügt. 30 min und 180 min nach der Entnahme des Darms wurde mittels Multiplate Reader gemessen, wieviel 2-NBDG aus dem Darm in den Bienenringer austrat, indem die Fluoreszenz des Bienenringers gemessen wurde. Während der Messung wurde der Darm in einem weiteren mit Bienenringer gefüllten Well zwischengelagert. Zum Abschluss des Experiments wurde der gesamte Inhalt des Darms in das entsprechende Well entleert und das Fluoreszenzsignal gemessen.

2.2.10 Untersuchung der Glucosetransporter

Um zu überprüfen, ob Thiamethoxam Einfluss auf die Glucosetransporter nimmt, wurden diese zunächst mittels immunochemischen Verfahren (ELISA und Dot Blot) gemessen.

2.2.10.1 Gehirnpräparation

Die Bienen wurden einzeln auf Eis betäubt, der Kopf mit einem Skalpell entfernt und in einem Wachsbett fixiert. Anschließend wurde die Kopfkapsel waagrecht geöffnet (**Abbildung 6**), die Drüsen und Ocellen mit einer feinen Pinzette entfernt und das gesamte Hirn einschließlich der optischen Loben herausgetrennt und mit einer Pinzette entnommen. Die entnommenen Gehirne wurden einzeln in Eppendorfgefäße mit 13 Keramikkügelchen und 300 µl Homogenisierungspuffer überführt und zweimal 1 min bei full speed auf einem Schüttler homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend auf 500 µl Endvolumen mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt. Die Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.



Abbildung 6: Überblick auf das Bienehirn nach Öffnen der Kopfkapsel.

2.2.10.2 Abdomenpräparation

Um die Abdomen zu homogenisieren wurde zunächst der Kopf (siehe 2.2.10.1) entfernt. Danach wurden mit zwei spitzen Pinzetten Thorax und Abdomen voneinander getrennt und der Darm entfernt. Hierbei war darauf zu achten, dass dieser in einem Stück entfernt wurde. Zum Entfernen des Darms wurde mit Hilfe einer spitzen Pinzette das letzte Segment gegriffen und mitsamt Darm und Stechapparat vom Rest des Abdomens entfernt. Anschließend wurde das Abdomen in 500 µl Homogenisierungspuffer mit Hilfe eines Glashomogenisators homogenisiert. Um größere Gewebestücke zu entfernen, wurden die Proben anschließend 4 min bei 8000xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Proben, die nicht klar waren, wurden verworfen. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.10.3 Mitteldarmpräparation

Zum Herstellen der Mitteldarmhomogenate wurden die Mitteldärme wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben präpariert und dann vorsichtig aus dem Torso entfernt. Die entnommenen Mitteldärme wurden einzeln in Eppendorfgefäße mit 13 Keramikkügelchen und 300 µl Homogenisierungspuffer überführt und zweimal 1 min bei full speed auf einem Schüttler homogenisiert. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.10.4 Dot Blot

Mit Hilfe des Dot Blot Verfahrens wurde die relative Menge an Glucosetransportern sowohl im Bienenhirn als auch im Abdomen und im Mitteldarm bestimmt. Hierfür wurde zunächst eine 6-stufige Verdünnungsreihe (1:2) in Homogenisierungspuffer hergestellt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit purem Homogenisierungspuffer mitgeführt. Anschließend wurden 50 µl der vorverdünnten Proben (Hirn 1:4 in Homogenisierungspuffer vorverdünnt, Abdomen und Mitteldarm 1:18 in Homogenisierungspuffer vorverdünnt) mittels einer Acht-Kanal-Pipette auf eine in Blotpuffer äquilibrierte Nitrozellulose-Membran pipettiert und mittels Vakuums angesaugt. Nachfolgend wurde die Membran nochmals mit Blotpuffer gespült, 5 min leergesaugt und 5 min trocknen gelassen. Darauf folgten 1 h Inkubation bei Raumtemperatur in 2 % BSA [w/v]. Nach dem Blocken folgte die Inkubation mit den Glut1 Antikörpern (Verdünnung 1:10000) für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Nitrozellulose-Membran dreimal 3 min mit PBS gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Verdünnung 1:10000) für 1 h bei Raumtemperatur. Auch nach diesem Inkubationsschritt folgte dreimaliges Waschen für 3 min mit PBS. Für die Färbung wurde die Nitrozellulose-Membran in die Färbelösung gegeben und darin für 20-60 min bei Raumtemperatur gefärbt. Die Auswertung erfolgte über ImageJ und Microsoft Office Excel. Hierfür wurde für jede Verdünnungsreihe die Steigung bestimmt, indem die Grauwerte der einzelnen Verdünnungen gemessen wurden. Dabei wurden Verdünnungsreihen ausgeschlossen, deren Steigung ein Bestimmtheitsmaß unter 0,8 aufwiesen. Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte der Steigungen auf den Mittelwert des entsprechenden Einzelexperiments normiert, mit Standardabweichung aufgetragen und mit t-Test analysiert.

2.2.10.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA gehört zu den Immunassay-Verfahren, bei dem native Antigene über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ELISA dazu genutzt, die Menge an Glucosetransportern sowohl im

Bienenhirn als auch im Abdomen der Tiere zu bestimmen. Vor dem Auftragen der Proben auf die 96-well Immuno Plate wurden die Hirnhomogenate 1:2 und die Abdomen- bzw. Mitteldarmhomogenate 1:5 in Homogenisierungspuffer vorverdünnt. Anschließend erfolgte eine 5-stufige Verdünnungsreihe (in 1:3 Verdünnungsstufen). Als Negativkontrolle diente reiner Homogenisierungspuffer ohne Homogenat. Nach Auftragen der Verdünnungsreihe erfolgte 1 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Danach wurden die Überstände verworfen und es erfolgte ein einstündiger Blocking-Schritt mit 300 µl je Well 2 % BSA [w/v]. Auch der Blockpuffer wurde verworfen, bevor die Inkubation mit den Glut1 Antikörpern (50 µl je Well) für 1 h bei Raumtemperatur erfolgte. Diese wurden 1:1000 in 2 % BSA [w/v] verdünnt. Als Referenz-Proteine dienten die regulatorische Untereinheit der PKA Typ2 (Antikörper: R1H7; Verdünnung 1:500) (im Gehirn) und acetyliertes Tubulin (Antikörper: Anti-acetylated Tubulin; Verdünnung 1:10.000) (in Abdomen und Mitteldarm). Anschließend wurde die Platte dreimal 3 min mit PBS gewaschen und 50 µl je Well des sekundären mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelten Antikörpers (Verdünnung: 1:4000) hinein pipettiert. Der sekundäre Antikörper verweilte 1 h bei Raumtemperatur auf der Platte, bevor diese erneut dreimal 3 min mit PBS gewaschen wurde. Anschließend wurden je Well 200 µl der Färbelösung dazugegeben und bis zur Gelbfärbung bei 37°C inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte in Safire² Plate-Reader bei 405 nm. Die Auswertung erfolgte anschließend in Microsoft Office Excel, indem Steigung und Bestimmtheitsmaß der einzelnen Verdünnungen berechnet wurden. Für die statistische Auswertung wurden zunächst die Mittelwerte der Steigungen auf den Mittelwert der jeweiligen Platte normiert, mit Standardabweichung aufgetragen und mit t-Test analysiert. Ausgeschlossen wurden dabei Verdünnungsreihen, deren Bestimmtheitsmaß >0,8 waren.

2.2.11 Untersuchung der mRNA

2.2.11.1 RNA-Aufreinigung aus Geweben

Die RNA wurde mit Hilfe von TRIzol™ Reagent Hirn, Abdomen und Mitteldarm isoliert. Die Bienenhirne und Mitteldärme (die Präparation erfolgte wie in Kapitel 2.2.7 und Kapitel 2.2.9.1 beschrieben) wurden in 300 µl TRIzol™ Reagent mit Hilfe von 13

Keramikkügelchen homogenisiert. Die Abdomen wurden in 500 µl TRIzol™ Reagent mit Hilfe von (mit RNase-Dekontaminationsreagenz behandelten und mit DEPC-H₂O gespülten) Glashomogenisatoren homogenisiert. Nach der Homogenisierung wurde zu jeder Probe 60 µl Chloroform hinzugegeben, kurz gevortext, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 12000xg und 4°C für 15 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die oberste Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dabei war darauf zu achten, dass es zu keiner Kontamination mit den anderen Phasen kam. Anschließend wurde zu jeder Probe 150 µl Isopropanol und 1 µl Glykogen hinzugefügt. Die RNA-Fällung erfolgt bei -70°C über Nacht. Nach dem Auftauen wurden die Proben nochmals 10 min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 200 µl 75% Ethanol und Zentrifugation bei 7600xg und 4°C für jeweils 7 min. Nach dem zweiten Waschschrte wurde das Pellet für ca. 20 min bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Zur Konzentrationsbestimmung der RNA wurde diese zu einem Volumen von 20 µl in RNase freiem Wasser verdünnt. Als Referenzwert diente reines RNase freies Wasser. Durch Messen der optischen Dichte mit dem ELISA Reader safire² von Tecan bei 260 nm (Nucleinsäure-Absorption) und bei 280 nm (Protein-Absorption) konnte die Reinheit der Proben bestimmt werden. Es wurden ausschließlich Proben weiterererarbeitet, deren OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0 lag.

2.2.11.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mittels RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas nach Herstellerprotokoll. Dabei wurden immer 11 µl RNA-Lösung eingesetzt. Bei diesem Verfahren wird mRNA unspezifisch mittels einer Reversen Transkriptase und Oligo-(dT)_x Primern in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese dient anschließend als Template zur Amplifikation spezifischer Gene in der real-time PCR.

2.2.11.3 Real Time PCR

Die real time PCR dient zur Vervielfältigung und gleichzeitiger Quantifizierung von DNA. Die Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenz-Messungen während der PCR Zyklen in

Echtzeit. Hierbei korreliert der erste signifikante Fluoreszenzanstieg der exponentiellen Phase (C_t =Threshold Cycle) direkt mit der Ausgangsmenge an cDNA.

Um sicher zu stellen, dass keine genomische DNA amplifiziert wurde, wurden die Primer für die real time PCR intron-exon überspannend kreiert. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Primer zum Teil das 3'-Ende des einen Exons und zum Teil das 5'-Ende des benachbarten Exons abdeckte. Die Länge des Amplikons betrug 125 bis 150 Basenpaare. Die Programme "Oligonucleotide Properties Calculator" und "IDT OligoAnalyzer 3.1" wurden genutzt, um die Primer so zu designen, dass sie weder Selbst- und Heterodimere noch Haarnadelstrukturen bildeten, der G/C-Gehalt bei 40-60% und die Schmelztemperatur zwischen 60°C und 65°C lag. Durch Analyse mit BLAST wurde zudem sichergestellt, dass es keine weiteren Sequenzhomologien in der Biene gibt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind der **Tabelle 1** zu entnehmen.

Tabelle 1: Sequenzen der in der in der real-time PCR verwendeten Primer.

Gen / ID	Sequenz der real-time PCR Primer 5'-3'	
<i>GLUT 1a</i> 409424	forward	CACCTCAGCAGCTTATTGAAG
	reverse	CACCAGAGAACCACCGATC
<i>GLUT 1b</i> 409933	forward	AAGACTAGCCTTGAAAACACTACAG
	reverse	CAAGCTGCTCCTGTCGTTAC
<i>EF1-alpha</i> 544670	forward	CCTCTTCAGGACGTATATAAAATCG
	reverse	AGCTTCGTGATGCATTTCAACAG

2.2.11.4 Durchführung der Real Time PCR

Bei der Durchführung der real time PCR war darauf zu achten, dass immer steril und mit DNase- und RNase-freien Materialien gearbeitet wurde, sowie Pipettenspitzen mit Filtern verwendet wurden. Die real time PCR wurde mit dem CFX Connect™ Real-Time PCR Detection Systeme von BioRad durchgeführt und mit der dazugehörigen Software ausgewertet. Als Fluoreszenzfarbstoff diente EvaGreen® von Biotium. Als Template dienten die Reaktionsansätze der reversen Transkription (siehe Kapitel 2.2.10.2). Der PCR Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2. Material und Methoden

1 µl Probe
5 µl EvaGreen®
0,4 µl forward Primer (10 µM)
0,4 µl reverse Primer (10 µM)
3,2 µl DEPC H₂O

Für jeden gemessenen Primer wurde eine Negativkontrolle ohne Template mitgeführt. Von jedem Reaktionsansatz wurden jeweils Dupletts pipettiert. Die Reaktion wurde auf Eis und im Dunkeln in 96-Well Platten angesetzt, mit einem Klebefilm verschlossen, 1 min bei 4°C mit 1000 rcf abzentrifugiert und in das PCR-Gerät überführt. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung:	95 °C 3 min	
Denaturierung:	95 °C 10 sec	
Hybridisierung:	58 °C 18 sec	40 Zyklen
Elongation:	72 °C 18 sec	
Denaturierung:	95 °C 30 sec	
Hybridisierung:	58 °C 18 sec	Diss.-Kurve
Denaturierung:	95 °C 30 sec	

3. Ergebnisse

3.1 Ermitteln der subletalen Dosis

Da die in der Literatur verwendeten Dosen von Thiamethoxam stark variieren (von 0,1 ng/Biene (Hassani et al., 2007) bis hin zu 4,53 ng/Biene (Tosi et al., 2017), wurde die subletale Dosis für die vorliegende Arbeit neu ermittelt. Hierfür wurden sowohl die Zuckerwasserempfindlichkeit als auch die Mortalität nach Behandlung mit verschiedenen Dosen Thiamethoxam gemessen. Aus vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass Sommer- und Winterbienen unterschiedlich auf diverse Behandlungen reagieren. Daher wurden alle Experimente sowohl mit Sommer- als auch mit Winterbienen durchgeführt. Wobei Winterbienen solche Tiere sind, die im Flugraum von Oktober bis März gefangen wurden und Sommerbienen im Freiland von April bis September gefangen wurden.

3.1.1 Mortalität

Sowohl Sommer- als auch Winterbienen wurden mit 0,3 ng/Biene, 0,6 ng/Biene, 1 ng/Biene und 1,2 ng/Biene Thiamethoxam in 0,0045 % DMSO behandelt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Thiamethoxam in 1 M Zuckerwasser verdünnt und anschließend den Bienen gefüttert. Für die Kontrolle wurde eine 1 M Zuckerwasserlösung mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel (0,0045 % DMSO) hergestellt. Sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Bienen bekamen 2 µl der jeweiligen Zuckerwasserlösung. Anschließend wurde die Mortalität nach 2 h und nach 24 h gemessen. Die Behandlung mit 1,2 ng/Biene führte sowohl im Sommer als auch im Winter bereits nach 2 h zu einem signifikanten Anstieg der Sterberate verglichen mit der Kontrolle (**Abbildung 7**). Die Behandlung mit 1 ng/Biene zeigte im Sommer keinen Effekt auf die Mortalität, im Winter dagegen starben bereits 2 h nach der Behandlung signifikant mehr Bienen, als in der Kontrolle. Weder die Behandlung mit 0,6 ng/Biene noch mit 0,3 ng/Biene führte zu einer signifikanten Änderung der Sterberate nach 2 h und nach 24 h. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Folgenden nur noch mit 0,6 ng/Biene und 0,3 ng/Biene gearbeitet.

3. Ergebnisse

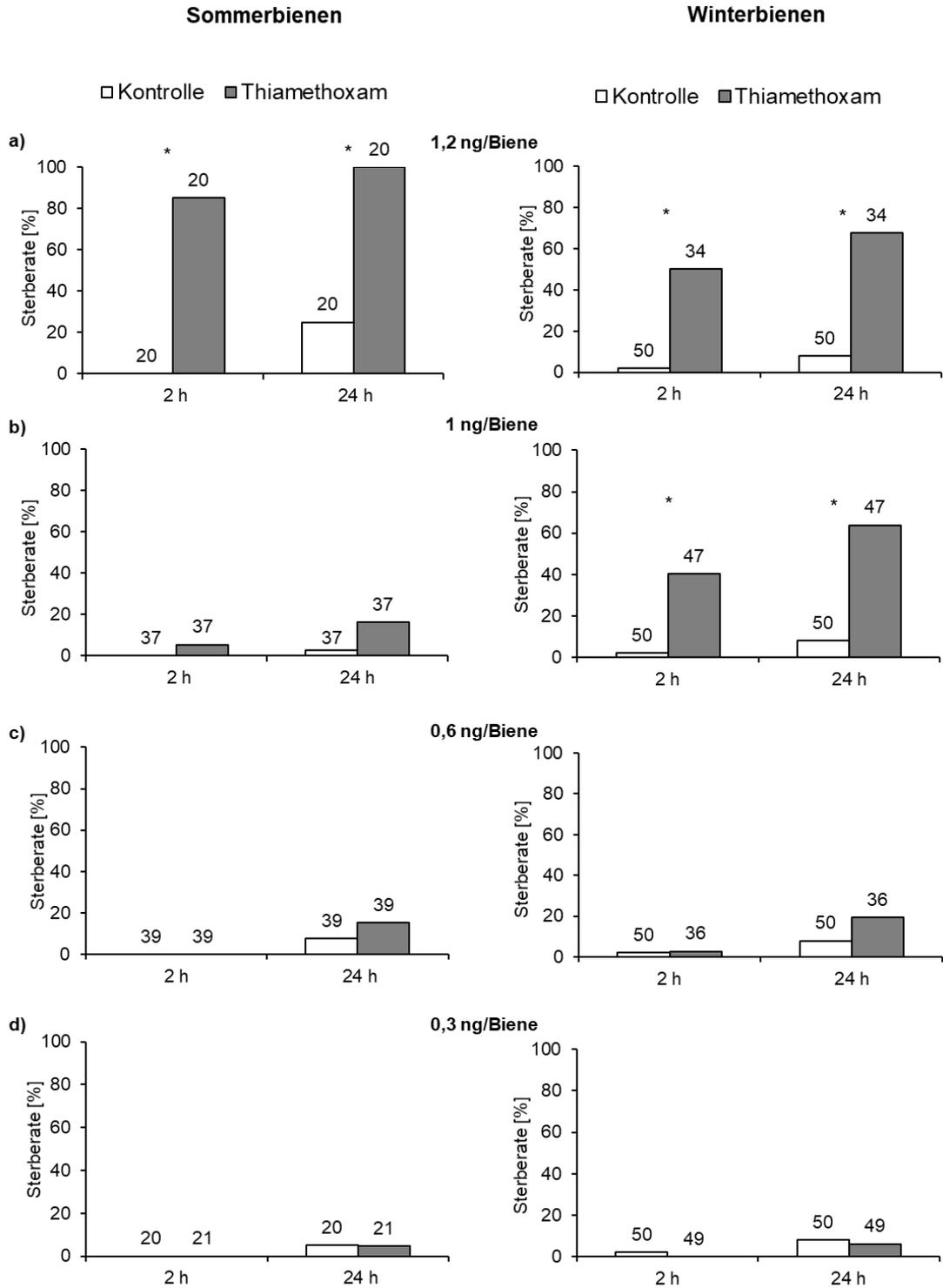


Abbildung 7: Sterberate nach Behandlung der Bienen mit a) 1,2 ng/Biene, b) 1 ng/Biene, c) 0,6 ng/Biene und d) 0,3 ng/Biene Thiamethoxam, 2 h und 24 h nach Fütterung. weiße Balken: Kontrollgruppe, graue Balken: mit Thiamethoxam behandelte Bienen. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken. *: $p < 0,05$, χ^2 -Test.

3.1.2 Thiamethoxam reduziert die Zuckerwasserempfindlichkeit bei Winterbienen

Da sowohl bei den Sommerbienen als auch bei den Winterbienen die Sterblichkeit nach der Behandlung mit 1,2 ng/Biene und 1 ng/Biene Thiamethoxam signifikant anstieg, wurden diese Dosen in den folgenden Versuchen nicht weiter getestet.

Der Test auf Zuckerwasserempfindlichkeit zeigte, dass keine der verwendeten Konzentrationen (0,6 ng/Biene und 0,3 ng/Biene) einen Effekt auf den PER (**P**roboscis **E**xtension **R**esponse) der Sommerbienen hat (**Abbildung 8**). Im Winter dagegen zeigten die Tiere nach der Behandlung mit 0,6 ng/Biene eine reduzierte Reaktion auf die dargebotenen Saccharoselösungen.

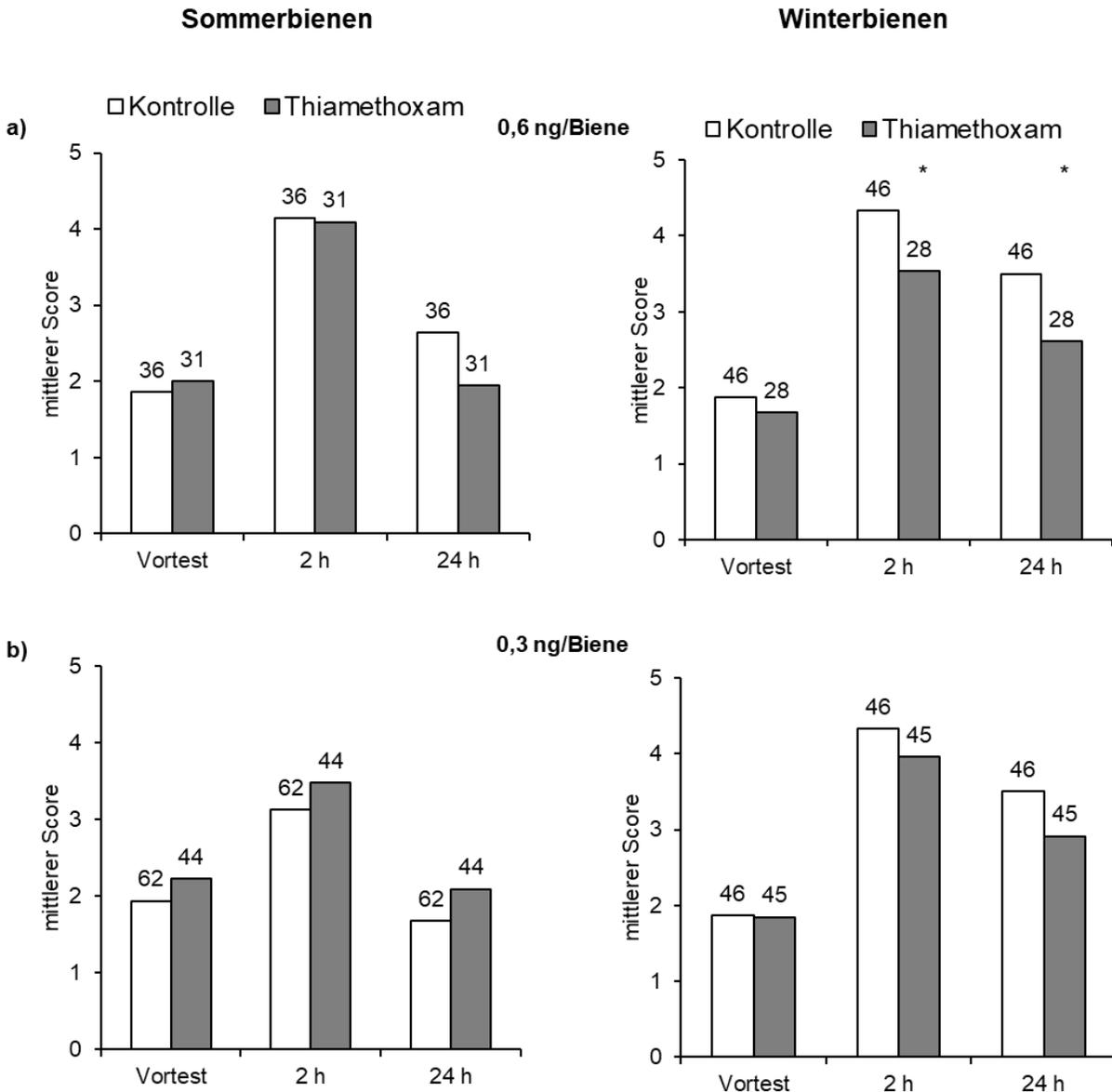


Abbildung 8: Test auf Zuckerwasserempfindlichkeit nach Behandlung mit 0,6 ng/Biene und 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Dargestellt ist der mittlere Score vor, 2 h und 24 h nach der Behandlung mit a) 0,6 ng/Biene und b) 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. weiße Balken: Kontrollgruppe, graue Balken: mit Thiamethoxam behandelte Bienen. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken. * $p < 0,05$ Whitney-Mann-U-Test.

Betrachtet man den PER, so fällt auf, dass die in **Abbildung 8** gezeigten Unterschiede des mittleren Scores nach der Behandlung mit 0,6 ng/Biene bei den Winterbienen (**Abbildung 8 a**) daher rührten, dass die Tiere sowohl 2 h als auch 24 h nach der Behandlung weniger stark auf niedrig konzentrierte Saccharoselösungen und Wasser reagierten. Bei der höchsten Konzentration (1 M) reagierten unbehandelte und

3. Ergebnisse

behandelte Tiere gleich stark. Bei den Sommerbienen zeigte sich hier ein marginaler Unterschied. 24 h nach der Behandlung mit 0,6 ng/Biene reagierten die behandelten Tiere weniger stark auf alle Saccharose Konzentrationen, zeigten aber keinen Unterschied in der Reaktion auf Wasser.

3. Ergebnisse

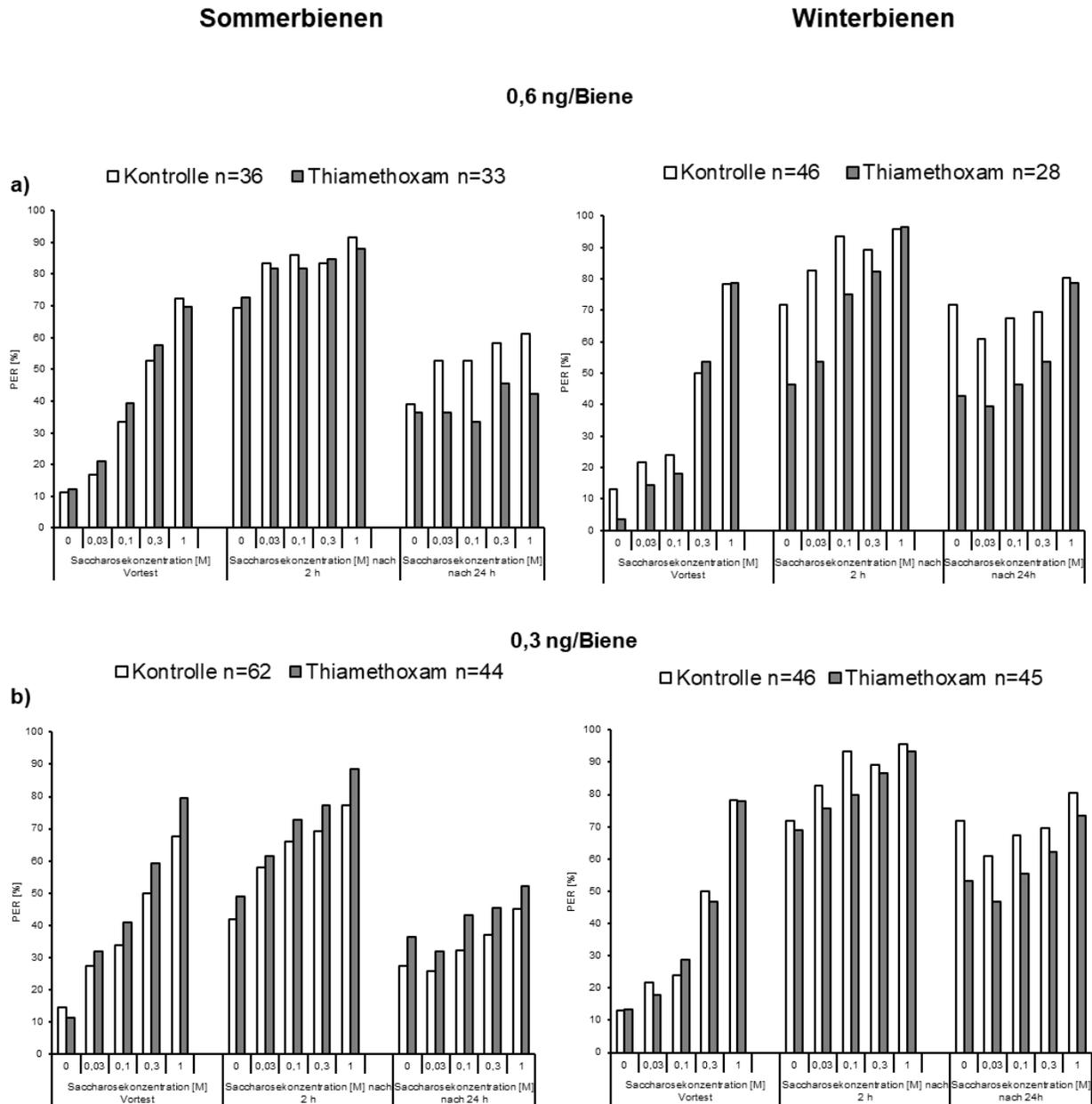


Abbildung 9: Test auf Zuckerwasserempfindlichkeit nach Behandlung mit 0,6 ng/Biene und 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Dargestellt ist der PER (Proboscis Extension Response) in Prozent vor, 2 h und 24 h nach der Behandlung mit a) 0,6 ng/Biene und b) 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. weiße Balken: Kontrollgruppe, graue Balken: mit Thiamethoxam behandelte Bienen. Die Anzahl der getesteten Tiere ist der Legende zu entnehmen.

Die Vorversuche zeigten, dass Thiamethoxam einen nachweisbaren Effekt auf die Sensorik von Saccharose hat. Nach der Behandlung mit Thiamethoxam zeigten die

Tiere eine geringere Empfindlichkeit auf Saccharose. Obwohl Zuckerwahrnehmung ein immens wichtiger Faktor bei der Wahl der Futterquelle ist, ist bisher wenig über die molekularen Komponenten bekannt. 1932 fand Minnich heraus, dass die Rezeptoren für verschiedene Zucker, welche einen PER zur Folge haben in den Antennen und den Vorderbeinen zu finden sind. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass die Chemorezeptoren empfindlicher auf Saccharose reagieren, im Vergleich zu Glucose und Fructose (Whitehead et al, 1976). In *Drosophila* sind acht Gene bekannt, welche für Zuckerrezeptorproteine kodieren, wohingegen in der Biene gerade mal zwei solcher Gene bekannt sind (Kent und Robertson, 2009). Neben den Antennen dienen bei der Honigbiene ebenso die Mundwerkzeuge und die Vorderbeine als chemosensorische Organe (Sanchez et al., 2007).

Da in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen subletaler Dosen Thiamethoxam, also Dosen, die keine Auswirkungen auf die gustatorische Empfindlichkeit haben, auf den Glucosemetabolismus der Biene untersucht werden soll, wurde für alle weiteren Experimente eine Dosis von 0,3 ng Thiamethoxam pro Biene verwendet.

3.2 Thiamethoxam verändert das Fraßverhalten der Winterbienen

Da sich in den Vorversuchen ein Effekt von Thiamethoxam auf die Antwort auf Zuckerwasser zeigte und ähnliche Auswirkungen auch schon in anderen Studien belegt werden konnte (zum Beispiel: Aliouane et al., 2008; Hassani et al., 2008; Eiri et al., 2012; Démares et al., 2016), sollte im Folgenden der Einfluss von Thiamethoxam auf den Konsum von Zucker untersucht werden. Hierfür wurden Käfigversuche durchgeführt. Hier konnten die Bienen, im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten, die Futtermenge selbst bestimmen. Diese Experimente unterschieden sich zudem in der Art der Stimulation: während in den Vorversuchen lediglich die Antennen sensorisch stimuliert wurden, wurde in den Käfigexperimenten die natürliche Futtersuche weitestgehend simuliert. Hier konnten die Bienen zusätzlich zu den Antennen die Mundwerkzeuge, Vorderfüße und den Rüssel für die Futterwahl nutzen. Für diese Experimente wurden die Bienen zunächst einzeln mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam gefüttert und anschließend für 72 h in Käfigen gehalten. Dabei erfolgte die Behandlung mit Thiamethoxam einmal und direkt vor der Käfighaltung. Über den gesamten Zeitraum

wurde ihnen Zuckerwasser zur freien Verfügung gestellt. Dabei wurde einmal täglich die konsumierte Menge an Zuckerwasser gemessen und neues Futter dargereicht. Vergleicht man den Verlauf der konsumierten Menge an Zucker zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten, so zeigt sich bei den Sommerbienen weder in der Kontrollgruppe noch in der Behandlungsgruppe ein Unterschied: die Bienen fraßen jeden Tag in etwa dieselbe Menge Zuckerwasser. Bei den Winterbienen fällt auf, dass die behandelten Bienen an Tag 2 des Experimentes signifikant weniger fraßen, als in den ersten und den letzten 24 h. Bei den mit DMSO behandelten Bienen dagegen veränderte sich die Fraßmenge zu keinem Zeitpunkt (**Abbildung 10 a**). Vergleicht man den gesamten Zuckerwasserkonsum über 72 h, so zeigte sich weder im Sommer noch im Winter ein Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung (**Abbildung 10 b**). Ähnlich wie in den vorherigen Experimenten konnte auch hier gezeigt werden, dass Sommer- und Winterbienen unterschiedlich auf die Behandlung reagieren.

3. Ergebnisse

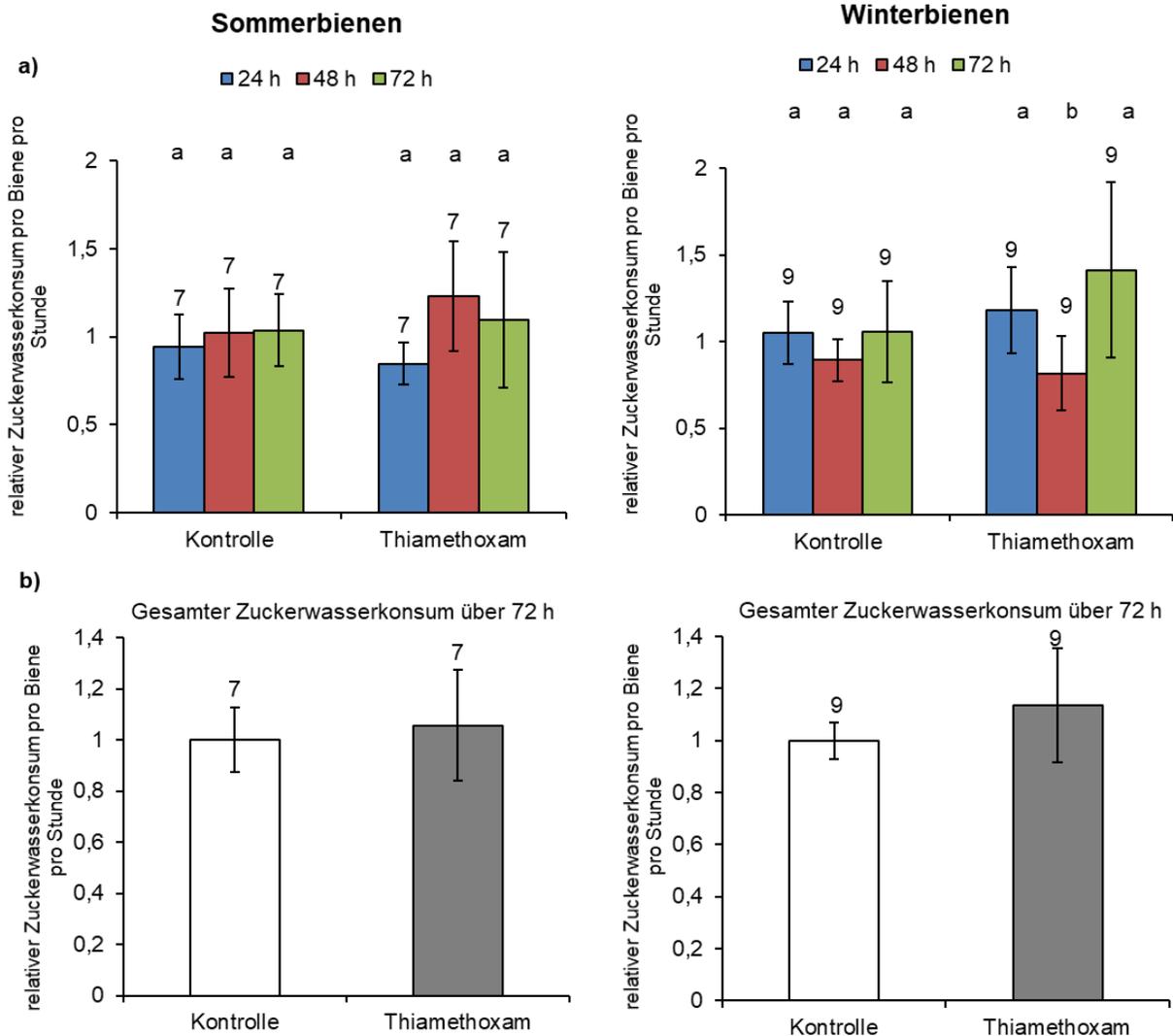


Abbildung 10: Relativer Zuckerkonsum pro Biene pro Stunde \pm Standardabweichung; a): In den Zeitfenstern 0-24 h (blaue Balken), 24-48 h (rote Balken) und 48-72 h (grüne Balken) nach Behandlung mit 0,0045 % DMSO / 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant; $p < 0,0016$, korrigiert nach Bonferroni. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Futtermenge der einzelnen Tage auf die Futtermenge normiert, die über 72 h konsumiert wurde. b): relativer Zuckerkonsum pro Biene pro Stunde \pm Standardabweichung über 72 h; weiße Balken: Kontrollgruppe, graue Balken: mit Thiamethoxam behandelte Bienen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde hier auf die Kontrollgruppe normiert. Die Anzahl der durchgeführten Experimente steht über den Balken.

3.3 Messung der Hämolymp-*Glucose*

Bei den Käfigversuchen hat sich gezeigt, dass Thiamethoxam das Fraßverhalten der Biene beeinflusst. Die Winterbienen konsumierten am zweiten Tag nach der Behandlung weniger Saccharose im Vergleich zu den anderen Versuchstagen. Ebenso

reagierten die Tiere weniger stark auf Saccharose-Lösungen geringerer Konzentrationen. Bekanntermaßen ist Saccharose ein Disaccharid, aufgebaut aus je einem Molekül Fructose und Glucose, welches im Zuge der Verdauung gespalten wird. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Dissertation die Glucoseverwertung untersucht. Rether konnte 2012 zeigen, dass die Hämolymp-*Glucose* mit dem PER negativ korreliert ist. Demnach zeigten Tiere mit einem geringeren Hämolymp-*Glucose* Spiegel eine höhere Reaktionsbereitschaft auf die sensorische Stimulation der Antennen. Dementsprechend erscheint es wahrscheinlich, dass Thiamethoxam nicht nur das Verhalten verändert, sondern auch einen Effekt auf den Hämolymp-*Glucose* Spiegel hat. Um die Effekte von Thiamethoxam auf den Hämolymp-*Glucose* Spiegel der Biene zu untersuchen, wurde die Hämolymp-*Glucose* mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Blutzuckermessgeräts gemessen. Hierbei wurde auf ein kommerziell erhältliches Blutzuckermessgerät zurückgegriffen. Dieses misst den *Glucose* Gehalt selbst in kleinsten Volumina mittels einer *Glucose*-Oxidationsreaktion. Diese Methode wurde bereits 2012 in der Arbeitsgruppe etabliert (Rether, 2012). Hierfür wurden die Tiere zunächst vor der Behandlung gemessen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Thiamethoxam und eine erneute Messung entweder 3 h oder 24 h nach der Behandlung.

3.3.1 Thiamethoxam verändert den Hämolymp-*Glucose* Spiegel bei den Sommerbienen

Der Hämolymp-*Glucose* Spiegel der Kontrollgruppe und der behandelten Bienen war vor der Fütterung gleich. Nach 3 h zeigte sich, dass der *Glucose*-Spiegel bei der Kontrollgruppe anstieg, während er bei den behandelten Bienen sank (**Abbildung 11 a**). Nach 24 h kann dieser Unterschied nicht mehr gezeigt werden (**Abbildung. 11 b**). Dieser Effekt ist bei den Winterbienen nicht zu beobachten. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Heterogenität des *Glucose*-Spiegels im Winter deutlich größer war, als im Sommer. Bei den Winterbienen stieg der *Glucose*-Spiegel nach der Fütterung stärker an, als bei den Sommerbienen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Thiamethoxam unterschiedlich auf den *Glucose* Spiegel von Sommer- und Winterbienen wirkt. Zudem zeigt sich zwischen Sommer- und Winterbienen ein Unterschied. Da 24 h nach der Behandlung weder im

3. Ergebnisse

Sommer noch im Winter Effekte gezeigt werden konnten, wurde dieser Zeitpunkt im Folgenden nicht weiter gemessen. Bisher konnte gezeigt werden, dass Thiamethoxam die gustatorische Wahrnehmung von Saccharose verändert. Dies bezieht sich sowohl auf die Sensorik der Antennen als auch auf das Fraßverhalten. Daneben wurde gezeigt, dass Thiamethoxam den Hämolymp-Glucosespiegel beeinträchtigt. In jedem Fall zeigte sich ein Unterschied zwischen Sommer- und Winterbienen. Während Thiamethoxam die Sensorik und das Fraßverhalten der Winterbienen beeinflusste, zeigte es bei diesen Tieren keinen Effekt auf den Hämolymp-Glucosespiegel. Bei den Sommerbienen stellte es sich genau umgekehrt dar: hier zeigte sich kein Effekt auf die Sensorik und das Fraßverhalten, jedoch war der Hämolymp-Glucosespiegel beeinträchtigt.

3. Ergebnisse

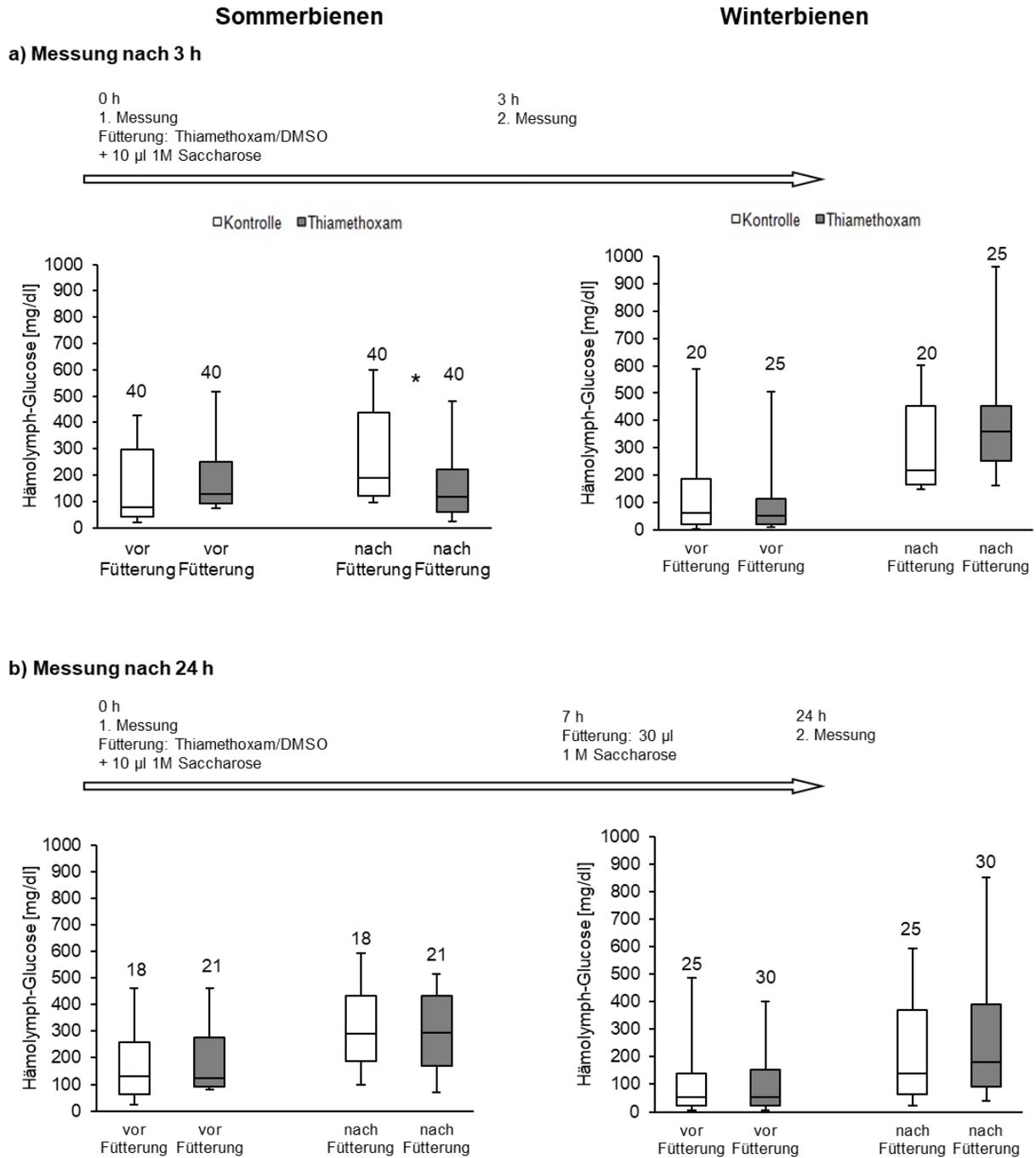


Abbildung 11: Veränderung des Hämolymp-Glucosespiegels 3 h und 24 h nach der Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. grauer Balken: Behandlung mit Thiamethoxam; weißer Balken: Kontrollgruppe. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken; *: $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test.

3.3.2 Messung der Hämolymphe-Glucose Dynamik mittels 2-NBDG

Die durch Thiamethoxam induzierte Veränderung des Hämolymphe-Glucosespiegels kann auf zwei Wege erklärt werden: entweder die Tiere setzen die aus der Nahrung gewonnene Glucose schneller um (eventuell herrscht hier ein höherer Energiebedarf durch die Entgiftung) oder Thiamethoxam verhindert vorübergehend die Verdauung und Resorption der Saccharose. In beiden Fällen stieg der Hämolymphe-Glucosespiegel trotz Fütterung nicht an. Um heraus zu finden, ob Thiamethoxam die Spaltung von Saccharose beeinflusst, wurde mit dem fluoreszierenden Glucosederivat 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG) gearbeitet. 2-NBDG wird erfolgreich in Zellkultur angewendet, um den Glucoseverbrauch einzelner Zellen zu ermitteln. Da es aber bisher noch nicht *in vivo* in der Biene angewendet wurde, musste zunächst eine adäquate Messmethode etabliert werden. Hierfür musste zunächst geklärt werden, ob dieses Glucosederivat auf die gleiche Weise vom Verdauungstrakt in die Hämolymphe abgegeben wird, wie Glucose selbst. Hierfür wurden sowohl Winterbienen als auch Sommerbienen mit 2-NBDG gefüttert. Anschließend wurde nach 30 min, 60 min und nach 3 h Hämolymphe entnommen und die Fluoreszenz gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass 2-NBDG nach der oralen Gabe in der Hämolymphe nachweisbar ist. **Abbildung 12** zeigt, dass 30 min nach der Fütterung das Fluoreszenzsignal signifikant größer war, wenn die Bienen mit 2-NBDG behandelt wurden. Die Messungen zeigen, dass 2-NBDG von der Biene aufgenommen und vom Mitteldarm in die Hämolymphe transportiert werden kann.

3. Ergebnisse

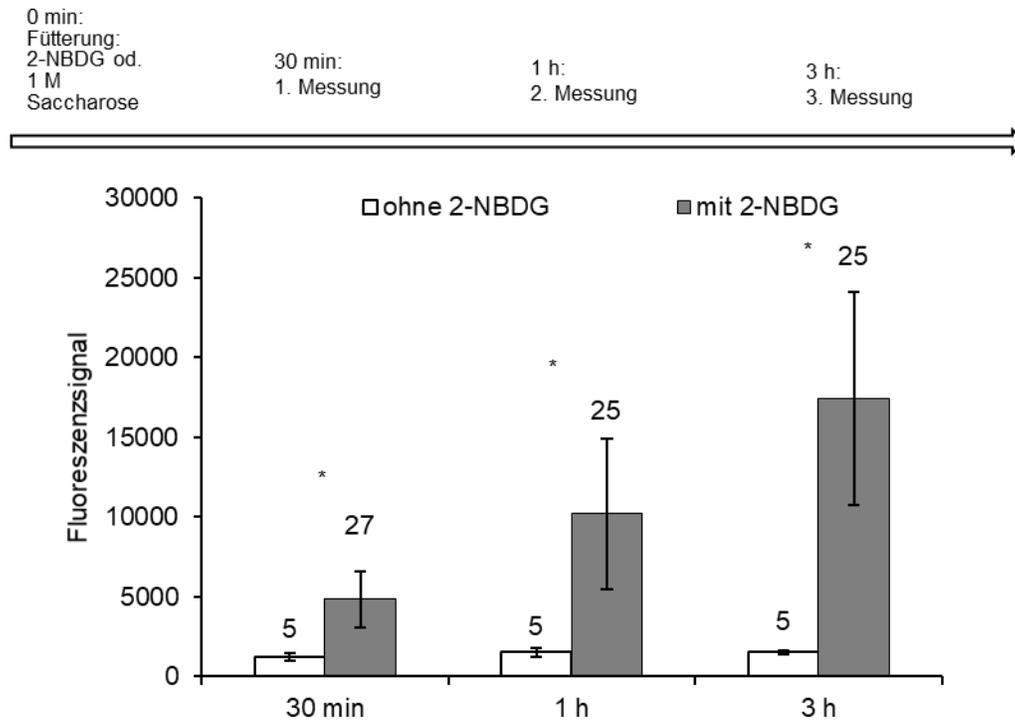


Abbildung 12: 2-NBDG Messung in der Hämolymphe 30 min, 60 min und 180 min nach der Behandlung mit 2-NBDG. grauer Balken: Behandlung mit 2-NBDG; weißer Balken: Kontrollgruppe. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken.

3.3.2.1 Thiamethoxam verändert 2-NBDG-Konzentration in der Hämolymphe der Sommerbienen

Bei den vorherigen Experimenten zeigte sich, dass Thiamethoxam sowohl das Fraßverhalten der Biene als auch den Hämolymphe-Glucosespiegel negativ beeinflusst: die Tiere fraßen weniger Zuckerwasser und der Glucosespiegel sank schneller ab, als bei unbehandelten Tieren. Es sollte nun herausgefunden werden, ob Thiamethoxam die Verdauung von Saccharose beeinträchtigt. Von der Hypothese ausgehend, dass Thiamethoxam die hydrolytische Spaltung von Saccharose in Fructose und Glucose verhindert, wäre bei der Fütterung von Glucose bzw. einem Glucosederivat keine Veränderung des Hämolymphe-Glucosespiegels sichtbar. Hierfür wurde das fluoreszierende Glucosederivat 2-NBDG verwendet. Bei den Sommerbienen zeigten sich 30 min nach der Behandlung mit Thiamethoxam keine Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe (**Abbildung 13**). Nach 3h zeigte sich, dass signifikant weniger 2-NBDG in der Kontrollgruppe detektiert werden konnte, als in der

3. Ergebnisse

Behandlungsgruppe. Bei den Tieren aus dem Winter konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Ähnlich der Messungen mit dem Blutzuckermessgerät, konnte auch hier beobachtet werden, dass das Signal 3 h nach der Fütterung bei den Winterbienen stärker anstieg, als bei den Sommerbienen. Auch hier bestätigt sich, dass Winter- und Sommerbienen unterschiedlich auf die Behandlung mit Thiamethoxam reagieren und dass es saisonale Unterschiede innerhalb der Kontrollgruppen gibt. Mit Hilfe dieses Experiments konnten zum einen die Ergebnisse der Glucosemessungen mittels Blutzuckermessgerät bestätigt werden, zum anderen konnte erstmals gezeigt werden, dass 2-NBDG in der Biene wie bei Säugetieren als Marker (ähnlich zu Glucose) verwendet werden kann.

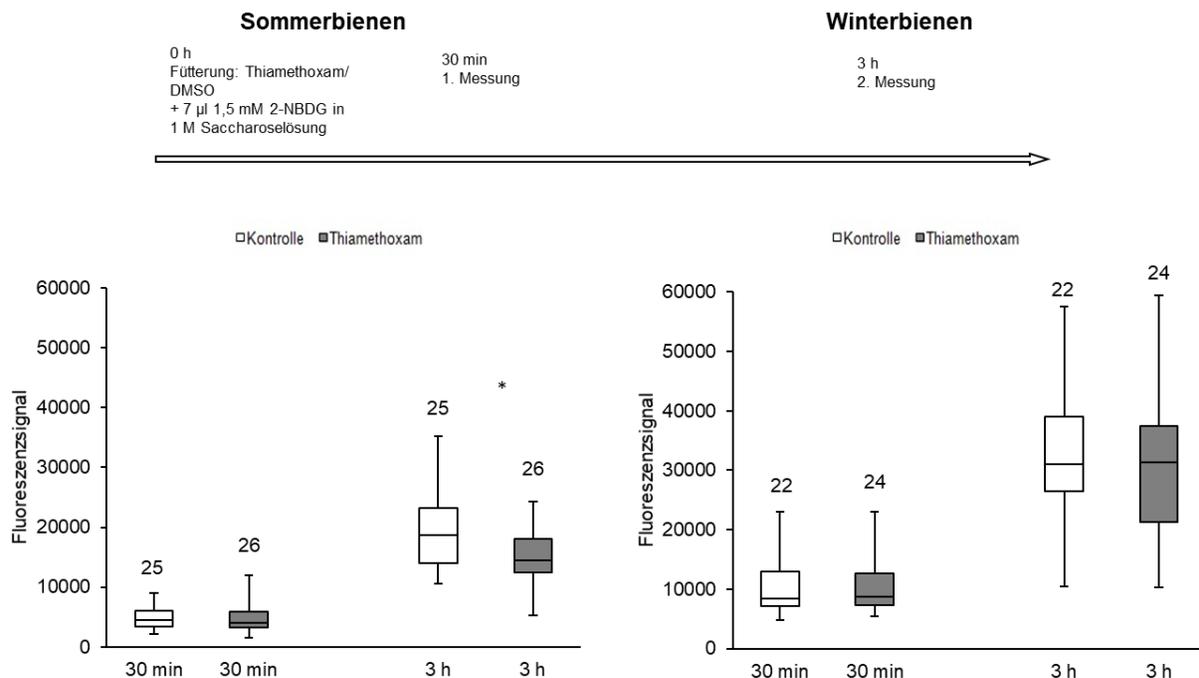


Abbildung 13: 2-NBDG Messung in der Hämolymphe 30 min und 180 min nach der Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. grauer Balken: Behandlung mit Thiamethoxam; weißer Balken: Kontrollgruppe. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken. *: $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test.

3.4. Thiamethoxam hat keinen Einfluss auf die Funktion des Proventriculus bei den Winterbienen

Der niedrigere Glucosespiegel 3 h nach der Thiamethoxam Behandlung könnte damit erklärt werden, dass das Entgiftungssystem der Tiere angeregt wird und im Zuge dessen der Glucoseverbrauch steigt. Demnach würde die aufgenommene Glucose direkt verbrannt und wäre nicht mehr in der Hämolymphe messbar. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die Glucose aufgrund von Störungen in der Verdauung bzw. Resorption nicht vom Verdauungstrakt in die Lymphe geleitet wird. Auch hier wäre die Glucose in der Hämolymphe nicht zu finden.

Nach der Nahrungsaufnahme gelangt der Nahrungsbrei zunächst in den Kropf. Da der Kropf nur als Speicherorgan dient und hier keine Resorption von Nährstoffen stattfindet, muss die Nahrung in den Mitteldarm weiter transportiert werden. Dieser Vorgang geschieht aktiv, mittels Kontraktionen eines Schließmuskels, der Proventriculus. So könnte es sein, dass der Proventriculus durch die Behandlung mit Thiamethoxam beeinträchtigt wird und die aufgenommene Nahrung nicht oder nur sehr langsam vom Kropf in den Mitteldarm transportiert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde abermals eine Messung mit Hilfe von 2-NBDG durchgeführt. Hierfür wurde den Bienen 2-NBDG gefüttert und entweder nach 30 min oder nach 180 min sowohl Kropf als auch Mitteldarm entnommen. Anschließend wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop das Verhältnis des Fluoreszenzsignals vom Mitteldarm zu Kropf gemessen. Von der Hypothese ausgehend, dass Thiamethoxam den Proventriculus beeinträchtigt, wäre zu erwarten, dass 2-NBDG nicht vom Kropf in den Mitteldarm transportiert wird und demnach das Fluoreszenzsignal des Kropfes deutlich größer ist, als dasjenige des Mitteldarms (**Abbildung 14**).

3. Ergebnisse

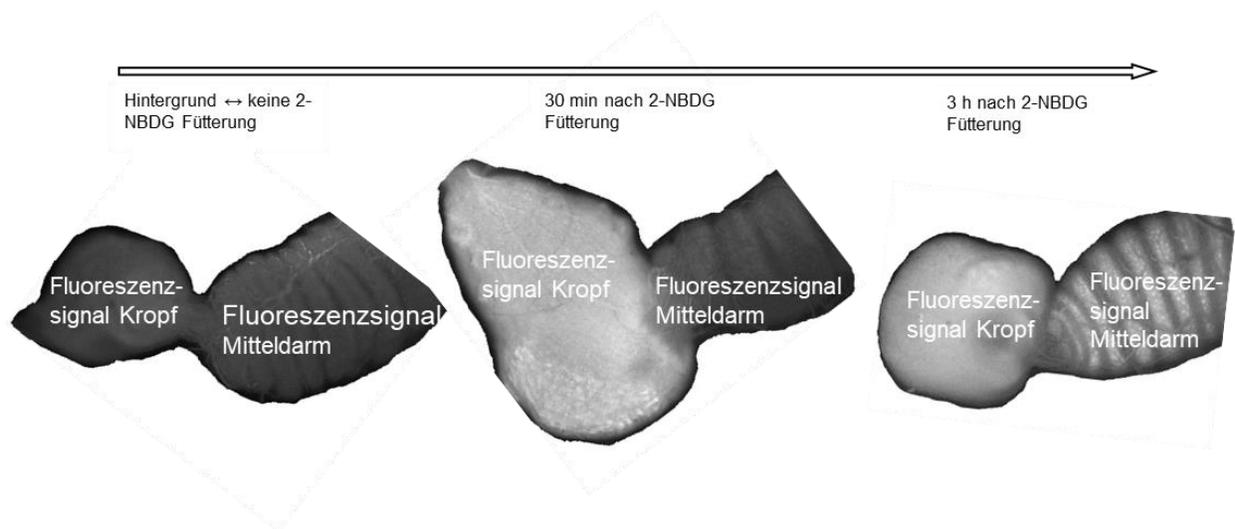


Abbildung 14: Kropf und Mitteldarm der Arbeiterin ohne vorherige Fütterung mit 2-NBDG, 30 min und 3 h nach der Fütterung mit 2-NBDG. Um die Wirkung von Thiamethoxam auf die Funktionalität des Schließmuskels zwischen Kropf und Mitteldarm (Proventriculus; nicht zu sehen) zu untersuchen, wurde nach der Fütterung mit 2-NBDG sowohl das Fluoreszenzsignal des Kropfes als auch dasjenige des Mitteldarms gemessen und dividiert (Mitteldarm/Kropf = Übergangsrate).

Um diese Methode zu etablieren wurde zunächst die Autofluoreszenz von Kropf und Mitteldarm gemessen (**Tabelle 2**; Hintergrund). Hierfür wurde der Verdauungstrakt unbehandelter Tiere präpariert und die Fluoreszenz von Mitteldarm und Kropf unter dem Fluoreszenzmikroskop gemessen. Diese Signale werden im Folgenden als Hintergrundsignal bezeichnet. Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob 2-NBDG in Kropf und Mitteldarm detektiert werden kann. Hierfür wurden die Tiere mit 2-NBDG gefüttert und anschließend wurden entweder nach 30 min oder nach 3 h Mitteldarm und Kropf präpariert und das Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop gemessen. Wie **Tabelle 2** zu entnehmen stieg das Fluoreszenzsignal nach Fütterung mit 2-NBDG im Verhältnis zum Hintergrundsignal signifikant an. 30 min nach der Fütterung konnte bei den Sommerbienen im Kropf ein 72-mal größeres Signal und im Mitteldarm ein 45-mal größeres Signal detektiert werden. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlung mit Thiamethoxam. 3 h nach der Fütterung mit 2-NBDG stieg das Signal im Kropf um das 28-fache und im Mitteldarm um das 27-fache an. Auch hier gab es zwischen mit Thiamethoxam behandelten und unbehandelten Tieren keinen Unterschied. Bei den Winterbienen wurde 30 min nach der Fütterung mit 2-NBDG im Kropf ein Anstieg des Signals um das 55-fache und im Mitteldarm um das

3. Ergebnisse

24-fache gemessen. Auch hier gab es keinen Unterschied zwischen Kontrollgruppe und mit Thiamethoxam behandelten Tieren. Auffällig war, dass das Signal nach 3 h im Kropf keinen signifikanten Anstieg im Vergleich zum Hintergrundsignal aufwies. Dies galt sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die mit Thiamethoxam behandelte Gruppe. Demnach unterscheidet sich die Entleerungsrate des Kropfes der Winterbienen von der der Sommerbienen. Dieses Ergebnis fügt sich mit den Ergebnissen der Lymph-Glucose-Messungen zusammen. Das Signal des Mitteldarms stieg 3 h nach der Fütterung mit 2-NBDG um das 25-fache an. Hier gab es keinen Unterschied zwischen Kontrollgruppe und mit Thiamethoxam behandelten Tieren.

Tabelle 2: Fluoreszenzsignal des Verdauungstraktes (Kropf und Mitteldarm). Die Messungen erfolgten ohne vorherige Fütterung mit 2-NBDG (Hintergrund) und nach der Fütterung mit 2-NBDG. Verglichen wurden sowohl Kontrolltiere und mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam behandelte Tiere, 30 min und 3 h nach der Behandlung. Es wurden sowohl Sommer- als auch Winterbienen gemessen. Hellgrau hinterlegte Experimente unterschieden sich nicht vom Hintergrund ($p > 0,00625$, T-Test, nach Bonferroni korrigiert).

Hintergrund	Kropf	$3,62 \cdot 10^5 \pm 4,90 \cdot 10^4$			
	Mitteldarm	$4,90 \cdot 10^5 \pm 1,57 \cdot 10^5$			
Fütterung mit 2-NBDG		Kontrolle		0,3 ng /Biene Thiamethoxam	
		30 min	3 h	30 min	3 h
Sommerbienen	Kropf	$2,54 \cdot 10^6 \pm 2,61 \cdot 10^5$	$1,04 \cdot 10^6 \pm 4,95 \cdot 10^5$	$2,66 \cdot 10^6 \pm 2,64 \cdot 10^5$	$1,04 \cdot 10^6 \pm 3,77 \cdot 10^5$
	Mitteldarm	$2,33 \cdot 10^6 \pm 4,57 \cdot 10^5$	$1,50 \cdot 10^6 \pm 3,06 \cdot 10^5$	$2,12 \cdot 10^6 \pm 6,52 \cdot 10^5$	$1,18 \cdot 10^6 \pm 2,58 \cdot 10^5$
Winterbienen	Kropf	$2,00 \cdot 10^6 \pm 1,19 \cdot 10^6$	$4,71 \cdot 10^5 \pm 2,94 \cdot 10^5$	$2,04 \cdot 10^6 \pm 9,22 \cdot 10^5$	$4,17 \cdot 10^5 \pm 1,90 \cdot 10^5$
	Mitteldarm	$1,26 \cdot 10^6 \pm 6,33 \cdot 10^5$	$1,37 \cdot 10^6 \pm 4,01 \cdot 10^5$	$9,54 \cdot 10^5 \pm 4,45 \cdot 10^5$	$1,05 \cdot 10^6 \pm 3,45 \cdot 10^5$

Neben dem direkten Vergleich des Signals von Kropf und Mitteldarm wurde zusätzlich die Übergangsrate berechnet. Also derjenige Wert, welcher anzeigt wie schnell das 2-NBDG vom Kropf in den Mitteldarm weitergeleitet wird. Hierfür wurde das Fluoreszenzsignal des Mitteldarms durch dasjenige des Kropfes geteilt (**Abbildung 15**). Allerdings konnte weder nach 30 min noch nach 180 min ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Bienen gezeigt werden (**Abbildung 15**;

3. Ergebnisse

Tabelle 2). Weder das Fluoreszenzsignal des Kropfes und des Mitteldarms noch die Übergangsrate Kropf zu Mitteldarm unterschieden sich. Dies gilt sowohl für Sommer- als auch für Winterbienen. Demnach arbeitet der Proventriculus trotz Inkubation mit Thiamethoxam korrekt, denn die Ergebnisse zeigen, dass 2-NBDG in jedem Fall gleich schnell vom Kropf zum Mitteldarm weiter transportiert wird. Auch hier fällt auf, dass sich die Tiere, welche im Sommer gefangen wurden, von den Tieren aus dem Winter unterscheiden. Das Verhältnis des Signals Mitteldarm zu Kropf war im Winter größer, als im Sommer (**Abbildung 15**). Dies deutet darauf hin, dass bei den Tieren im Winter die Nahrung schneller vom Kropf in den Mitteldarm transportiert wird. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der vorherigen Experimente überein.

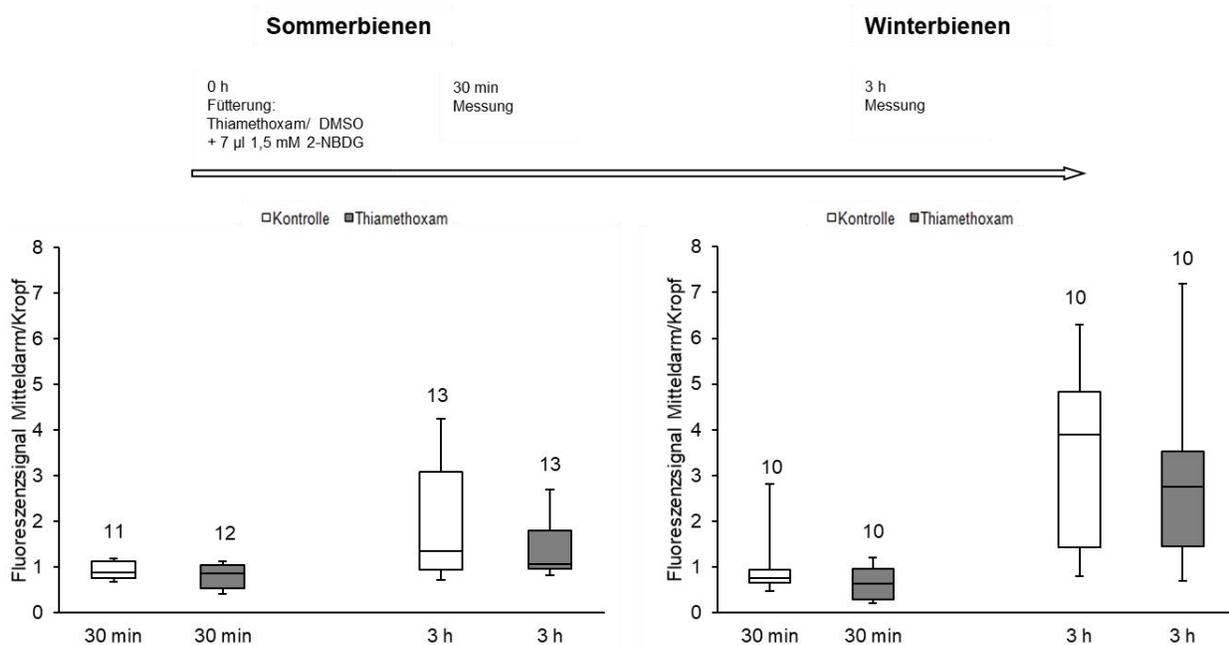


Abbildung 15: Messung der Übergangsrate (Fluoreszenzsignal Mitteldarm geteilt durch Fluoreszenzsignal Kropf) von 2-NBDG vom Kropf zum Mitteldarm mit Hilfe von 2-NBDG. Die Messung erfolgte 30 min und 180 min nach der Fütterung von 2-NBDG bzw. Kontrolllösung (weißer Balken) bzw. 2-NBDG und 0,3 ng/Biene Thiamethoxam (grauer Balken). Die Anzahl der getesteten Tiere ist den Balken zu entnehmen.

3.5 Einfluss von Thiamethoxam auf die Morphologie des Mitteldarms

Die bisherigen Messungen zeigten, dass Thiamethoxam den Hämolymphe-Glucosespiegel beeinflusst. Die Hypothese, dass der Proventriculus durch die Behandlung nicht korrekt arbeitet, konnte verworfen werden. Ein weiterer wichtiger

Schritt zur Bereitstellung von Glucose, ist die Verdauung der Nahrung im Mitteldarm und der Transport der Glucose vom Mitteldarm in die Hämolymphe. Da es bereits morphologische Untersuchungen zu den Effekten von Thiamethoxam auf das Darmepithel gibt, welche zeigen, dass dieses zerstört wird (Catae et al., 2014), wurde untersucht, ob der Mitteldarm die Glucose ungehindert in die Hämolymphe transportiert.

3.5.1 Thiamethoxam hat keinen Einfluss auf die Durchlässigkeit des Mitteldarms

Um auszuschließen, dass das veränderte Glucoselevel in der Hämolymphe durch veränderte Durchlässigkeit des Epithels zustande kommt, wurde den Bienen das fluoreszierende Glucosederivat 2-NBDG gefüttert. Anschließend wurde der Mitteldarm entnommen, an beiden Enden mit einem Haar verschlossen und in ein Well (300 µl) einer mit je 100 µl Bienen-Ringer gefüllte 96-well Platte überführt. Anschließend wurde sowohl nach 30 min als auch nach 3 h das Fluoreszenzsignal im Ringer mittels Multiplate Reader gemessen. Während der Messung wurde der Darm aus dem entsprechenden Well entnommen und in einem weiteren Well mit 100 µl Bienen-Ringer zwischengelagert. Zum Ende des Versuchs wurde der gesamte Darminhalt ausgepresst und dessen Fluoreszenzsignal ebenfalls gemessen. Zur Etablierung dieser Methoden wurde zunächst gezeigt, dass das Fluoreszenzsignal in der Lösung zu den verschiedenen Zeitpunkten signifikant größer ist, wenn die Bienen zuvor mit 2-NBDG gefüttert wurden (**Abbildung 16**). Für die Auswertung der Daten wurden die Messwerte nach 30 min und nach 3 h auf den gesamten, ausgequetschten Darminhalt nach Fütterung mit 2-NBDG bezogen.

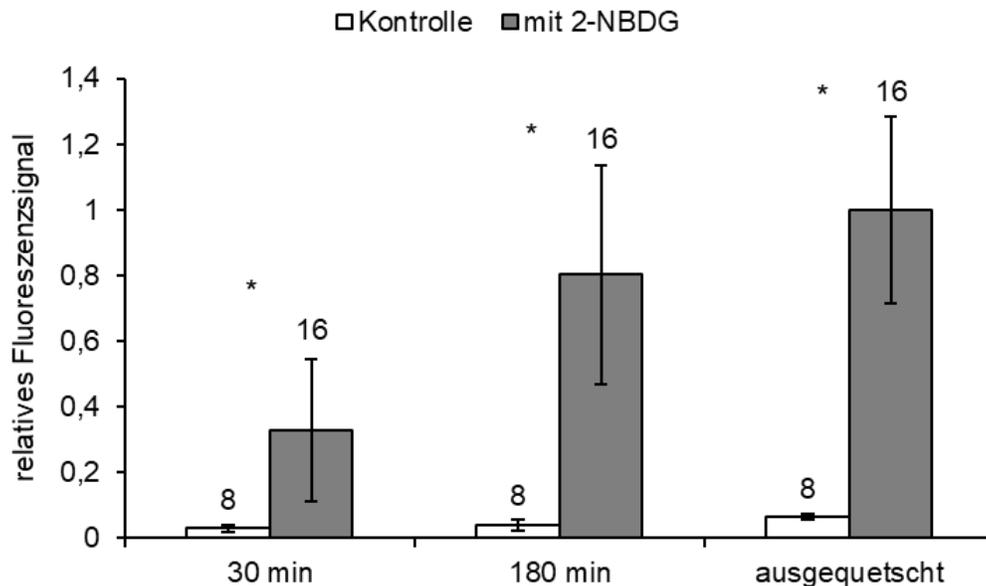


Abbildung 16: Messung der Durchlässigkeit des Mitteldarms mit Hilfe von 2-NBDG, sowohl 30 min und 180 min nach der Fütterung mit 2-NBDG (graue Balken) oder der Kontrolllösung (weiße Balken), als auch nach Ausquetschen des gesamten Darminhalts. Anzahl der Messung steht über den Balken. *: $p < 0,05$, T-Test.

Um zu überprüfen, ob Thiamethoxam das Epithel des Mitteldarms durchlässig macht, wurde ebenso nach 30 min, 3 h und der gesamte Darminhalt gemessen. Für die Auswertung der Daten wurden die Messwerte, wie in den Vorversuchen in **Abbildung 16**, nach 30 min und nach 3 h auf den gesamten, ausgequetschten Darminhalt bezogen. Die Messungen nach der Fütterung mit Thiamethoxam zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Bienen (**Abbildung 17**). Thiamethoxam hat demnach keine Auswirkung auf die Durchlässigkeit des Darmepithels. Auch hier ist zu sehen, dass das Signal bei den Winterbienen nach 3 h stärker ansteigt, als bei den Sommerbienen. Vergleicht man hier die Rohwerte so fällt auf, dass sich das Signal 3 h sowie das Signal des ausgequetschten Darminhaltes unterscheiden. Bei den Winterbienen wurde zu diesen beiden Messzeitpunkten ein signifikant höheres Signal gemessen (**Abbildung 18**). Dieses Phänomen konnte ebenso bei den Messungen mit dem Blutzuckermessgerät (Kapitel 3.3.1) und mit 2-NBDG (Kapitel 3.3.2) beobachtet werden.

3. Ergebnisse

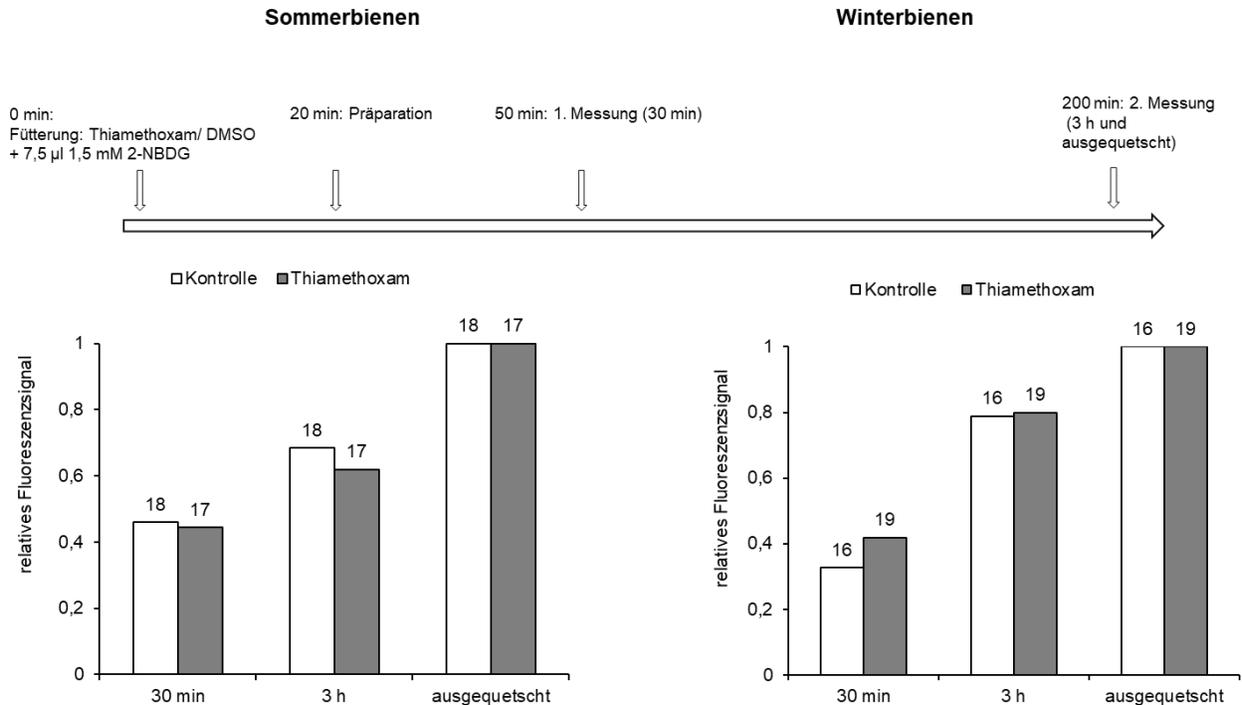


Abbildung 17: Messung der Durchlässigkeit des Mitteldarms mit Hilfe von 2-NBDG, sowohl 30 min als auch 3 h nach der Fütterung mit 2-NBDG bzw. Kontrolllösung (weiße Balken) bzw. 0,3 ng/Biene Thiamethoxam (graue Balken), als auch nach Ausquetschen des gesamten Darminhalts. Zum Vergleich wurden die Signal nach 30 min und nach 3 h auf den gesamten Darminhalt (ausgequetscht) bezogen. Anzahl der Messungen steht über den Balken.

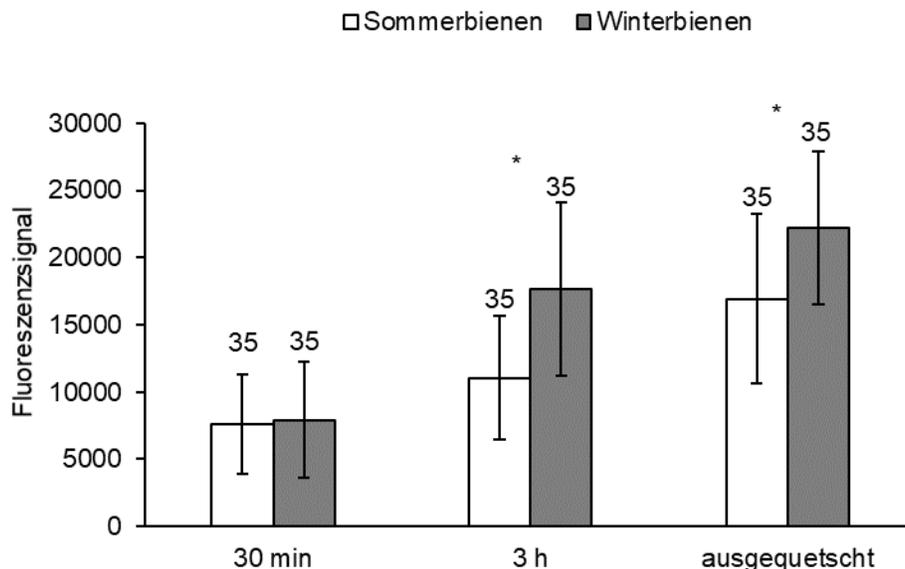


Abbildung 18: Messung der Durchlässigkeit des Mitteldarms der Sommerbienen (weißer Balken) und der Winterbienen (grauer Balken) mit Hilfe von 2-NBDG, sowohl 30 min als auch 3 h nach der Fütterung mit 2-NBDG, als auch nach Ausquetschen des gesamten Darminhalts. Anzahl der Messungen steht über den Balken. *: p < 0,05; TTest.

3.6 Untersuchung der Glucostransporter

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Thiamethoxam sowohl das Fraßverhalten als auch den Hämolymphe-Glucosespiegel beeinflusst. Da ausgeschlossen werden konnte, dass Thiamethoxam die Spaltung der Saccharose zu Glucose und Fructose behindert und es somit zum gezeigten veränderten Hämolymphe-Glucose-Spiegel kommt, wurden anschließend die Glucostransporter auf Proteinebene (mittels ELISA und Dot Blot) untersucht. Thiamethoxam könnte demnach den Transport der Glucose beeinträchtigen, indem es zum Beispiel die Menge der Glucostransporter beeinträchtigt. Die Glucose könnte in diesem Fall nicht mehr normal vom Mitteldarm in die Hämolymphe transportiert werden, was den veränderten Hämolymphe-Glucosespiegel erklären könnte. Bisher wurden noch keine Studien zur Untersuchung der Glucostransporter in der Biene veröffentlicht. Eine aus der Arbeitsgruppe stammende Promotion befasste sich 2012 erstmals mit dem Glut 1 Protein in der Biene (Rether, 2012). Dieser Glucostransporter wurde zur näheren Untersuchung herangezogen, da er dem Glut 1 aus dem Säuger am ähnlichsten ist und Glut 1 der wohl am besten untersuchte Glucostransporter im Säuger ist. Angelehnt an die Arbeit von Rether wurden die in der Biene vorkommenden Isoformen Glut 1a (Gen ID 409424) und Glut 1b (Gen ID 409933) untersucht. Sequenzanalysen zeigten, dass die Aminosäure Sequenz des Glut 1a der Biene zu 47 % mit dem GLUT 1, zu 46 % mit dem GLUT 3 und zu 44 % mit dem GLUT 14 des Menschen übereinstimmt, wohingegen der Glut 1b der Biene zu 49 % mit dem GLUT 1, 3 und 14 des Menschen übereinstimmt. Um den Einfluss von Thiamethoxam auf die Proteinmenge des Glut 1 zu untersuchen, wurden Homogenate aus Gehirn, Abdomen und Mitteldarm hergestellt.

3.6.1 Thiamethoxam beeinflusst die Proteinmenge der Glucose Transporter GLUT 1a und GLUT 1b

3 h und 24 h nach der Behandlung mit Thiamethoxam wurden separate Homogenate aus entweder Gehirn, Abdomen oder Mitteldarm hergestellt. Homogenate aus Hirn enthielten das Zentralhirn inklusive der optischen Lobe. Homogenate des Abdomens enthielt Chitinpanzer, Fettkörper und Muskeln. Hierfür wurde zunächst das Abdomen

von Thorax und Kopf abgetrennt und anschließend Kropf, Mitteldarm, Rektum und Stechapparat entfernt. Homogenate des Mitteldarms enthielten ausschließlich den Verdauungstrakt, ohne Kropf, Rektum, Malpighi-Gefäße und Stechapparat. Dies geschah sowohl mit Sommer- als auch mit Winterbienen. Um die relative Proteinmenge der Glucosetransporter zu messen wurden entweder ELISA oder Dot Blots durchgeführt. Hierfür wurden Antikörper gegen beide Isoformen GLUT 1a und GLUT 1b verwendet. Als Referenz-Proteine dienten R2 der PKA Typ2 (R1H7) (im Gehirn) und acetyliertes Tubulin (in Abdomen und Mitteldarm). In keinem Fall unterschied sich die Menge der Referenz-Proteine zwischen Kontrollgruppe und behandelter Gruppe (**Abbildung 19 a), b) und c);** **Abbildung 20 a), b) und c)**). Während die Proteinmenge des GLUT 1a im Gehirn 3 h nach der Behandlung keine Veränderung aufwies, zeigte sich eine signifikante Verringerung in der Proteinmenge von GLUT 1b im Gehirn der Sommerbienen. In den Hirnhomogenaten der Winterbienen konnte 3 h nach der Behandlung mit Thiamethoxam weder bei der Proteinmenge des GLUT 1a noch des GLUT 1b ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (**Abbildung 19 a)**). Die Messungen im Abdomen zeigten, dass die Behandlung mit Thiamethoxam nach 3 h zu keiner signifikanten Änderung der Glucosetransporter GLUT 1a und GLUT 1b führt. Dies galt sowohl für Sommer- als auch für Winterbienen (**Abbildung 19 b)**). Ebenso hat die Behandlung mit Thiamethoxam nach 3 h keinen Effekt auf die Proteinmenge der Glucosetransporter im Mitteldarm. Auch hier gibt es keinen Unterschied zwischen Tieren aus dem Sommer und Tieren aus dem Winter (**Abbildung 19 c)**).

3. Ergebnisse

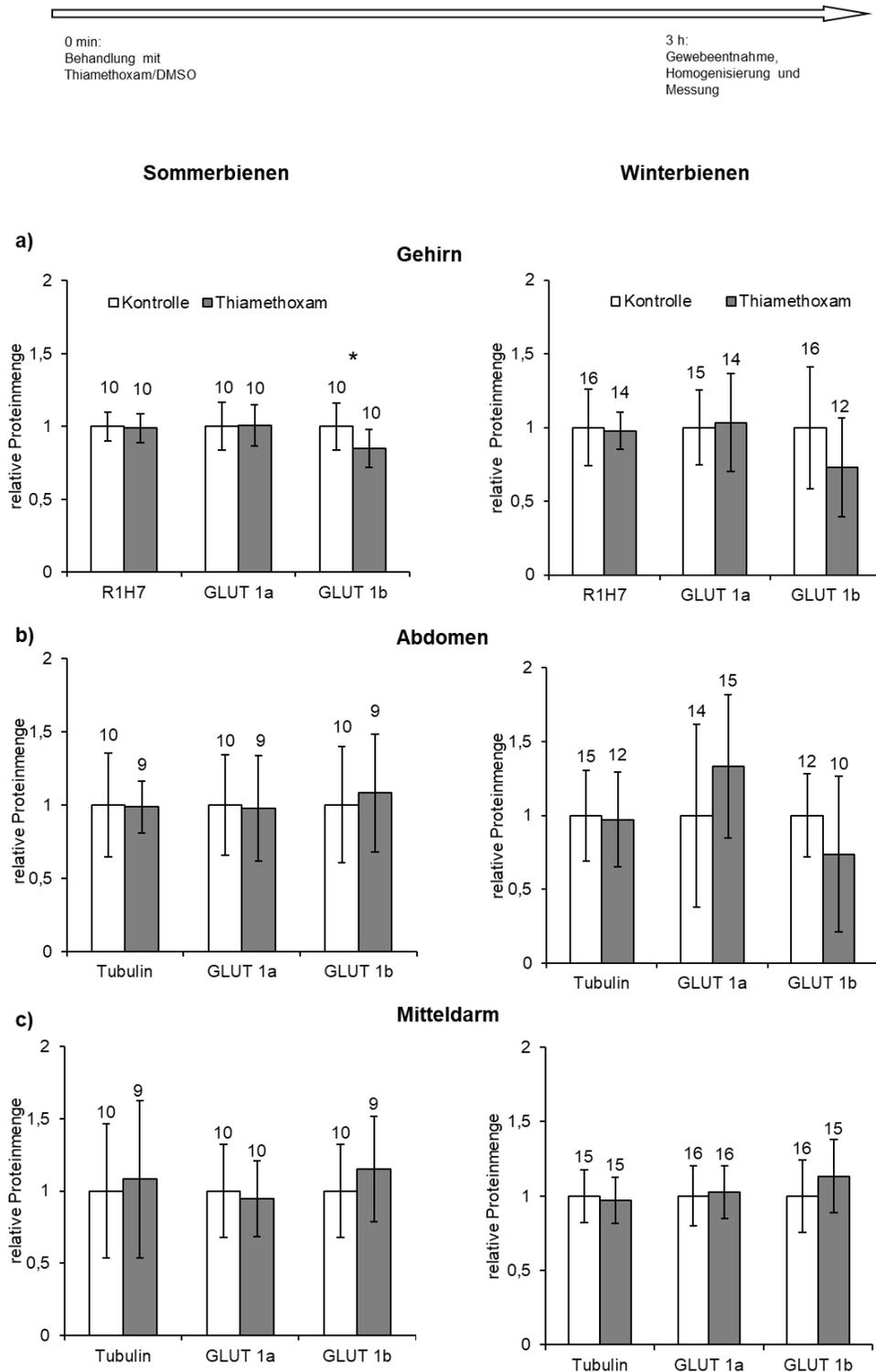


Abbildung 19: Relative Proteinmenge der beiden GLUT 1 Isoformen a und b und R1H7 bzw. des acetylierten Tubulins, gemessen 3 h nach der Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. grauer Balken: Behandlung mit Thiamethoxam; weißer Balken: Kontrollgruppe. a): Messung von Gehirnhomogenaten; b): Messung von Abdomenhomogenaten; c): Messung von Mitteldarmhomogenaten. Die Anzahl der getesteten Tiere ist Balken zu entnehmen. *: p < 0,05, TTest.

Ebenso wie bei den Messungen 3 h nach der Behandlung mit Thiamethoxam konnte auch nach 24 h in keinem Gewebe ein Unterschied bei den Referenz-Proteinen R1H7 und Tubulin festgestellt werden (**Abbildung 20 a**), **b**) und **c**). In den Gehirnhomogenaten konnte 24 h nach der Behandlung weder bei den Sommer- noch bei den Winterbienen ein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge von GLUT 1a und GLUT 1b festgestellt werden (**Abbildung 20 a**). Allerdings war 24 h nach der Behandlung mit Thiamethoxam bei den Winterbienen die Proteinmenge der Glucosetransporter GLUT 1b im Abdomen signifikant reduziert. Dieser Effekt konnte nicht bei den Sommerbienen beobachtet werden. Die Proteinmenge von GLUT 1a war weder im Sommer noch im Winter von der Behandlung beeinträchtigt (**Abbildung 20 b**). Im Mitteldarm führte die Behandlung nach 24 h im Sommer zu einer signifikanten Minderung der Proteinmenge von GLUT 1a. Im Winter konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Sowohl im Winter als auch im Sommer zeigte die Behandlung keinen Effekt auf die Proteinmenge des GLUT 1b (**Abbildung 20 c**). Ähnlich wie in den vorherigen Experimenten, zeigen sich in den Tieren aus Sommer und Winter unterschiedliche Effekte.

3. Ergebnisse

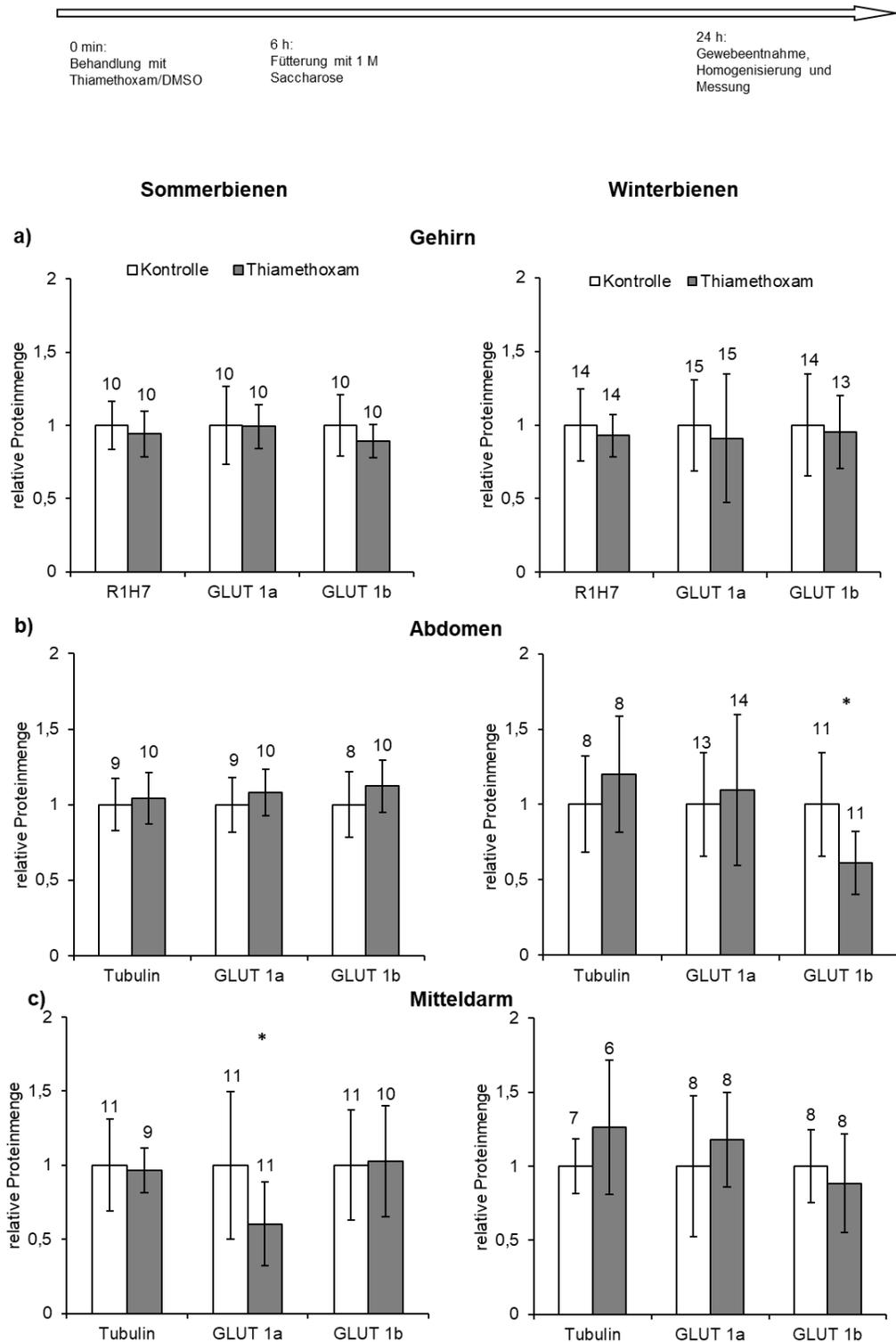
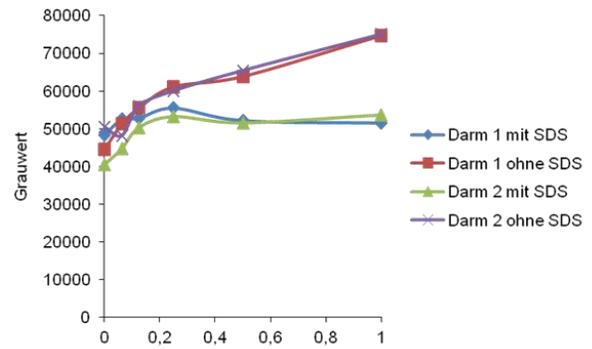
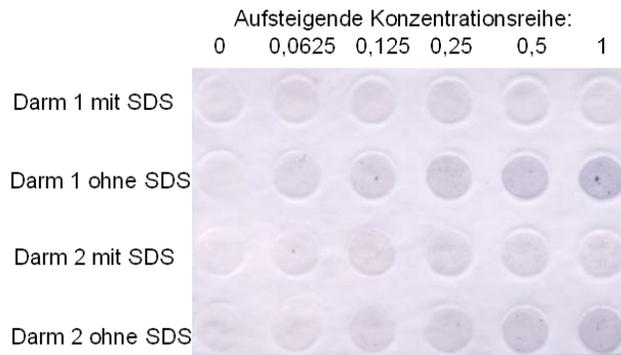


Abbildung 20: Relative Proteinmenge der beiden GLUT 1 Isoformen a und b und R1H7 bzw. des acetylierten Tubulins, gemessen 24 h nach der Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. grauer Balken: Behandlung mit Thiamethoxam; weißer Balken: Kontrollgruppe. a: Messung von Gehirnhomogenaten; b: Messung von Abdomenhomogenaten; c: Messung von Mitteldarmhomogenaten. Die Anzahl der getesteten Tiere ist Balken zu entnehmen. *: $p < 0,05$, TTest.

Die immunochemischen Untersuchungen zeigten, dass Thiamethoxam beide untersuchten Isoformen der GLUT 1 in allen untersuchten Geweben beeinträchtigt. Die Reduktion des detektierbaren Signals kann auf zwei verschiedene Arten erklärt werden. Zum einen ist es denkbar, dass Thiamethoxam zum Abbau des Proteins führt, zum anderen könnte die Behandlung mit dem Pestizid aber auch dazu führen, dass Tertiär- oder Quartärstruktur (zum Beispiel durch Interaktionen mit anderen Proteinen) verändert werden und somit das Epitop für den Antikörper nicht mehr erreichbar ist. Demnach würde sich lediglich der für den Antikörper detektierbare Anteil des Proteins vermindern, nicht aber dessen absolute Menge. Um zu überprüfen, ob das Antigen durch strukturelle Veränderung des Transporters maskiert wird, muss das Protein denaturiert werden. Klassischerweise wird hierfür mit Natriumlaurylsulfat (**S**odium **D**odecyl **S**ulfate: SDS) gearbeitet. SDS ist ein anionisches Tensid, welches nichtkovalente Bindungen beseitigt und damit sowohl Tertiär- als auch Quartärstruktur zerstört. Da denaturierte Proteine nicht mittels ELISA nachgewiesen werden können, muss hier die Dot Blot Technik zur Quantifizierung angewandt werden. Die Proben wurden undenaturiert oder mit 1 % SDS denaturiert mit Dot Blot quantifiziert. Wie in **Abbildung 21** und **22** zu sehen führte die Behandlung mit SDS dazu, dass keine bzw. weniger Färbung mehr zu erkennen war, die Signale unterschieden sich kaum von der Kontrolle ohne Probe. Dies gilt sowohl für GLUT 1a als auch für GLUT 1b und auch für die verschiedenen Gewebe (Darm und Gehirn). Ebenso konnte beobachtet werden, dass die Erhöhung der Konzentration der Proben zu keinem erhöhten Signal führt. Dies ist erkennbar an der Steigung der Grauwerte der verschiedenen Konzentrationen. Durch die Denaturierung scheint die Bindestelle des Antikörpers so verändert zu sein, dass das Protein nicht mehr nachgewiesen werden kann. Somit kann mit Hilfe dieser Antikörper nicht endgültig bewiesen werden, ob Thiamethoxam die Proteinmenge verändert, oder ob Thiamethoxam indirekt zu strukturellen Änderungen des Transporters führt. So könnte Thiamethoxam zum Beispiel den Aufbau des Proteinkomplexes beeinflussen, was wiederum zu einer Öffnung oder Schließung der Antikörper Bindestelle führen kann, wodurch dieser nicht mehr an das Protein binden kann.

3. Ergebnisse

GLUT 1a



GLUT 1b

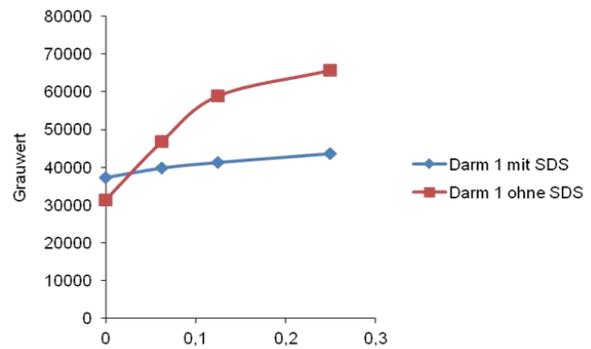
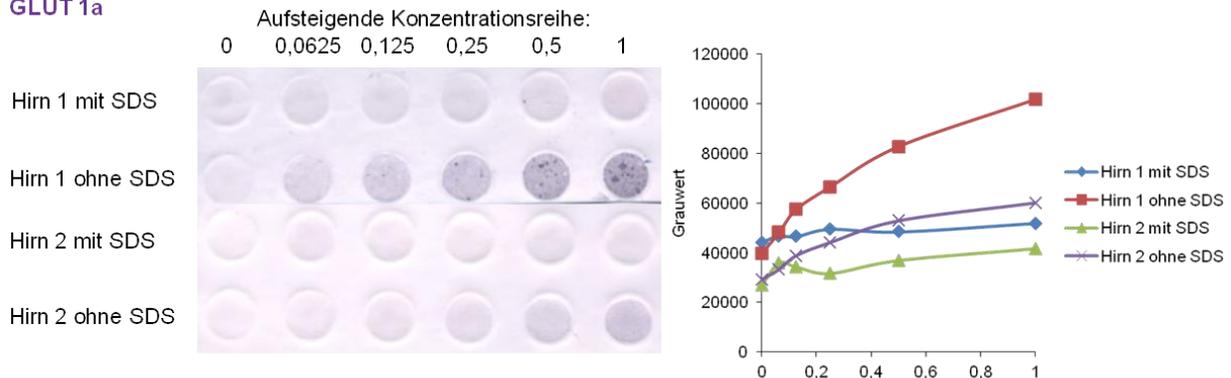


Abbildung 21: Dot Blot von homogenisiertem Darmgewebe, entweder mit SDS denaturiert oder nicht mit SDS denaturiert. Detektiert wurden die beiden Isoformen GLUT 1a und GLUT 1b. Die Graphen zeigen die zugehörigen Steigungen der Konzentrationsreihen.

3. Ergebnisse

GLUT 1a



GLUT 1b

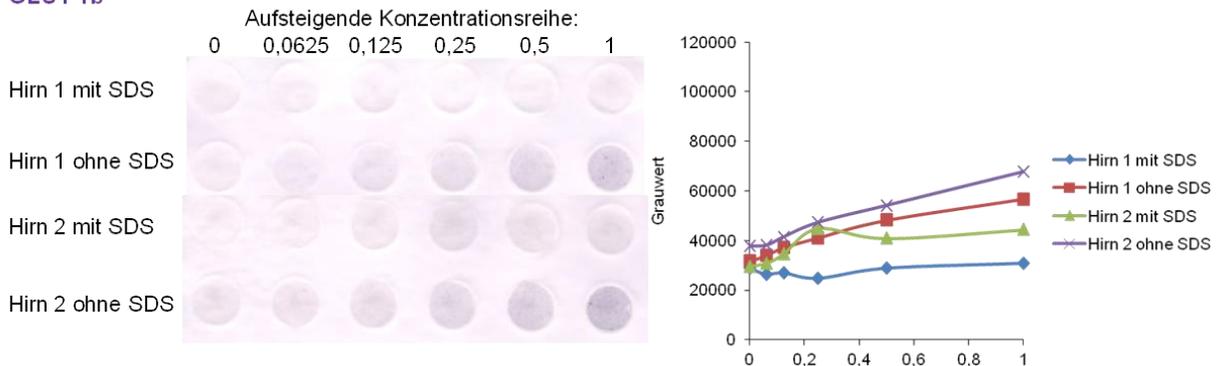


Abbildung 22: Dot Blot von homogenisiertem Hirngewebe, mit SDS denaturiert oder unverarbeitet. Detektiert wurden die beiden Isoformen GLUT 1a und GLUT 1b. Die Graphen zeigen die zugehörigen Steigungen der Konzentrationsreihen.

3.6.2 Veränderung der mRNA Menge nach Behandlung mit Thiamethoxam

Die immunochemischen Experimente zeigten, dass sich die Proteinmenge des Glucosetransporters GLUT 1 in den verschiedenen Geweben 24 h nach Behandlung mit Thiamethoxam reduziert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der hier verwendeten Antikörper nicht abschließend geklärt werden kann, ob Thiamethoxam die absolute Menge oder die Struktur des Proteins verändert. Die Reduktion der Glucosetransporter kann auch durch eine veränderte Genexpression erklärt werden. Deswegen soll im weiteren Verlauf untersucht werden, ob durch die Gabe von Thiamethoxam die Genexpression verändert wird. Um zu überprüfen, ob Thiamethoxam einen Einfluss auf die Genexpression nimmt, wurde 3 h nach der Behandlung die mRNA beider Isoformen in Gehirn, Abdomen und Mitteldarm gemessen. Der Messzeitpunkt richtete sich nach der Halbwertszeit des GLUT 1 im Säuger, diese beträgt in etwa 12 h

(Shawver et al., 1987; Sargeant et al., 1991). Demnach könnte eine geringere mRNA Menge 3 h nach der Behandlung eine geringere Proteinmenge 24 h nach der Behandlung zur Folge haben. Als Referenz Gen diente der Elongationfaktor (EF1-alpha). Die mRNA Menge des Referenz Gens unterschied sich weder in Gehirn noch in Abdomen noch in Mitteldarm zwischen Kontrollgruppe und behandelten Tieren (**Abbildung 23 a**), **b**) und **c**)). Die Messungen im Gehirn zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlung in der mRNA Menge von GLUT 1a und GLUT 1b (**Abbildung 23 a**)). Die Behandlung mit Thiamethoxam hatte ebenso keinen Effekt auf die mRNA Menge beider Glucosetransporter im Abdomen (**Abbildung 23 b**)). Lediglich im Mitteldarm konnte eine signifikante Reduktion der mRNA Menge der Isoform GLUT 1b ermittelt werden. Die mRNA Menge von GLUT 1a dagegen war auch hier unverändert (**Abbildung 23 c**)). Aufgrund der Proteinmessungen wäre zu erwarten gewesen, dass sich im Mitteldarm die mRNA Menge des GLUT 1a und im Abdomen die mRNA Menge des GLUT 1b reduziert. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich ausschließen, dass die Reduktion des Proteins nach 24 h auf eine veränderte Genexpression zurückzuführen ist.

3. Ergebnisse

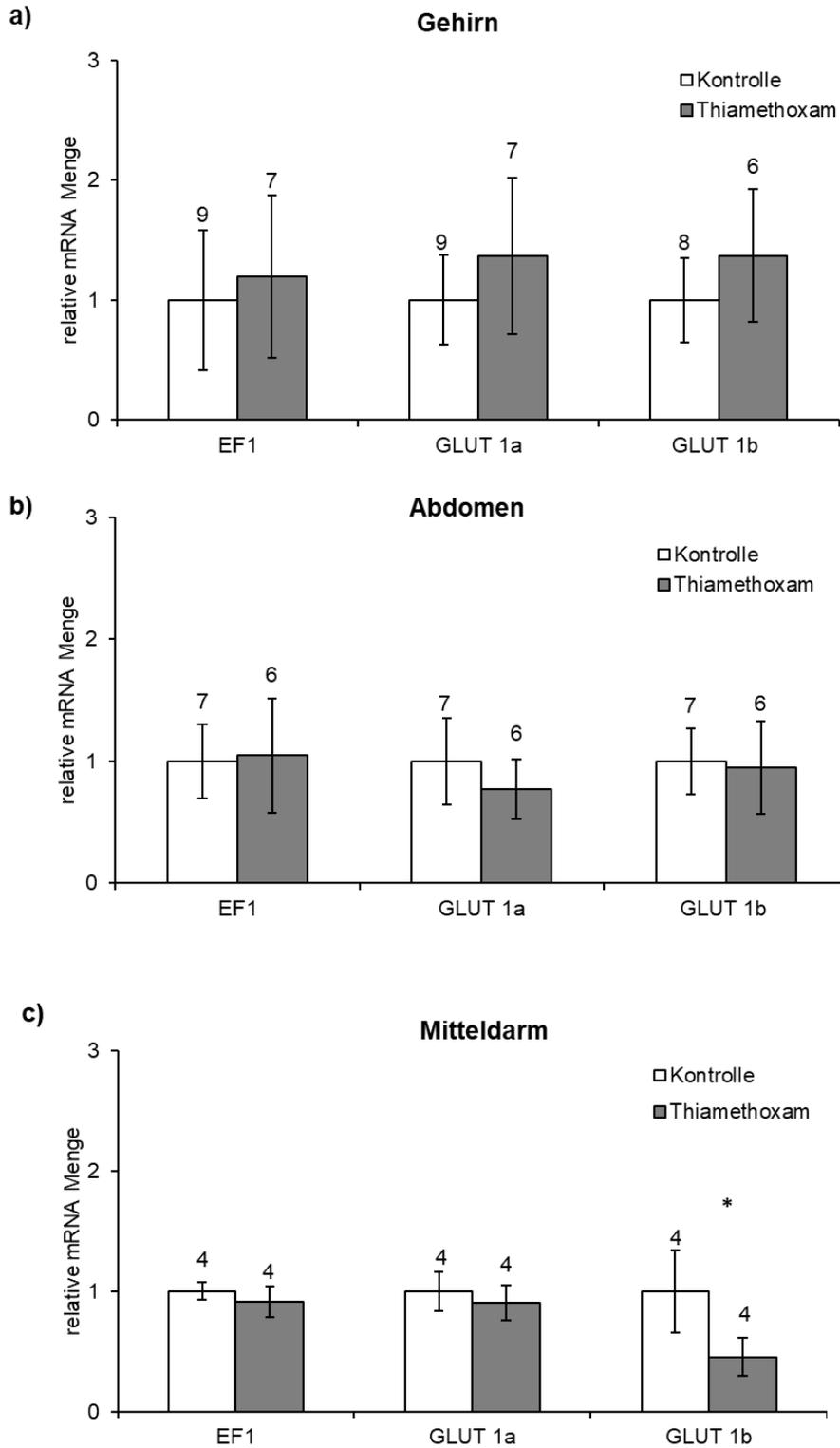


Abbildung 23: Relative mRNA Menge der beiden GLUT 1 Isoformen a und b, sowie des Elongationfaktor (EF1-alpha) 3 h nach der Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam in a) Gehirn, b) Abdomen und c) Mitteldarm. EF1-alpha diente als Referenzgen. Weiße Balken: Kontrollgruppe; Graue Balken: Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken. *: $p < 0,05$, TTest.

3.6.3 Thiamethoxam hat keinen Effekt auf die Histonmodifikationen im Mitteldarm der Biene

Die Quantifizierung der Menge der mRNA des Glucosetransporters GLUT 1b 3 h nach Behandlung zeigte, dass sich diese im Mitteldarm signifikant reduziert. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine veränderte Chromatinstruktur sein, da die Genexpression davon abhängt, ob das Chromatin kondensiert oder dekondensiert vorliegt. Die Struktur des Chromatins kann reversibel verändert werden. Histonmodifikationen können hierbei eine große Rolle spielen. Es ist bereits bekannt, dass Histonmodifikationen die Solenoidstruktur der DNA verändern können und somit zu einer vermehrten oder verminderten Genexpression führen. Zum Beispiel führen Histon-Acetylierungen dazu, dass sich die Solenoidstruktur der DNA öffnet und damit die Transkription begünstigt wird, da nun die Transkriptionsmaschinerie an die DNA binden kann. Auf der anderen Seite können Histon-Methylierungen die Transkription sowohl begünstigen als auch erschweren. Um diese Hypothesen zu überprüfen wurden die Histonmodifikationen H3 K4ac; H3 K9ac; H3 K18 me3 und H3 K27 me3 im Mitteldarm der Biene 3 h und 24 h nach der Behandlung mit Thiamethoxam mittels ELISA untersucht. Für die in dieser Dissertation untersuchten Histonmodifikationen konnte in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sie durch die Behandlung mit Neonicotinoiden beeinflusst werden (Chemla, 2016; Waché, 2016) Von den Histonmodifikationen H3 K9ac und H3 K18 me3 ist zudem bekannt, dass sie im Zusammenhang mit Verhaltensänderungen stehen. Zu keinem Zeitpunkt konnte für die getesteten Histonmodifikationen ein Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung festgestellt werden (**Abbildung 24**). Thiamethoxam beeinflusst demnach die Genexpression nicht mittels Veränderungen der Histonmodifikationen

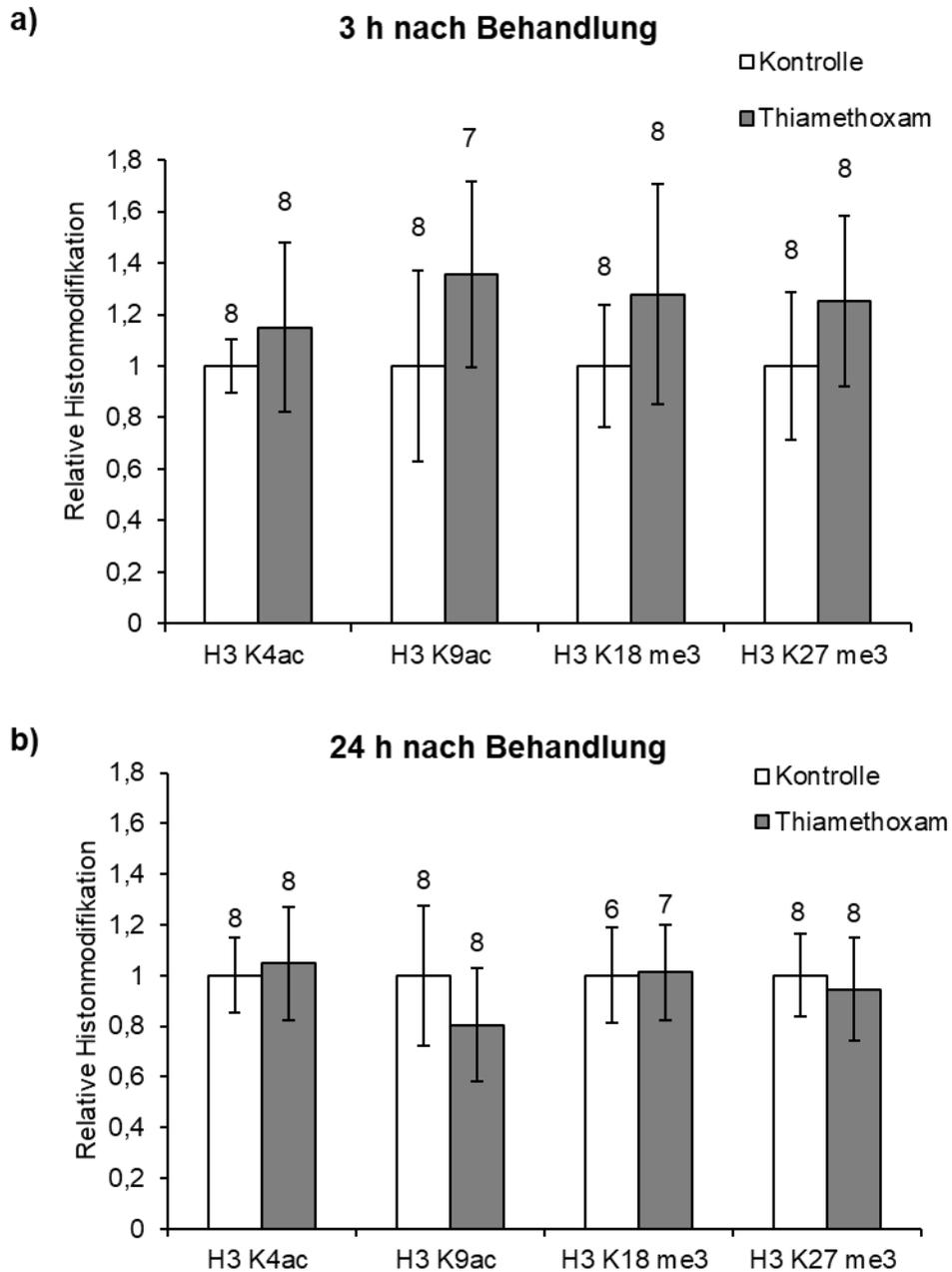


Abbildung 24: Auswirkung von Thiamethoxam auf die Histonmodifikationen H3 K4ac; H3 K9ac; H3 K18 me3 und H3 K27 me3 im Mitteldarm der Biene, a) 3 h und b) 24 h nach der Behandlung. Weiße Balken: Kontrollgruppe; Graue Balken: Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Die Anzahl der Experimente steht über den Balken.

4. Diskussion

Ein funktionierender Glucosemetabolismus ist unerlässlich für einen reibungslos funktionierenden Organismus. Da durch den immer größer werdenden Bedarf an Nahrungsmitteln der Pestizideinsatz stetig ansteigt, kommen sowohl der Mensch als auch die in freier Wildbahn lebende Tierwelt immer intensiver in Kontakt mit solchen Umweltgiften. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Promotion die Auswirkungen einer einmaligen, oralen Gabe von 0,3 ng/Biene Thiamethoxam auf den Glucosemetabolismus der Honigbiene untersucht. Dabei konnten diverse Effekte gezeigt werden. Eine schematische Darstellung ist in **Abbildung 25** zu finden.

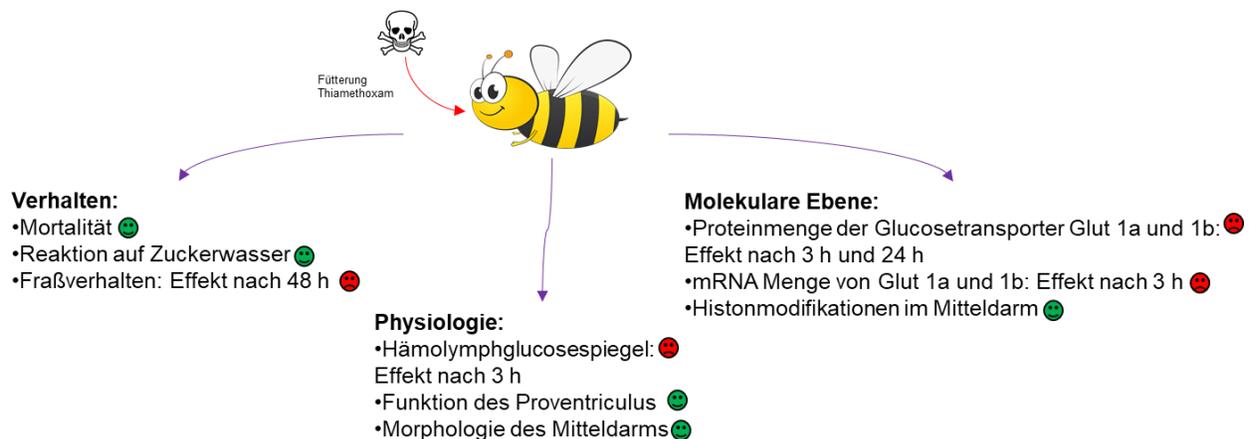


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Auswirkungen der oralen Gabe von 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Grüner Smiley: keine Auswirkungen; Roter Smiley: signifikante Effekte.

4.1 Thiamethoxam beeinflusst das Verhalten der Honigbiene

Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte von Thiamethoxam auf den Metabolismus der Honigbiene zu untersuchen. Dabei wurde neben molekularbiologischen Aspekten auch Physiologie und Verhalten analysiert. Die vorliegende Arbeit ist die erste, welche die Auswirkungen von Thiamethoxam auf allen drei Ebenen und deren Zusammenhang untersucht.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass Thiamethoxam keinen Effekt auf die Reaktion auf Zuckerwasser hat. Allerdings zeigten sich signifikante Veränderungen im Fraßverhalten der Tiere, wenn diese frei in Käfigen gehalten wurden. Es ist bekannt, dass die Proboscis Extension Response (PER) mit dem Sättigungsgrad der Tiere

zusammenhängt, so zeigen gesättigte Tiere geringere Sensitivität auf Zuckerwasser im Vergleich zu gehungerten Tieren (Frings, 1944 und 1949; Braun und Bicker, 1992). Daher erscheinen diese Befunde zunächst widersprüchlich. Da die Tiere nach der Behandlung mit Thiamethoxam weniger fressen, wäre zu erwarten gewesen, dass sich dieser Effekt auch in der Sensitivität zeigt und die Tiere weniger sensitiv auf die dargebotenen Saccharose-Lösungen reagieren. Dieser Widerspruch könnte damit erklärt werden, dass Thiamethoxam die Zuckerrezeptoren beeinflusst. In der Biene sind bisher zwei Gene bekannt, welche im Zusammenhang mit Zuckerrezeptoren stehen. Diese kodieren für die Rezeptoren AmGr1 und AmGr2. Jung et al. zeigten 2015, dass AmGr1 Saccharose, Glucose, Trehalose und Maltose detektiert und isoliert volle Funktionalität aufweist. AmGr2 dagegen scheint nur in Kombination mit AmGr1 voll funktionsfähig zu sein, wobei die Rezeptoren bei Koexpression veränderte Sensitivität zeigen und gegenüber Glucose sensitiver sind als gegenüber Trehalose und Maltose. Daher wird davon ausgegangen, dass die Kombination der beiden Rezeptoren für die Sensorik der verschiedenen Zucker eine wichtige Rolle spielt. Beide Rezeptoren sind vor allem im distalen Segment der Antennen zu finden, aber auch in den Mundwerkzeugen und den Vorderbeinen.

Das veränderte Fraßverhalten am zweiten Tag nach der Behandlung könnte demnach damit erklärt werden, dass sich das Expressionsmuster der Rezeptoren unter Einfluss von Thiamethoxam verändert. So wäre es denkbar, dass durch die Behandlung mit Thiamethoxam die Expression vermindert wird. Da bereits synthetisierte Rezeptoren trotz verändertem Expressionsmuster weiterhin funktionsfähig sind, wäre es durchaus denkbar, dass der Effekt zeitverzögert auftritt. Da sich diese Rezeptoren nicht nur in den Antennen befinden und die Wahrnehmung der Futterquelle unter natürlichen Bedingungen auch mit Hilfe der Mundwerkzeuge und der Vorderbeine stattfindet, ist es durchaus möglich, dass sich die Effekte in den verschiedenen Verhaltensexperimenten unterscheiden (während sich bei der alleinigen Stimulation der Antennen kein Effekt zeigte, konnte bei den Fraßexperimenten im Käfig ein Effekt nachgewiesen werden). Während bei der Messung des PER nur die Antennen stimuliert werden, können die Tiere im Käfig ihre Nahrungsquelle ebenso mit den Mundwerkzeugen und den Vorderbeinen detektieren. Es ist durchaus denkbar, dass Thiamethoxam die Rezeptoren

in den unterschiedlichen Körperteilen unterschiedlich beeinflusst. Diese Hypothese gilt es in Zukunft zu überprüfen.

4.2 Thiamethoxam beeinflusst den Hämolympth-Glucosespiegel in der Biene

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thiamethoxam den Hämolympth-Glucosespiegel der Winterbienen beeinflusst. Da der Einfluss auf die Dynamik des Hämolympth-Glucosespiegels nur temporär ist, wird im weiteren Verlauf nur über die kurzzeitigen Effekte von Thiamethoxam diskutiert. Die vorliegende Arbeit ist die erste, welche sich mit dem Effekt von Thiamethoxam auf den Hämolympth-Glucosespiegel der Biene beschäftigt. Zwar gibt es Studien (Kim et al., 2013; Sun et al., 2016; Khalil et al., 2017) die sich mit den Auswirkungen von Neonicotinoiden auf den Glucosemetabolismus beschäftigen. Allerdings wird hier der Effekt auf die Glucoseaufnahme im Säuger untersucht. Kim et al. konnten 2013 zeigen, dass Imidacloprid die insulinvermittelte Glucoseaufnahme in Adipozyten und in Myocyten vermindert. Ähnlich wie in der vorliegenden Dissertation wurde für diese Experimente das fluoreszierende Glucosederivat 2-NBDG verwendet. Hierfür wurden die Zellen zunächst in Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen Imidacloprid sechs Tage kultiviert, danach mit 2-NBDG inkubiert und anschließend die Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dieses Ergebnis lässt sich nicht mit den Ergebnissen in der vorliegenden Dissertation in Einklang bringen, da eine verminderte Glucoseaufnahme in die Zellen eine erhöhte Glucosekonzentration im Blut bzw. in der Hämolymphe zur Folge hätte. Allerdings lässt sich diese Studie aufgrund der unterschiedlichen Herangehensweise nur bedingt mit der vorliegenden Dissertation vergleichen. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden bei Kim et al., 2013 isolierte Zellen und nicht intakte Organsysteme untersucht. Demnach könnten sich die gegensätzlichen Ergebnisse damit erklären lassen, dass isolierte Zellen aufgrund des fehlenden Verbundes anders reagieren, als Zellen im intakten Organismus. Khalil et al. konnten 2017 zeigen, dass eine Behandlung über 60 Tage mit Imidacloprid bei Ratten dazu führt, dass der Insulinspiegel in der Leber erniedrigt ist und daraus resultierend der Blutglucosespiegel steigt. Da in der vorliegenden Arbeit der Glucosespiegel in der

Hämolymphe der Biene nach der Behandlung mit Thiamethoxam signifikant erniedrigt ist, scheint die Arbeit von Khalil et al. (2017) zunächst den Befunden dieser Dissertation zu widersprechen. Allerdings wurden zwei unterschiedliche Parameter getestet: während die Ratten in der Studie von Khalil et al. (2017) über einen Zeitraum von 60 Tagen mit Imidacloprid behandelt wurden, erhielten die Bienen in der vorliegenden Arbeit lediglich eine einmalige Behandlung mit Thiamethoxam. Demnach wäre es denkbar, dass die Effekte von Neonicotinoiden auf den Glucosespiegel im Blut bzw. in der Hämolymphe je nach Behandlungsdauer variieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein Effekt eines Neonicotinoids auf den Glucosemetabolismus im intakten Organismus der Honigbiene gezeigt werden. Für die veränderte Dynamik des Hämolymphe-Glucosespiegels gibt es zwei mögliche Hypothesen:

1. Thiamethoxam verhindert den Transport der Glucose aus dem Verdauungstrakt in die Hämolymphe (im weiteren Verlauf „Glucose Zufuhr“ genannt) oder F
2. Thiamethoxam sorgt für übermäßigen Import der Glucose aus der Hämolymphe in die Zellen des Gewebes (im weiteren Verlauf „Glucose Verbrauch“ genannt) (**Abbildung 26**).

4. Diskussion

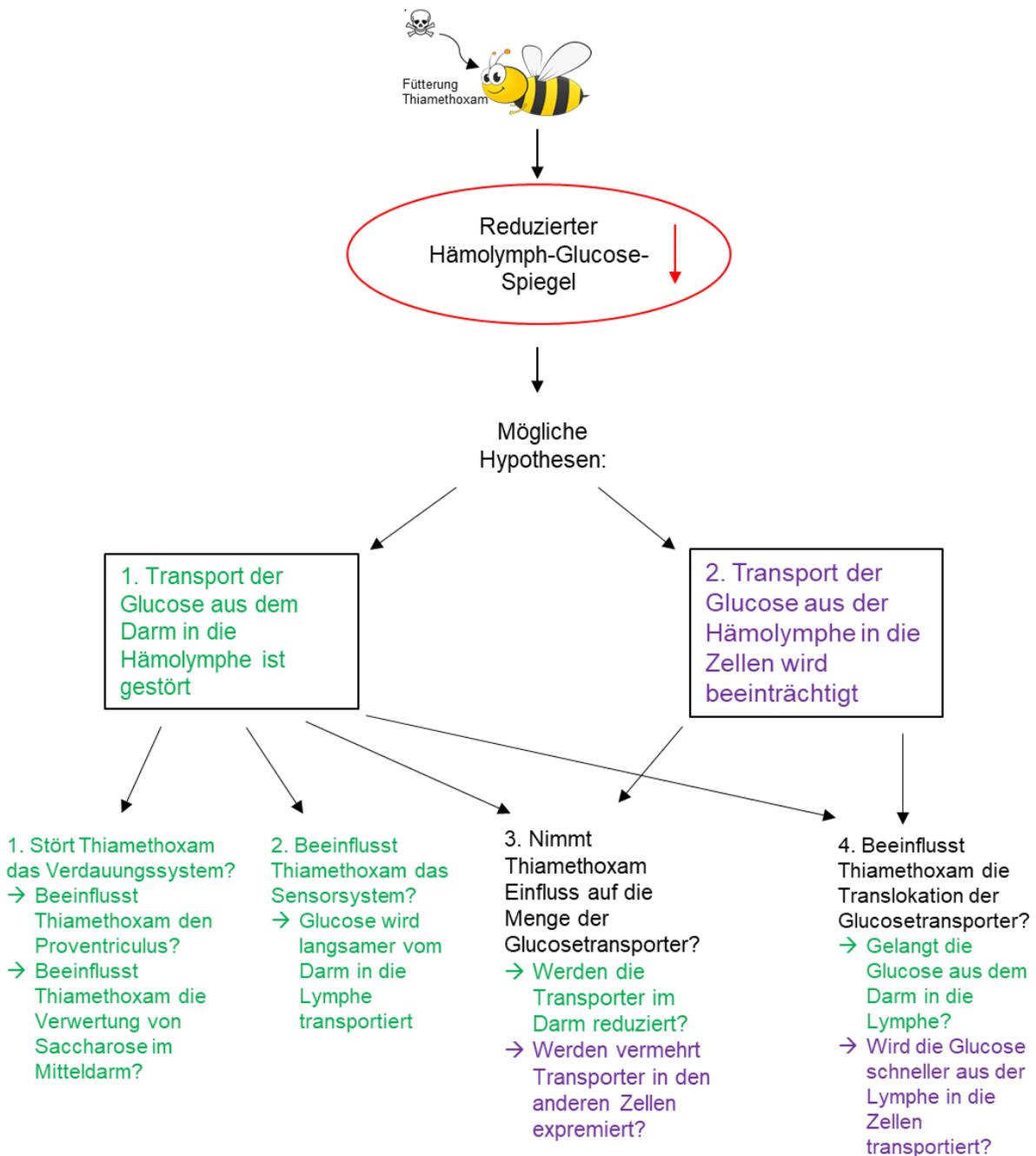


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Effekte auf die „Glucose Zufuhr“ (grün) und die „Glucose Verbrauch“ (lila) mit möglichen Erklärungen für die gezeigten Effekt von Thiamethoxam auf den Hämolymp-Glucosespiegel der Biene.

4.2.1 Thiamethoxam hat keinen Einfluss auf die Glucose Zufuhr vom Kropf in den Mitteldarm

Zur Klärung des veränderten Hämolymp-Glucosespiegels wurden zunächst die Auswirkungen von Thiamethoxam auf das Verdauungssystem untersucht. Die aufgenommene Nahrung gelangt zunächst in den Kropf. Aufgrund einer kutikularen Auskleidung findet hier keinerlei Absorption statt, sondern der Nahrungsbrei wird zielgerichtet durch Öffnen des Proventriculus zum Mitteldarm weiter transportiert (Maddrell und Gardiner, 1980). Der Proventriculus stellt demnach den ersten Kontrollpunkt bei der Zufuhr der Glucose dar. Im Mitteldarm wird die Nahrung mit Hilfe diverser Enzyme in verwertbare Bestandteile gespalten und gelangt dann in die Hämolymphe. Während bei nicht sozialen Insekten der Kropf schnellstmöglich geleert wird, um den Energiebedarf des Organismus zu decken bzw. überschüssige Nahrungsenergie einzuspeichern, muss bei sozialen Insekten wie der Honigbiene möglichst viel Nahrung im Kropf verweilen, um diese später für die Kolonie bereit stellen zu können (Blatt und Roces, 2002). Dennoch muss ausreichend Nahrung in den Mitteldarm transportiert werden, um den Organismus mit genügend Energie versorgen zu können. Hierbei spielt der Proventriculus eine entscheidende Rolle. Dabei wird kontrovers darüber diskutiert, welche Faktoren die Aktivität des Proventriculus und damit die Entleerungsrate des Kropfes beeinflussen. Schreiner stellte 1952 die Hypothese auf, dass die Entleerungsrate des Kropfes sowohl von der Zuckerkonzentration der Nahrung als auch von der lokomotorischen Aktivität der Tiere abhängig ist. Nùnez et al. (1974) gehen davon aus, dass der Gehalt an Trehalose in der Hämolymphe der maßgebende Kontrollfaktor für die Funktion des Proventriculus darstellt, wohingegen Crailsheim in seiner Arbeit aus dem Jahr 1988 postuliert, dass die Osmolarität der Hämolymphe die Entleerungsrate des Kropfes bestimmt. Blatt und Roces (2002) konnten zeigen, dass die Entleerungsrate des Kropfes linear mit der metabolischen Umsatzrate der Tiere zusammenhängt.

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass Thiamethoxam zu einem vergleichsweise niedrigeren Hämolymp-Glucosespiegel führt. Davon ausgehend, dass die Entleerungsrate des Kropfes mit der metabolischen Umsatzrate der Tiere korreliert, könnte postuliert werden, dass die Behandlung mit Thiamethoxam dazu führt, dass der

Organismus nicht mehr in der Lage ist, seinen Energiebedarf korrekt zu ermitteln und somit falsche Informationen an den Proventriculus liefert. Dem System würde demnach die Information vorliegen, dass genug Energie zur Verfügung steht und die Entleerungsrate des Kropfes würde somit verlangsamt. In Folge dessen würde der Glucose Spiegel in der Hämolymphe trotz Nahrungsaufnahme sinken. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass sich die Entleerungsrate des Kropfes zwischen Kontrolle und mit Thiamethoxam behandelten Tieren unterscheidet. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde die Aktivität des Proventriculus indirekt mit Hilfe von 2-NBDG untersucht. Da sich kein Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung zeigte, kann diese Hypothese verworfen werden. Thiamethoxam hat demnach keine Auswirkung auf die Funktionalität des Proventriculus. Dies ist die erste Arbeit, welche die Auswirkungen eines Toxins auf die Funktionalität des Proventriculus untersucht.

4.2.2 Thiamethoxam hat keinen Einfluss auf die Glucose Zufuhr aus dem Mitteldarm in die Hämolymphe

Eine weitere mögliche Erklärung für den vorübergehend niedrigeren Glucosespiegel in der Hämolymphe der Biene ist, dass durch Thiamethoxam die Spaltung der Saccharose in Fructose und Glucose vorübergehend verhindert wird. Bei vielen Insekten gibt es im Mitteldarm einen pH Gradienten, der zu einer Kompartimentierung führt. So sind im anterioren Teil des Darms Carbohydrasen aktiv, wohingegen im posterioren Teil eher Proteasen aktiv sind (Terra und Ferreira, 1994). In der Biene katalysieren α -Glucosidasen die Hydrolyse von Saccharose. Zu finden sind zwei α -Glucosidasen, die sich anhand ihrer Molekularen Masse unterscheiden lassen. Davon kommt eine hauptsächlich im Kopf und im Abdomen vor, wird in den Hypopharyngealdrüsen gebildet und dient vermutlich der Spaltung von Saccharose aus dem Nektar. Die zweite kann nur im Abdomen gefunden werden und katalysiert demnach die Spaltung von Saccharose im Mitteldarm (Terra und Ferreira, 1994). Crailsheim postulierte bereits 1988, dass die Absorption von Glucose in den anterioren zwei Dritteln des Mitteldarms stattfindet. Während in Säugern bekannt ist, dass im Dünndarm vor allem SGLT1, GLUT2 und GLUT5 für die Absorption von Glucose verantwortlich sind, gibt es in Insekten nur sehr wenige Studien, die die Anwesenheit ähnlicher Transporter zeigen. Darunter sind

Drosophila melanogaster (Wang et al., 1993), Feuerwanzen *Dysdercus peruvianus* (Bifano et al., 2010); Zikade *Nilaparvata lugens* (Price et al., 2007); Schlupfwespe *Aphidius ervi* (Caccia et al., 2007); Feuerameise *Solenopsis invicta* (Chen et al., 2006) und *Apis mellifera* (Rether, 2012). Von der Hypothese ausgehend, dass Thiamethoxam die Enzymaktivität der α -Glucosidasen verhindern würde, verbliebe die Saccharose als Disaccharid im Mitteldarm, wodurch auch nach der Fütterung kein Anstieg des Glucose Levels in der Lymphe zu detektieren wäre.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde abermals mit 2-NBDG gearbeitet. Da es sich hierbei um ein fluoreszierendes Glucosederivat handelt, welches nicht zuerst enzymatisch gespalten werden muss, wäre zu erwarten, dass es auch unter Einfluss von Thiamethoxam in die Hämolymphe transportiert wird und der Glucose Spiegel wie in der Kontrollgruppe ansteigt. Da bei diesem Experiment, ähnlich den Messungen der Hämolymphe-Glucose, das Fluoreszenzsignal nach der Behandlung geringer war, als bei der Kontrolle, kann davon ausgegangen werden, dass Thiamethoxam keinen Einfluss auf die Hydrolyse von Saccharose nimmt. Um diesen Rückschluss zu sichern, ist es erforderlich die an der Verdauung beteiligten Enzyme und ihre Funktion unter Einfluss von Thiamethoxam zu messen.

4.2.3 Thiamethoxam hat keinen Einfluss auf die Glucose Zufuhr aus dem isolierten Mitteldarm

Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Thiamethoxam zwar den Hämolymphe-Glucosespiegel beeinflusst, nicht aber den Proventriculus und die Verdauung. Es gibt einige Studien, die zeigen, dass Neonicotinoide das Potential besitzen, die Zellen des Verdauungstraktes zu schädigen (Oliveira et al., 2012; Catae et al., 2014; Catae et al., 2017). Oliveira et al. (2012) konnte zeigen, dass die kollektive Behandlung mit 0,428 ng pro Biene pro Tag zu Auswirkungen auf die Zellen des Mitteldarms führt. So zeigten die Zellen vermehrt zytoplasmatische Vakuolisierung und vermehrte Elimination von Zellen. Die Anzahl der regenerativen Zellen (diese Zellen sind verantwortlich für die Erneuerung des Epithels) war vermindert, demnach könnte Thiamethoxam die Erneuerung des Darmepithels negativ beeinflussen. Auffällig dabei war, dass diese Effekte mit zunehmender Behandlungsdauer abnahmen. Die Autoren

gehen davon aus, dass Thiamethoxam die Zellen des Verdauungstraktes schädigt, diese Schäden aber mit der Zeit behoben werden können. Auch die Arbeit von Catae et al. aus dem Jahr 2014 liefert Hinweise, dass Thiamethoxam die Zellen des Mitteldarms in der Biene schädigt. In dieser Studie wurden Gruppen von 25 Bienen in Käfigen gehalten und kollektiv vergiftet. Die ungefähre Dosis lag hier ebenfalls bei 0,428 ng pro Biene pro Tag. Nach einem, drei, fünf und acht Tagen wurde der Mitteldarm mittels Elektronenmikroskops untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass nach einem Tag Behandlung die größten morphologischen Schäden auftraten, welche sich bis zum achten Tag der Behandlung wieder normalisierten. Es konnte unter anderem beobachtet werden, dass die Cristae der Mitochondrien abnahmen, der Zellkern unregelmäßig geformt war und das Endoplasmatische Retikulum unorganisierter erschien. Catae et al. (2014) schließt daraus, dass die Zellen des Mitteldarms so stark geschädigt werden, dass sowohl der Energiehaushalt als auch die Produktion der Organellen aus dem Gleichgewicht gerät und somit eine normale Funktion des Epithels nicht mehr gewährleistet ist. 2017 konnte die Arbeitsgruppe um Catae ähnliche Effekte nach der Behandlung mit Imidacloprid zeigen. Auch hier konnten Schädigungen der Zellkerne und Mitochondrien im Epithel des Mitteldarms festgestellt werden. Im Unterschied zu den durch Thiamethoxam versuchten Schädigungen, konnte bei der Behandlung mit Imidacloprid beobachtet werden, dass die Zellschädigungen mit längerer Behandlungsperiode mehr werden. Diese Effekte wurden bisher nur histologisch beobachtet, nicht aber hinsichtlich der Funktion des Mitteldarms.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Thiamethoxam die Funktion des Mitteldarms nicht beeinträchtigt. Obwohl Thiamethoxam das Potenzial besitzt die Zellen des Darmepithels zu schädigen, kann die Hypothese, dass diese Schädigungen den zielgerichteten Glucosetransport verhindern, verworfen werden. Dabei gilt es zu beachten, dass die bisherigen Studien (Oliveira et al., 2012; Catae et al., 2014; Catae et al., 2017) aufgrund der unterschiedlichen Parameter nur eingeschränkt mit der vorliegenden Arbeit zu vergleichen sind. Zum einen stehen sich Langzeit- und Kurzzeitbehandlung gegenüber. Zum anderen wurden bei den Arbeiten von Oliveira et al. und Catae et al. die Tiere kollektiv behandelt, sodass nicht sichergestellt ist, welche Dosis des Neonicotinoids die Tiere tatsächlich zu sich nahmen.

4.2.4 Glucosetransporter als mögliches Target von Thiamethoxam

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thiamethoxam zwar die Dynamik des Hämolymp-Glucosespiegels beeinträchtigt den Darm aber nicht in der Art beschädigt, dass die Glucose unkontrolliert austritt oder die Verdauung beeinträchtigt ist. Der veränderten Dynamik des Hämolymp-Glucosespiegels muss demnach eine andere Ursache zu Grunde liegen. Mögliche Ursachen könnte unter anderem ein durch die Entgiftung erhöhter Energieverbrauch der Zellen sein. Ebenso wäre es denkbar, dass die Behandlung mit Thiamethoxam die Glucosetransporter beeinflusst. Da es bereits einige Studien gibt, die zeigen, dass verschiedene Neonicotinoide Einfluss auf die Glucosetransporter im Säuger nehmen (Kim et al., 2013; Park et al., 2013; Sun et al., 2016; Khalil et al., 2017), soll im weiteren Verlauf erörtert werden, ob die Glucosetransporter Glut1 a und Glut1 b in der Biene mögliche Targets für Thiamethoxam darstellen. Dabei gilt zu beachten, dass Effekte auf die Glucosetransporter sowohl die Glucose Zufuhr als auch den Glucose Verbrauch beeinflussen können. So könnte eine Beeinflussung der Glucosetransporter im Mitteldarm die Glucose Zufuhr verändern, während eine Beeinflussung der Glucosetransporter im Muskelgewebe den Glucose Verbrauch verändern könnte. Beide Möglichkeiten werden im Folgenden diskutiert.

4.2.4.1 Die Proteinmenge der Glucosetransporter hat keinen Effekt auf die veränderte Dynamik der Hämolymp-Glucose

Es wäre denkbar, dass Thiamethoxam indirekt zur Degradation des Transporters im Mitteldarm beiträgt und dadurch die aus der Nahrung gewonnene Glucose nicht mehr aus dem Darm in die Hämolymphe transportiert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass Thiamethoxam 3 h nach der Behandlung keinen Effekt auf die Proteinmenge von Glut1 a und Glut1 b im Mitteldarm hat. Demnach kann die Hypothese, dass Thiamethoxam den Hämolymp-Glucosespiegel beeinflusst, in dem es zum Abbau der Glucosetransporter im Mitteldarm beiträgt, verworfen werden. Auf der anderen Seite wäre es denkbar, dass durch die Behandlung mit Thiamethoxam die Expression der Glucosetransporter in Fett und Muskelgewebe gesteigert wird, wodurch es zur vermehrten Aufnahme der Glucose aus der Hämolymphe und dadurch

zu dem vergleichsweise niedrigeren Hämolymp-Glucosespiegel kommt. In diesem Fall wäre eine erhöhte Menge der Transporter 3 h nach der Behandlung zu erwarten gewesen. Da jedoch keine erhöhte Menge der Glucosetransporter im Abdomen festgestellt werden konnte, kann diese Hypothese verworfen werden.

Im Kontrast zu dieser Annahme konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass Thiamethoxam die Proteinmenge sowohl des Glut1 a als auch des Glut1 b in Gehirn und Abdomen 24 h nach der Behandlung signifikant reduziert. Da diese Veränderungen nicht Ursache der veränderten Dynamik des Hämolymp-Glucosespiegels sein können, stellt sich die Frage, ob der veränderte Hämolymp-Glucosespiegel ursächlich für die reduzierte Proteinmenge ist. Rether (2012) konnte zeigen, dass die mRNA Menge des Glut1 a im Körper der Biene negativ mit dem Hämolymp-Glucosespiegel korreliert ist, bei geringerer Glucosekonzentration in der Hämolymphe wurde mehr Glut1 a mRNA detektiert. Glut1 b dagegen ist in dieser Studie von der Glucosekonzentration in der Hämolymphe nicht beeinträchtigt. Obwohl von der mRNA Menge nur bedingt Rückschluss auf die Proteinmenge gezogen werden kann, liefert die Arbeit von Rether (2012) Hinweise darauf, dass es einen Zusammenhang zwischen Menge der Glucosetransporter und Hämolymp-Glucosespiegel gibt. Der Zusammenhang zwischen einem veränderten Hämolymp-Glucosespiegel und Proteinmenge der Glucosetransporter wurde in der Biene bisher noch nicht untersucht. Auch im Säuger wird der Zusammenhang zwischen einem veränderten Blutglucosespiegel und der Regulation der Expression der Glucosetransporter kontrovers diskutiert (Kumagai et al., 1995; Lee et al., 2000; Duelli et al., 2001). Basierend auf den Ergebnissen von Rether (2012) kann davon ausgegangen werden, dass der veränderte Hämolymp-Glucosespiegel nicht ursächlich für die beobachteten Veränderungen der Glucosetransporter ist. Wie genau Thiamethoxam zur veränderten Proteinmenge der Glucosetransporter führt, kann bisher nicht abschließend geklärt werden. Hierfür sind weitere Untersuchungen nötig.

4.2.4.2 Auswirkungen von Thiamethoxam auf die Translokation der Glucosetransporter

Thiamethoxam hat zwar einen Effekt auf die Proteinmenge der Glucosetransporter in der Biene, allerdings liefern diese Veränderungen keine Erklärung für die veränderte Dynamik der Hämolymp-*Glucose*. Obwohl die Menge der Glucosetransporter in den entsprechenden Geweben nicht verändert ist, könnte Thiamethoxam dennoch Einfluss auf die Transporter nehmen. Es ist bekannt, dass Glucosetransporter als Antwort auf sich verändernde Bedingungen transloziert werden können (Augustin und Mayoux, 2014). Hierbei werden die Transporter entweder in die Membran eingebaut oder aus der Membran ausgebaut. Als mögliche Regulatoren der Translokation werden im Säuger unter anderem Insulin, AMPK, PKC und physische Aktivität diskutiert (Augustin und Mayoux, 2014). Während die Translokation der Glucosetransporter im Säuger in großen Teilen bekannt ist, gibt es hierzu in der Biene bzw. in Insekten bisher keine Studien. Demnach könnte Thiamethoxam Einfluss auf die Translokation nehmen. Obwohl sich in diesem Szenario die Transportrate der *Glucose* verändern würde, wäre kein Effekt in der absoluten Proteinmenge zu erkennen. Die Translokation kann auf der einen Seite die *Glucose* Zufuhr vermindern, indem in die Membran der Zellen des Epithels des Mitteldarms weniger Transporter eingebaut werden. In diesem Fall würde weniger *Glucose* aus dem Mitteldarm transportiert, wodurch es zu einem verminderten Hämolymp-*Glucose*spiegel käme. Auf der anderen Seite könnte die Aufnahme in *Glucose*-verbrauchende Zellen und Gewebe beeinträchtigt werden, indem in die Membran von zum Beispiel Muskelzellen mehr Transporter eingebaut werden. Dies würde dazu führen, dass vermehrt *Glucose* in die Zellen aufgenommen werden kann, wodurch der Hämolymp-*Glucose*spiegel vergleichsweise schneller sinkt. Im Folgenden soll die hypothetische Wirkung von Thiamethoxam auf die AMPK und Insulin und damit auf Translokation der Glucosetransporter diskutiert werden.

4.2.4.2.1 Translokation vermittelt durch AMPK

Die 5'-AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK) spielt nach bisherigen Erkenntnissen eine Schlüsselrolle in der Kontrolle des Energiemetabolismus, sowohl in Insulin sensitiven als auch in Insulin insensitiven Geweben (Rutter et al., 2003). Die AMPK reagiert auf den

Abbau von ATP innerhalb der Zellen, indem sie anabole Prozesse (zum Beispiel Fettsäuresynthese) drosselt und katabole Prozesse (wie die Fettsäureoxidation) ankurbelt (Hardie et al., 2017) (siehe **Abbildung 27**). Ebenso scheint die AMPK in die Prozesse involviert zu sein, welche zur Insulinausschüttung und zum Sättigungsgefühl beitragen (Andersson et al., 2003). Gleichermaßen gibt es Hinweise darauf, dass die AMPK eine wichtige Rolle bei der Translokation des GLUT4 spielt (Chen et al., 2008 und 2011). Auch verstärkt die AMPK die Glucoseaufnahme durch die Aktivierung von GLUT1 (Barnes et al., 2002). Durch die Bindung von AMP wird die AMPK aktiviert. Dies geschieht in drei Schritten: 1. die allosterische Aktivierung durch AMP, 2. Hemmung der Dephosphorylierung der AMPK und 3. Phosphorylierung der AMPK. Dabei ist die Bindung von AMP an die AMPK unerlässlich, sowohl für die Phosphorylierung als auch für die Hemmung der Dephosphorylierung. Dieser dreifache Weg der Regulation der AMPK macht diese hochempfindlich auf Veränderungen des AMP Levels. In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass die AMPK Einfluss auf die Nahrungsaufnahme nimmt. So ist Leptin in der Lage die AMPK-Aktivität im Hypothalamus, derjenigen Region im Gehirn, welche das Essverhalten steuert, herunter zu regulieren. Ghrelin dagegen erhöht die Aktivität der AMPK im Hypothalamus (Andersson et al., 2003). Es wurde zudem gezeigt, dass die Nahrungsaufnahme die AMPK Aktivität im Hypothalamus senkt, während Hunger diese erhöht. In Folge dessen, führt die Aktivierung der AMPK im Hypothalamus zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme, während die Deaktivierung der AMPK die Nahrungsaufnahme vermindert (Taleux et al., 2008).

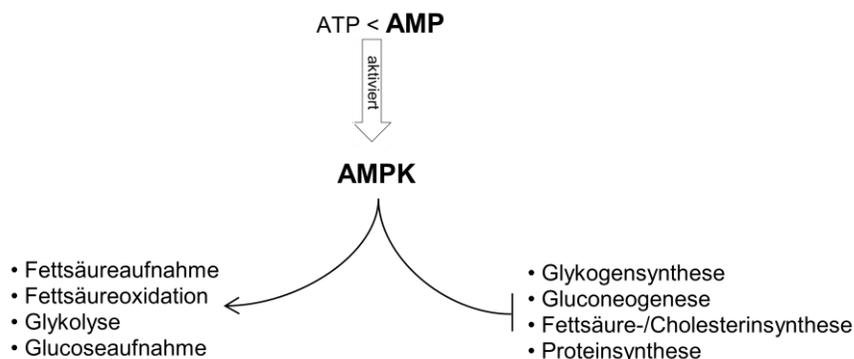


Abbildung 27: Eine Verschiebung des ATP:AMP Verhältnisses hin zu AMP bewirkt die Aktivierung der AMPK. Dadurch werden anabole Prozesse wie Glykogensynthese, Gluconeogenese, Fettsäure- und Proteinsynthese gehemmt, wohingegen katabole Prozesse wie Fettsäureaufnahme, Fettsäureoxidation, Glucoseaufnahme und Glycolyse angekurbelt werden.

Die AMPK wurde nicht nur im Säuger, sondern auch in Insekten gefunden. So gibt es in *Drosophila* eine AMPK, die hohe Ähnlichkeit zur Säuger AMPK aufweist (Johnson et al., 2010). Sie wird, ebenso wie beim Säuger, von AMP aktiviert und hat dieselben Targets. Auch in der Biene scheint die AMPK eine Rolle bei der Regulation des Glucosemetabolismus zu spielen. Unter Aktivierung der AMPK mit Hilfe von AICAR kommt es zu einer verzögerten Aufnahme der Glucose aus der Hämolymphe in die Zellen (Rether, 2012). Ebenso führt die Aktivierung zu einer verminderten Reaktion auf Zuckerwasser. Die Arbeit von Rether (2012) zeigt, dass die AMPK eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Glucosemetabolismus spielt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich nicht nur das Fraßverhalten der Tiere verändert, sondern auch die Dynamik des Hämolymphe-Glucosespiegels. Betrachtet man nun die Tatsache, dass die AMPK beim Säuger eine essenzielle Rolle bei der Regulation des Glucosemetabolismus spielt und diese auch mit großer Ähnlichkeit in der Biene vorkommt, erscheint es denkbar, dass Thiamethoxam diese beeinflusst. Dabei können Veränderungen der Aktivität der AMPK sowohl auf die Glucose Zufuhr als auch auf den Glucose Verbrauch Einfluss nehmen. Es ist denkbar, dass Thiamethoxam das ATP:ADP, bzw. ATP:AMP Verhältnis verschiebt (zum Beispiel durch erhöhten Energiebedarf durch Entgiftung) und dadurch die AMPK aktiviert oder deaktiviert. Auf der einen Seite ist es denkbar, dass durch die Behandlung mit Thiamethoxam die AMPK in den Zellen des Mitteldarms deaktiviert wird, wodurch die Translokation der Glucosetransporter vermindert wird. Folge wäre, dass die Zufuhr der Glucose vermindert wird und der Hämolymphe-Glucosespiegel trotz Fütterung nicht ansteigt. Auf der anderen Seite würde die Aktivierung der AMPK in zum Beispiel Muskelgewebe dazu führen, dass vermehrt Glucosetransporter in die Zellmembran eingebaut werden und somit mehr Glucose aus der Hämolymphe in die Zellen aufgenommen wird. Dadurch sinkt der Hämolymphe-Glucosespiegel nach der Behandlung mit Thiamethoxam schneller ab (**Abbildung 28**).

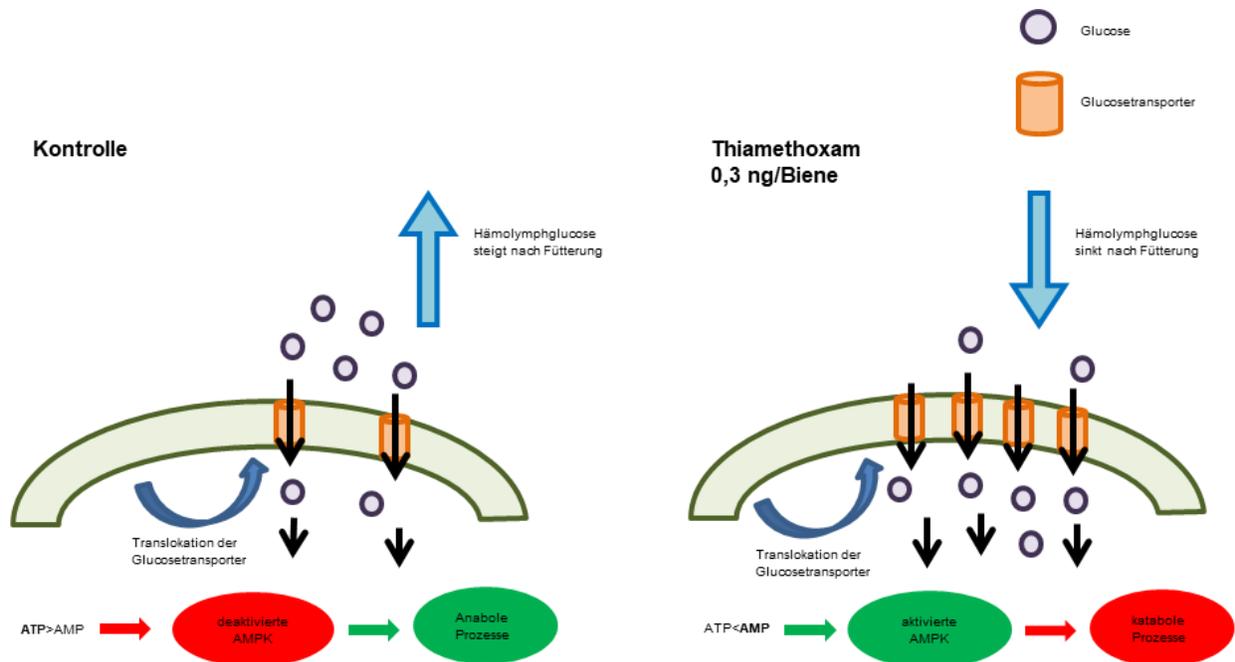


Abbildung 28: Schematische Darstellung der möglichen Auswirkung von Thiamethoxam auf die Translokation der Glucosetransporter bei den Glucose Verbrauchern. Durch die Behandlung mit Thiamethoxam und des potentiell erhöhten Energiebedarfes durch Entgiftungsprozesse wird das ATP:AMP Verhältnis in Richtung AMP verschoben. Dies aktiviert die AMPK, welche ihrerseits durch die vermehrte Translokation der Glucosetransporter den Transport der Glucose aus der Hämolymphge steigert. Daraus resultiert ein rasch abfallender Hämolymph-Glucosespiegel.

4.2.4.2.2 Translokation vermittelt durch Insulin

Es ist bekannt, dass im Säuger die Translokationsmechanismen zellspezifisch sind. So steigert beispielsweise Insulin die Translokation von GLUT4 im Fett- und Muskelgewebe. Die insulinvermittelte Translokation findet demnach auf der Glucose Verbraucher Seite statt. Kim und seine Arbeitsgruppe konnten 2013 zeigen, dass die Inkubation mit Imidacloprid sowohl bei Adipozyten als auch bei Myo- und Hepatozyten die Insulin vermittelte Glucoseaufnahme mindert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Imidacloprid die Phosphorylierung der AKT senkte, während die Gesamtmenge des Proteins gleichblieb. Da die phosphorylierte AKT eine Hauptrolle bei der Translokation der Glucosetransporter spielt lässt sich die verminderte Glucoseaufnahme demnach dadurch erklären, dass Imidacloprid die Aktivierung der AKT stört und so zur Insulinresistenz beiträgt. Dies lässt den Schluss zu, dass Neonicotinoide das Potenzial besitzen in diesen hoch komplexen Translokationsmechanismus einzugreifen. Diese Studie ist aufgrund der bereits erwähnten Tatsache, dass im Unterschied zur

vorliegenden Dissertation nicht mit dem intakten Organismus, sondern nur in Zellkultur gearbeitet wurde, nur bedingt mit den gezeigten Effekten vergleichbar. Dennoch kann sie einen Hinweis darauf liefern, wie der veränderte Glucose-Spiegel zustande kommen könnte.

Der Insulin oder Insulin ähnliche Signalweg scheint ein hoch konservierter Mechanismus innerhalb der Metazoen zu sein, um Körpergewicht und Wachstum zu regulieren (Vicente de Azevedo und Hartfelder, 2008). Neben Vertebraten haben auch Insekten Insulin ähnliche Peptide (ILPs). Im Gegensatz zu Säugern, welche Insulin im Pankreas produzieren, werden ILPs bei Insekten überwiegend in Neuronen produziert (Broughton und Partridge, 2009). Doch auch in den peripheren Geweben konnte u.a. bei *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* und *Apis mellifera* eine Expression der ILPs dokumentiert werden (Badisco et al., 2008; Nilsen et al., 2011). Auch in der Biene gibt es ILPs (*AmILP-1* und *AmILP-2*) und zwei dazugehörige Rezeptoren (*AmlnR-1* und *AmlnR-2*). Es wird vermutet, dass die ILPs in der Biene bei der Verwertung der Nahrung eine Rolle spielen (Ament et al., 2008; Ihle et al., 2014). Wie bereits erwähnt gehören Bienen zu den Insekten, welche ILPs nicht nur in den Neuronen, sondern auch im Fettkörper exprimieren (Nilsen et al., 2011). Dieses Insulin ähnliche System scheint, ähnlich wie beim Säuger, großen Einfluss sowohl auf das Verhalten der Tiere zu haben als auch als Regulator des Metabolismus zu fungieren. Daher wäre es denkbar, dass es auch eine ähnlich regulierte Translokation der Glucosetransporter wie im Säuger gibt. Dafür spricht auch, dass der Insulinrezeptor bei Invertebraten und Vertebraten große Ähnlichkeiten aufweist.

Die direkte Auswirkung von *AmILP1* und *AmILP2* auf den Hämolymp-Glucosespiegel wurde bisher noch nicht untersucht. Dennoch erscheint es möglich, dass Neonicotinoide wie Thiamethoxam, diesen Signalweg stören. So könnte die Behandlung mit Thiamethoxam dazu führen, dass mehr Insulin ausgeschüttet wird, was dazu führt, dass mehr Glucosetransporter in die Zellmembran der Muskelzellen eingebaut werden. Dies führt wiederum dazu, dass die aus der Nahrung gewonnene Glucose schneller in die Zellen transportiert wird (**Abbildung 29**). Dies könnte den geringeren Hämolymp-Glucosespiegel nach der Behandlung mit Thiamethoxam erklären. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste zunächst untersucht werden ob *AmILP1* und/oder *AmILP2* den Hämolymp-Glucosespiegel beeinflussen. Sollten die ILPs den Glucosespiegel

beeinflussen, so kann anschließend der Einfluss von Thiamethoxam auf den *AmILP1* und *AmILP2* Spiegel in der Hämolymphe untersucht werden. In Mäusen wurden ähnliche Experimente bereits durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass Imidacloprid zu einem erhöhten Insulinlevel führt (Sun et al., 2016).

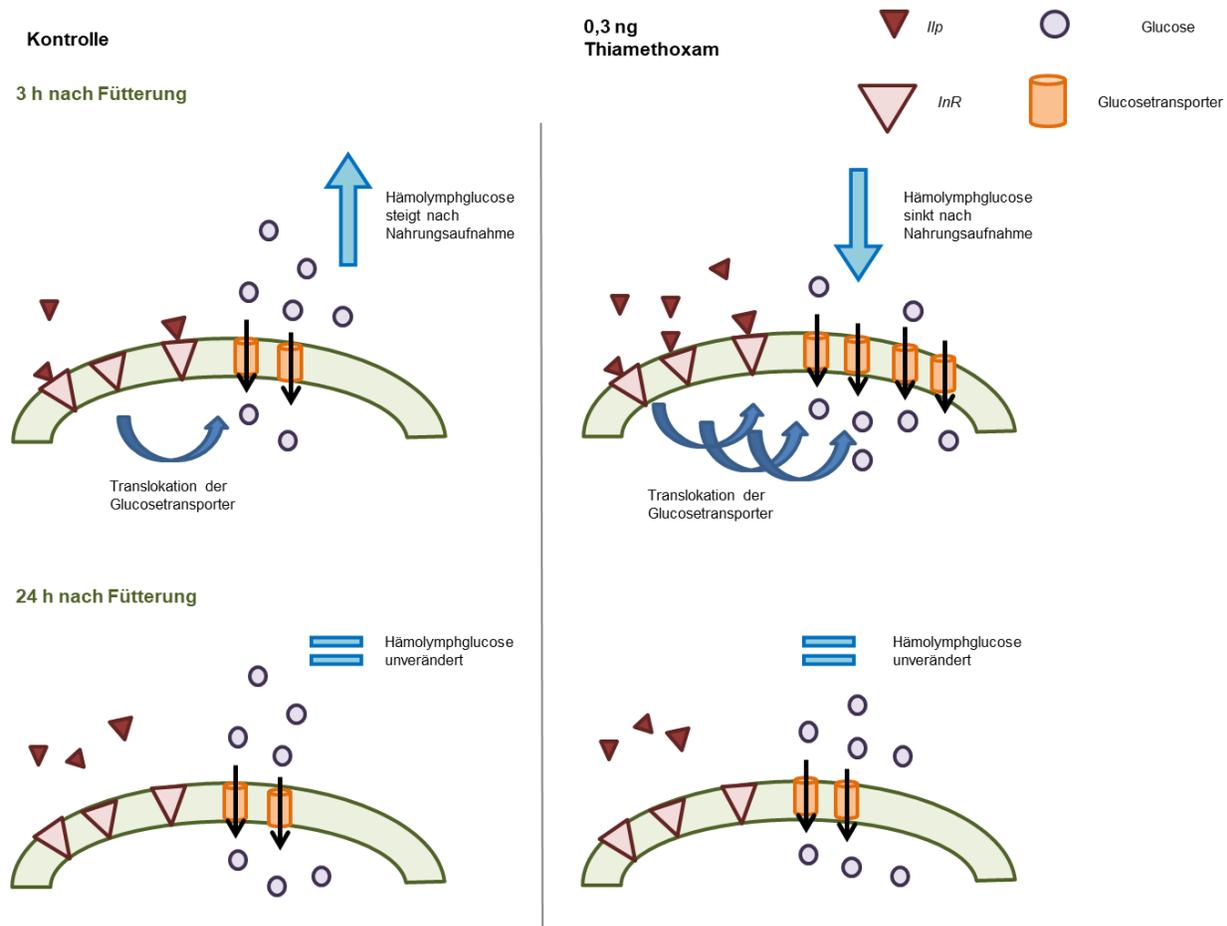


Abbildung 29: Schematische Darstellung der hypothetischen Auswirkungen von Thiamethoxam auf die insulinvermittelte Translokation der Glucosetransporter. Diese Veränderung wirkt sich auf die Glucoseaufnahme in Gewebe/Zellen aus. Durch die Behandlung mit Thiamethoxam könnte vermehrt Insulin ausgeschüttet werden. Dadurch würden mehr Transporter in die Plasmamembran eingebaut, wodurch mehr Glucose aus der Hämolymphe aufgenommen würde und der der Hämolymphe-Glucosespiegel deutlich schneller sinken würde. Nach 24 h ist Thiamethoxam soweit metabolisiert, sodass sich hier kein Unterschied mehr zeigt. *Ilp*: Insulin ähnliche Peptide; *InR*: Insulinrezeptor.

4.3 Thiamethoxam wirkt saisonal unterschiedlich

In der vorliegenden Arbeit konnten konsistente Unterschiede zwischen Sommer- und Winterbienen festgestellt werden. Diese Unterschiede kommen nicht nur nach einer Behandlung mit Thiamethoxam zu Tage, sondern auch bei unbehandelten Tieren. Eine

4. Diskussion

Zusammenstellung der Unterschiede zwischen Sommer- und Winterbienen ist in **Tabelle 3** dargestellt.

Tabelle 3: Zusammenstellung der Unterschiede zwischen Sommerbienen und Winterbienen. Gezeigt sind sowohl Unterschiede bei unbehandelten als auch bei behandelten Tieren. a); Unterschiede, die bereits aus anderen Publikationen bekannt sind; b) Unterschiede, welche in dieser Dissertation gefunden wurden.

a)	bisher bekannte Unterschiede zwischen Sommerbienen und Winterbienen	
	<i>Sommerbienen</i>	<i>Winterbienen</i>
	1. unbehandelte Tiere	
Gutierrez et al., 2007	vergleichsweise kleinerer Fettkörper	vergleichsweise größerer Fettkörper
	2. behandelte Tiere	
nach Behandlung mit Imidacloprid (Decourtye et al. 2004)	geringere Sterberate geringere Zuckerwasserempfindlichkeit schlechtere Lernperformance bei einer Dosis von 12 µg/kg	höhere Sterberate kein Effekt auf Zuckerwasserempfindlichkeit ^t schlechtere Lernperformance erst bei einer Dosis von 48 µg/kg
b)	in dieser Promotion aufgezeigte Unterschiede zwischen Sommerbienen und Winterbienen	
	<i>Sommerbienen</i>	<i>Winterbienen</i>
	1. unbehandelte Tiere	
	vergleichsweise höherer Hämolymp- Glucosespiegel vergleichsweise langsamere Entleerungsrate des Kropfes	vergleichsweise niedrigerer Hämolymp- Glucosespiegel vergleichsweise schnellere Entleerungsrate des Kropfes
	2. behandelte Tiere	
	geringere Sterberate kein Effekt auf Zuckerwasserempfindlichkeit kein Effekt auf Fraßverhalten veränderte Dynamik des Hämolymp- Glucosespiegels	höhere Sterberate geringere Zuckerwasserempfindlichkeit ^t verringertes Konsum von Zuckerwasser kein Effekt auf Hämolymp-Glucosespiegel

So fällt auf, dass Tiere, welche im Winter gefangen wurden, im hungrigen Zustand einen tendenziell niedrigen Glucosespiegel in der Lymphe aufweisen und deutlich heterogener sind (siehe **Tabelle 3 b); 1.**). Nach der Fütterung steigt die Glucosekonzentration der Hämolymphe deutlich stärker an, als bei Tieren aus dem Sommer. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Tiere im Winter einen anderen, etwas schnelleren,

Metabolismus haben, als Tiere aus dem Sommer. Betrachtet man die Entleerungsrate des Kropfes, wird diese Hypothese bestätigt. Im Winter wird der Kropf deutlich schneller entleert, als im Sommer. So ist dieser nach 3 h schon fast völlig entleert, während dieser Prozess bei den Sommerbienen deutlich längere Zeit in Anspruch nimmt (**Tabelle 3, b**; 1.). Da der Kropf bei der Honigbiene lediglich als eine Art Speicherorgan dient und hier keine Absorption von Makronährstoffen stattfindet, muss die Nahrung in den Mitteldarm transportiert werden, wo die Verdauung stattfindet. Dieser Transport findet vermutlich zielgerichtet mit Hilfe des Proventriculus statt. Aller Wahrscheinlichkeit nach gibt es einen Zusammenhang zwischen Lymphglucosespiegel und Entleerungsrate des Kropfes. Die Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass der Kropf umso schneller entleert wird, je niedriger die Lymphglucose ist. Tatsächlich konnte bereits 1999 von Roces und Blatt gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit von verstoffwechselbaren Kohlenhydraten in der Hämolymphe Einfluss auf die Entleerungsrate des Kropfes nimmt. Je mehr Kohlenhydrate in der Lymphe vorhanden sind, desto langsamer entleert sich der Kropf. Die Ergebnisse der vorliegenden Promotion fügen sich gut in diese Studie ein. Bienen, welche im Winter gefangen wurden, zeigen vor Fütterung einen geringeren Hämolymphe-Glucosespiegel und eine schnellere Entleerungsrate des Kropfes, als Tiere aus dem Sommer. Dies wirft wiederum die Frage nach einem intrinsischen Rückkopplungssystem auf, welches, ähnlich wie beim Menschen, den metabolischen Status des Organismus misst, diese Information verarbeitet und an andere Organsysteme (wie den Verdauungstrakt oder das Gehirn) weitergibt. Diese reagieren dann zum Beispiel mit Anpassungen des Verhaltens (zum Beispiel angepasste Nahrungsaufnahme).

Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass Tiere aus dem Sommer weniger sensitiv auf die Behandlung reagieren (**Tabelle 3 b**); 1.). So steigt die Sterberate im Winter bereits bei einer geringeren Konzentration als im Sommer an. Ebenso verhält es sich mit der Zuckerwasserempfindlichkeit. Im Sommer zeigen die Bienen bei keiner getesteten Konzentration eine veränderte Antwort auf die dargebotenen Stimuli, die Tiere aus dem Winter hingegen zeigen nach einer Behandlung eine geringere Zuckerwasserempfindlichkeit. Auch in den Fraßexperimenten zeigt sich lediglich bei den Winterbienen ein Unterschied im Zuckerwasserkonsum. Diese divergierende Reaktion

der Tiere auf die Behandlung mit Thiamethoxam könnte daher rühren, dass sie unterschiedlich mit Zuckerrezeptoren ausgestattet sind. Wie bereits erwähnt wird davon ausgegangen, dass zwei Rezeptoren in Kombination für die Sensorik von Zucker verantwortlich sind (Jung et al., 2015). Dabei spielt die Zusammensetzung dieser beiden eine wichtige Rolle bei der Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen Zuckern. So ist es denkbar, dass Winterbienen ein anderes Expressionsmuster dieser beiden Rezeptoren aufweisen und somit auch unterschiedlich auf die Behandlung mit Thiamethoxam reagieren. Es wäre zu erwarten, dass demnach auch der Glucosemetabolismus nur bei den Winterbienen beeinträchtigt ist. Interessanterweise zeigt sich bei den Veränderungen in der Hämolymphe jedoch kein Unterschied im Winter, dafür allerdings im Sommer (**Tabelle 3 b**); **2.**). Dieses Phänomen konnte sowohl mit einem kommerziell erhältlichen Blutzuckermessgerät als auch mit Hilfe des fluoreszierenden Glucosederivats 2-NBDG gezeigt werden. Die Tiere scheinen Thiamethoxam demnach unterschiedlich zu verarbeiten. Ähnliche, saisonal unterschiedliche Effekte konnten bereits nach Behandlung mit Imidacloprid gezeigt werden (**Tabelle 3 a**); **2.**). In einer Studie von Decourtye et al. (2004) wurden Tiere zu 20 Stück in Käfigen gehalten und über einen Zeitraum von 15 Tagen kollektiv über das Futter mit Imidacloprid behandelt. Die Experimente wurden sowohl im Winter als auch im Sommer durchgeführt. Bei Tieren aus dem Winter war eine geringere Konzentration Imidacloprid tödlich, als bei Tieren im Sommer (Winter: 48 µg/kg; Sommer: 96 µg/kg). Dagegen schienen die Sommerbienen empfindlicher für subletale Effekte zu sein. So wird im Sommer bei geringerer Dosis eine verminderte Reaktion auf Zuckerwasser detektiert, als im Winter (im Sommer vermindert sich der PER nach einer Behandlung mit 48 µg/kg Imidacloprid, im Winter führte keine verwendete Dosis zu einem Effekt). Ebenso zeigte sich eine signifikant schlechtere Lernperformance nach Behandlung mit 12 µg/kg Imidacloprid bei den Sommerbienen, wohingegen die Winterbienen erst nach einer Behandlung mit 48 µg/kg Imidacloprid schlechtere Gedächtnisbildung zeigten.

Betrachtet man die Physiologie der Biene, so fällt auf, dass der größte Unterschied zwischen Sommer- und Winterbienen in der Menge des Fettkörpers liegt. Dieser ist bei Winterbienen in größeren Mengen vorhanden. Der Fettkörper der Insekten ist

vergleichbar mit der Leber des Menschen. Er dient zum einen als Speicherorgan für Energiereserven in Form von Fett und Glykogen, zum anderen fungiert er als endokrines Organ. Eine Hauptfunktion des Fettkörpers in der Biene ist die Produktion von Juvenilhormon und Vitellogenin. Daneben scheint der Fettkörper eine Rolle in der Steuerung des Metabolismus zu spielen. Eine Arbeit mit *Drosophila melanogaster* zeigt, dass der Fettkörper Aminosäuren produziert, welche als Sensor für den metabolischen Zustand des Organismus dienen (Gutierrez et al., 2007). Den Hauptbestandteil des Fettkörpers machen Triglyceride aus (in etwa 90 %), wogegen Glykogen den kleinen Rest bildet. Triglyceride werden aus den mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydraten, Fettsäuren oder Proteinen synthetisiert. Die Lipogenese findet auf die gleiche Weise statt, wie bei Säugetieren. Die Umwandlung von Glucose zu Fett ist größer, als die Umwandlung von Glucose zu Glykogen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thiamethoxam bei den Winterbienen keinen Effekt auf die Hämolymp-*Glucose* hat, wohingegen diese bei den Sommerbienen reduziert wird. Davon ausgehend, dass Tiere aus dem Winter einen größeren Energiespeicher in Form des Fettkörpers haben, kann dieser Unterschied zwischen Sommer- und Winterbienen damit erklärt werden, dass die Tiere bei großem metabolischen Stress, wie in diesem Fall die Exposition mit einem Pestizid, diese Energiereserven mobilisieren und somit ausreichend Energie zur Verfügung haben, um den regulären Zustand aufrecht zu erhalten. Da diese Energiereserven den Sommerbienen nicht zur Verfügung stehen, fehlt hier die Energie, um die Homöostase aufrecht zu erhalten, was wiederum dazu führt, dass die zur Entgiftung benötigte Energie aus der Hämolymphe in Form von *Glucose* gezogen werden muss. Zusätzlich könnte Thiamethoxam im Fettkörper angereichert und somit vom restlichen Organismus ferngehalten werden. Da die Winterbienen einen größeren Fettkörper haben, als die Sommerbienen, könnte hier mehr Thiamethoxam gespeichert werden, wodurch weniger im Organismus zirkuliert und es somit keine Auswirkungen auf den Hämolymp-*Glucose*spiegel gibt. Die Tatsache, dass die Winterbienen aber in den Verhaltensexperimenten empfindlicher sind, als die Tiere aus dem Sommer, spricht gegen diese Hypothese. Eine weitere denkbare Erklärung für die unterschiedliche Sensitivität könnte die unterschiedliche Metabolisierung von Thiamethoxam sein. Da diese unter anderem im Fettkörper stattfindet, wäre es denkbar, dass sich die Metabolisierung im Sommer und im Winter

unterscheidet, wodurch es zu den gezeigten saisonalen Unterschieden kommt. Um diese Frage endgültig zu klären, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Neben diesen physiologischen Unterschieden muss als Grund für die divergierende Sensitivität auch die unterschiedliche Haltung der Tiere in Betracht gezogen werden. Ein großer Unterschied hierbei ist die Futterquelle. Die Tiere im Sommer sind auf natürliche Futterquellen angewiesen, welche sie selbst wählen und sammeln müssen. Diese unterliegen natürlichen Schwankungen. So kann es durchaus vorkommen, dass Futterstress durch zu wenig oder qualitativ minderwertige Nahrung entsteht. Des Weiteren können Sommerbienen ihre Futterquellen frei nach Bedarf wählen und so das optimale Verhältnis aus Fett, Protein und Kohlenhydraten konsumieren. Dementgegen stehen die immer gleichbleibenden Futterquellen, welche den Bienen im Winter gereicht werden. In diesem Fall können die Tiere ihren Bedarf an Makronährstoffen nicht so frei wählen, wie die Tiere im Sommer. Tatsächlich scheint gerade hochwertiger Pollen essenziell für die korrekte Entgiftung zu sein. Der positive Effekt von adäquater Pollenzufuhr konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden. Die Tiere sind u.a. resistenter gegen Krankheitserreger, wie *Nosema apis*, *Nosema ceranae* oder das Bakterium *Bacillus larvae* (Rinderer und Rothenbuhler, 1974; Rinderer und Elliot, 1977; Di Pasquale et al., 2013). Auch scheint eine gute Pollenzufuhr die Resistenz gegen Pestizide zu erhöhen. So konnten Wahl und Ulm bereits 1983 zeigen, dass Bienen, welche mit hochwertigem Pollen gefüttert wurden, resistenter gegen Pestizide sind, als Tiere, welche mit minderwertigem Pollen gefüttert werden. Ursächlich hierfür ist wohl die unzureichende Protein- und Vitaminzufuhr der Tiere, welche darin resultiert, dass Entgiftungsenzyme nicht korrekt arbeiten. Dies gilt vor allem, wenn die Tiere als Larven und junge Adulte unzureichend versorgt werden. Neben der reinen Proteinmenge scheint auch die Pollenvielfalt Einfluss auf das Immunsystem zu haben. Pollensubstitut, welches aus vielen verschiedenen Pflanzenpollen zusammengesetzt wurde, scheint einen positiven Effekt auf Aspekte des Immunsystems zu haben (Glucoseoxidase, Hämatocyten) (Alaux et al., 2010). Di Pasquale und seine Arbeitsgruppe konnten zeigen 2013, dass Pollen aus verschiedenen Pflanzen (*Cistus*, *Castanea*, *Erica* und *Rubus*) unterschiedlich stark auf das Überleben mit *Nosema ceranae* infizierter Bienen hat. So war die Überlebensrate am größten, wenn die Tiere Pollen von *Rubus* fraßen. Demnach scheint nicht nur die Menge an Protein, sondern auch andere Komponenten im Pollen,

wie Fett oder Mikronährstoffe, essenziell für die Fitness der Tiere zu sein. Dies kann nun auf die differente Haltung der Tiere im Sommer bzw. im Winter übertragen werden. Während die Tiere im Sommer Pollen von verschiedenen Pflanzenarten sammeln können, erhalten die Tiere im Winterflughaus zu jeder Zeit dieselbe Pollenmischung. Diese immer gleichbleibende Proteinquelle könnte demnach negativen Einfluss auf die Entgiftungsenzyme haben, wodurch die Tiere schlechter mit der Behandlung mit Thiamethoxam umgehen können. Dieser Hypothese nach erscheint es zunächst widersprüchlich, dass Sommerbienen zwar die Exposition höherer Dosen Thiamethoxam überleben, aber für subletale Effekte sensibler sind, als Winterbienen. Dieses Phänomen könnte sich damit erklären lassen, dass im Winter zwar vergleichsweise nur wenige Tiere überleben, die überlebenden Tiere dafür aber die stärksten und gesündesten und damit resistenter gegenüber subleteren Effekte sind. Im Gegensatz dazu ist es denkbar, dass im Sommer aufgrund des differenten Nahrungszustandes auch die etwas schwächeren Tiere überleben, welche dann anfälliger für subletale Effekte sind. Des Weiteren hat die Nahrungsquelle einen Einfluss auf den Insulinsignalweg. So ist die Expression von *Amlp1* erhöht, wenn die Nahrungsquelle der Biene überwiegend aus Protein besteht (Ihle et al., 2014). Das heißt, dass die differenten Nahrungsquellen im Winter und Sommer zu einem sich unterscheidenden Insulinsignalweg führen könnten. Dies könnte erklären, warum die Hämolymphe-Glucose im Winter nicht von der Behandlung mit Thiamethoxam beeinflusst wird. Im Winter kann der Organismus nicht adäquat auf den metabolischen Stress reagieren. Da der Insulinsignalweg im Winter verändert ist (Ihle et al., 2014), kann nicht genug Glucose aus der Hämolymphe aufgenommen werden, um den Energiebedarf der Entgiftung zu decken. Dementsprechend sieht man zwar keine Veränderungen in der Hämolymphe-Glucose, aber aufgrund der unzureichenden Entgiftung sterben die Tiere. Im Sommer dagegen kann mit Hilfe der *lps* schnell auf den erhöhten Energiebedarf durch die Entgiftung reagiert werden. Die Konzentration der Hämolymphe-Glucose sinkt, um genug Energie für die Entgiftung bereit zu stellen, wodurch die Tiere die Behandlung mit Thiamethoxam besser überleben (Abbildung 30). Für die saisonalen Unterschiede zwischen den Tieren kann zum jetzigen Zeitpunkt keine

4. Diskussion

einheitliche Hypothese aufgestellt werden. Die Effekte lassen sich auf verschiedene Art erklären. Um dies endgültig klären zu können, sind weitere Experimente von Nöten.

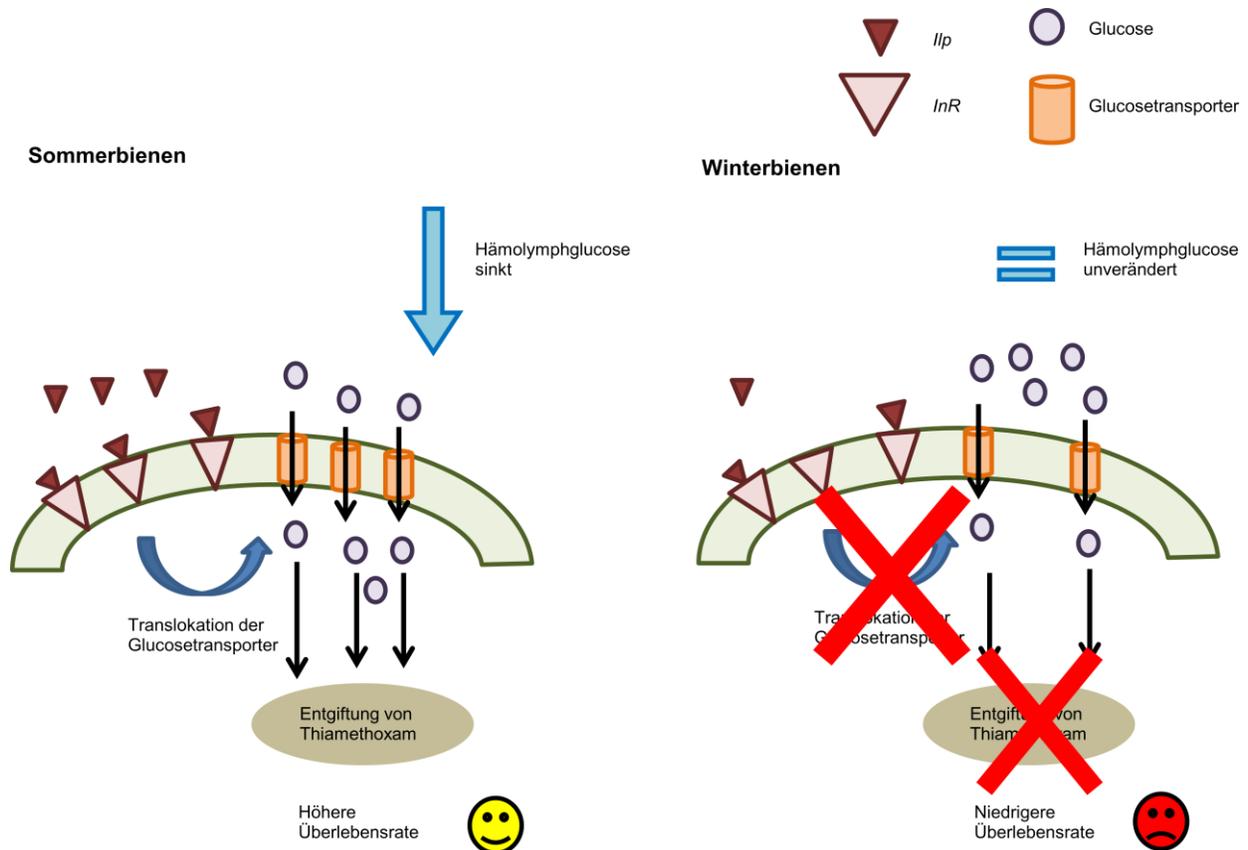


Abbildung 30: Schematische Darstellung der saisonalen Unterschiede. Im Winter könnten sich weniger Insulin ähnliche Peptide (*Ilp*) in der Hämolymphe befinden. Dementsprechend könnte nicht auf den erhöhten Energiebedarf durch die Entgiftung reagiert werden und die Tiere zeigen eine erhöhte Sterberate. Im Sommer dagegen könnte aufgrund des erhöhten Vorkommens an *Ilp* adäquat auf den erhöhten Energiebedarf reagiert werden. Hier überleben vergleichsweise mehr Tiere.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Thiamethoxam nicht nur Einfluss auf das Verhalten der Honigbiene nimmt, sondern auch maßgeblich in den Glucosemetabolismus eingreift. Es wurde gezeigt, dass die orale Gabe von Thiamethoxam dazu führt, dass 3 h nach der Einnahme die Glucosekonzentration in der Hämolymphe der behandelten Tiere signifikant niedriger ist, als in unbehandelten Tieren. Thiamethoxam beeinflusst weder die Funktion des Proventriculus noch die Funktion des Mitteldarms, weshalb gefolgert wird das Thiamethoxam keine nachweisbaren Wirkungen auf den Verdauungstrakt hat.

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass Thiamethoxam Einfluss auf die Proteinmenge der Glucosetransporter sowohl im Gehirn als auch im Abdomen und Mitteldarm nimmt. Thiamethoxam führte zu einer signifikanten Reduktion der Glucosetransporter in Abdomen und Mitteldarm. Da dieser Effekt nur nach 24 h zu beobachten war, konnte ausgeschlossen werden, dass die Veränderungen des Hämolymphe-Glucosespiegels durch Veränderung der Menge der Glucosetransporter zu Stande kommt.

Es ist bekannt, dass im Säuger durch Translokation der Transporter aus dem Cytoplasma in die Zellmembran auf metabolischen Stress reagiert wird. Da die Aminosäuresequenz der Glucosetransporter in Eukaryoten hoch konserviert ist, wäre es denkbar, dass Thiamethoxam direkt, oder indirekt (über zum Beispiel Insulin) die Translokation der Glucosetransporter und damit die Glucoseabgabe aus dem Darm in die Hämolymphe bzw. die Glucoseaufnahme aus der Hämolymphe in die Zellen beeinflusst. Diese Hypothese gilt es in Zukunft zu überprüfen.

Ein weiteres beobachtetes Phänomen war der saisonale Unterschied zwischen Sommer- und Winterbienen. Diese reagierten nicht nur unterschiedlich auf die Behandlung mit Thiamethoxam, sondern zeigten auch in den Kontrollgruppen Unterschiede. So waren Winterbienen empfindlicher gegenüber der Behandlung mit Thiamethoxam, sowohl die Mortalität als auch das Fraßverhalten betreffend. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von Thiamethoxam auf das Fraßverhalten könnte sein, dass die Tiere je nach Saison eine andere Zusammensetzung der Zuckerrezeptoren aufweisen. Es sind bisher zwei Rezeptoren bekannt, welche für die Detektion von Zuckern verantwortlich sind: AmGr1 und AmGr2.

Dabei scheint die Zusammensetzung dieser beiden für die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen Zuckern verantwortlich zu sein. Demnach könnte Thiamethoxam einen der beiden Rezeptoren beeinflussen und somit die Empfindlichkeit gegenüber Saccharose verändern. Die Ergebnisse dieser Dissertation lassen die Hypothese zu, dass sich die Zusammensetzung von AmGr1 und AmGr2 je nach Saison unterscheiden könnte und die Tiere letztendlich unterschiedlich auf die Behandlung mit Thiamethoxam reagieren. Diese Hypothese gilt es in Zukunft zu überprüfen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Thiamethoxam zwar Einfluss auf den Hämolymp-Glucosespiegel der Sommerbienen nimmt, dieser Effekt aber nicht im Winter beobachtet werden kann. Doch nicht nur die Reaktion auf Thiamethoxam ist saisonabhängig, auch die Kontrolltiere unterschieden sich. Neben einem unterschiedlichen Hämolymp-Glucosespiegel entleerte sich der Kropf im Winter schneller als im Sommer. Mögliche Ursachen für diese Unterschiede könnten die divergierende Physiologie der Tiere (vor allem die Menge des Fettkörpers) oder die unterschiedlichen Nahrungsquellen und Haltungsbedingungen sein. Auch hier sind in Zukunft weitere Untersuchungen notwendig.

In dieser Arbeit konnten erstmals die Auswirkungen von Thiamethoxam auf verschiedenen Ebenen des Glucosemetabolismus in der Honigbiene gezeigt werden. Thiamethoxam hat sowohl auf das Verhalten als auch auf molekularer Ebene signifikante Effekte auf den Glucosemetabolismus der Honigbiene.

Literaturverzeichnis

Alaux, C.; Ducloz, F.; Crauser, D.; Le Conte, Y. (2010): Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.* 6:562-565.

Aliouane, Y.; El Hassani, A. K.; Gary, V.; Armengaud, C.; Lambin, M.; Gauthier, M. (2008): Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 28(1):113–122.

Ament, S.A.; Corona, M.; Pollock, H.S.; Robinson, G.E. (2008): Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *PNAS.* 105(11):4226-4231.

Anandhan, A.; Jacome, M. S.; Lei, S.; Hernandez-Franco, P.; Pappa, A.; Panayiotidis, M. I.; Powers, R.; Franco, R. (2017): Metabolic Disorder Dysfunction in Parkinson's Disease: Bioenergetics, Redox Homeostasis and Central Carbon Metabolism. *Brain Res Bull.* 133: 12–30.

Andersson, U.; Filipsson, K.; Abbott, C.R.; Woods, A.; Smith, K.; Bloom, S.R.; Carling, D.; Small, C.J. (2003): AMP-activated Protein Kinase Plays a Role in the Control of Food Intake. *The Journal of Biological Chemistry.* 279(13):12005-12008.

Augustin, R. (2010): The Protein Family of Glucose Transport Facilitators: It's Not Only About Glucose After All. *IUBMB Life.* 62(5):315–333.

Augustin, R.; Mayoux, E. (2014): Mammalian Sugar Transporters. IntechOpen. DOI: 10.5772/58325.

Badisco, L.; Claeys, I.; Van Hiel, M.; Clynen, E.; Huybrechts, J.; Vandermissen, T.; Van Soest, S.; Bosch, L. V.; Simonet, G.; Broeck, J. V. (2008): Purification and characterization of an insulin-related peptide in the desert locust, *Schistocerca gregaria*: immunolocalization, cDNA cloning, transcript profiling and interaction with neuroparsin. *Journal of Molecular Endocrinology.* 40:137-150.

Baldwin, J. M.; Gorga, J. C.; Lienhard, G. E. (1980): The Monosaccharide Transporter of the Human Erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry.* 256(8):3685-36.

Barnes, K.; Ingram, J.C.; Porras, O.H.; Barros, L.F.; Hudson, E.R.; Fryer, L.G.D.; Fougelle, F.; Carling, D.; Hardie, D.G.; Baldwin, S.A. (2002): Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of Cell Science*. 115:2433-2442.

Bifano, T. D.; Thiago, G. P.; Terra, W. R. (2010): Transporters involved in glucose and water absorption in the *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) anterior gut. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 157:1-9.

Bortolotti, L.; Montanari, R.; Marcelino, J.; Medrzycki, P.; Maini, S.; Porrini, C. (2003): Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology*. 56(1):63-67.

Botías, C.; David, A.; Horwood, J.; Abdul-Sada, A.; Nicholls, E.; Hill, E.; Goulson, D. (2015): Neonicotinoid Residues in Wildflowers, a Potential Route of Chronic Exposure for Bees. *Environ. Sci. Technol.*, 49, 12731–12740.

Brandt, A.; Gorenflo, A.; Siede, R.; Meixner, M.; Büchler, R. (2016): The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*. 86:40-47.

Broughton, S.; Partridge, L. (2009): Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and aging. *Biochem.J.* 418:1–12.

Caccia, S.; Casartelli, M.; Grimaldi, A.; Losa, E.; de Eguileor, M.; Pennacchio, F.; Giordana, B. (2007): Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical GLUT2 in an insect (*Aphidius ervi*, Hymenoptera) and mammals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292: R2284–R2291.

Carruthers, A. (1990): Facilitated Diffusion of Glucose. *Physiological Reviews*. 70(4):1135-1176.

Catae, A. F.; Roat, T. C.; Pratavieira, M.; da Silva Menegasso, A. R.; Palma, M. S.; Malaspina, O. (2018): Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Ecotoxicology* 27:109–121.

Chauzat, M.-P.; Faucon, J.-P.; Martel, A.-C., Lachaize, J.; Cougule, N.; Aubert, M. (2006): A Survey of Pesticide Residues in Pollen Loads Collected by Honey Bees in France. *J. Econ. Entomol.* 99(2): 253-262.

Chen, M-E; Holmes, S. P.; Pietrantonio, P. V. (2006): Glucose Transporter (GLUT8) from the red imported Fire Ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 62:55–72.

Chen, S.; Murphy, J.; Toth, R.; Campbell, D.G.; Morrice, N.A.; Mackintosh, C. (2008): Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factor, insulin and AMPK activators. *Biochem. J.* 409:449-459.

Chen, S.; Wassermann, D.H.; MacKintosh, C.; Sakamoto, K. (2011): Mice with AS160/TBC1D4-Thr649Ala Knockin Mutation are Glucose Intolerant with reduced Insulin Sensitivity and altered GLUT4 trafficking. *Cell Metabolism.* 13:68-79.

Chen, Z.; Zhong, C. (2013): Decoding Alzheimer’s disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology.* 18:21-43.

Choeiri, C.; Staines, W.; Messier, C. (2002): Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. *Neuroscience.* 111(1):19-34.

Ciarmiello, A.; Cannella, M.; Lastoria, S.; Simonelli, M.; Frati, L.; Rubinsztein, D. D.; Squitieri, F. (2006): Brain White-Matter Volume Loss and Glucose Hypometabolism Precede the Clinical Symptoms of Huntington’s Disease. *THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE.* 47:2.

Chemla, A (2016): Einfluss von subletalen Dosen des Neonicotinoid Metabolits N-desmethyl Thiamethoxam auf Lernen, Gedächtnis und Histonmodifikationen bei der Honigbiene. Bachelorarbeit an der Universität des Saarlandes.

Curé, G.; Schmidt, H.W.; Schmuck, R. (1999): Results of a comprehensive field research programme with the systemic insecticide imidacloprid (Gaucho®). In: Proceedings of the 7th International Symposium “Hazards of pesticides to bees”, September 7-9, 1999, Avignon, Frankreich.

De Giorgis, V.; Masnada, S.; Varesio, C.; Matteo A. Chiappedi, M. A.; Zanaboni, M.; Pasca, L.; Filippini, M.; Macasaet, J. A.; Valente, M.; Ferraris, C.; Tagliabue, A.; Veggiotti, P. (2019): Overall cognitive profiles in patients with GLUT1 Deficiency Syndrome. *Brain and Behavior*.;9:e01224.

De Brito Sanchez, G.; Ortigao-Farias, J. R.; Gauthier, M.; Liu, F., Giurfa, M. (2007): Taste perception in honeybees: just a taste of honey? *Arthropod-Plant Interactions*. 1:69–76.

Decourtye, A.; Armengaud, C.; Renou, M.; Devillers, J.; Cluzeau, S.; Gauthier, M.; Pham-Delègue, M-H (2004): Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 78:83-92.

Decourtye, A.; Armengaud, C.; Michel Renou, M.; Devillers, J.; Cluzeau, S.; M.; Pham-Delègue, M. (2004): Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 78:83–92.

Decourtye A, Tisseur M, Tase´ı J-N, Pham-Dele`gue M-H (2005): Toxicite´ et risques lie´s a` l'emploi de pesticides chez les pollinisateurs: cas de l'abeille domestique. Regnault-Roger C, editor. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Paris: Tec et Doc Lavoisier. pp. 283–299.

Démares, F. J.; Crous, K. L.; Pirk, C. W. W.; Nicolson, S. W.; Human, H. (2016): Sucrose Sensitivity of Honey Bees Is Differently Affected by Dietary Protein and a Neonicotinoid Pesticide. *PLoS ONE*. 11(6): e0156584.

Deng, D.; Xu, C.; Sun, P.; Wu, J.; Yan, C.; Hu, M.; Yan, N. (2015): Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature*. 510:121-126.

Dimitrakoudis, D.; Vranic, M.; Klip, A. (1992): Effects of hyperglycemia on glucose transporters of the muscle: use of the renal glucose reabsorption inhibitor phlorizin to control glycemia. *The journal of the American Society of Nephrology*. 3(5):1078-1091.

Di Pasquale, G.; Salignon, M.; Le Conte, Y.; Belzunces, L.P.; Decourtye, A.; Kretzschmar, A.; Suchail, S.; Brunett, J-L; Alaux, C. (2013): Influence of Pollen

Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS ONE*. 8(8):e72016.

Di Prisco, G.; Cavaliere, V.; Annosciac, D.; Varricchioa, P.; Caprioa, E.; Nazzi, F.; Gargiulo, G.; Pennacchio, F. (2013): Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *PNAS*. 110:46, 18466–18471.

Duelli, R.; Kuschinsky, W. (2001): Brain Glucose Transporters: Relationship to Local Energy Demand. *News Physiol. Sci.* 16:71-76.

Eaton, S.; Bartlett, K.; Pourfarzam, M. (1996): Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem. J.* 320:345–357.

Eiri, D. M.; Nieh, J. C. (2012): A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *The Journal of Experimental Biology*. 215, 2022-2029.

El Hassani, A., K.; Matthieu Dacher, M.; Gary, V.; Lambin, M.; Gauthier, M.; Armengaud, C. (2008): Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee (*Apis mellifera*). *Arch Environ Contam Toxicol*. 54:653–661.

Escher, S. A.; Rasmuson-Lestander, A. (1999): The *Drosophila* glucose transporter gene: cDNA sequence, phylogenetic comparisons, analysis of functional sites and secondary structures. *Hereditas*. 130:95-103.

Friedman, J. E.; Dudek, R. W.; Whitehead, D. S.; Downes, D. L.; Frisell, W. R.; Caro, J. F.; Dohm, G. L. (1991): Immunolocalization of Glucose Transporter GLUT4 within Human Skeletal muscle. *Diabetes*. 40:150-154.

Gumà, A.; Zierath, J. R.; Wallberg-Henriksson, Klip, A. (1995): Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Endocrinology and Metabolism*. 268(4):E613-E622.

Gutierrez, E.; Wiggins, D.; Fielding, B.; Gould, A.P. (2007): Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature*. 445:275-280.

Hardie, D.G.; Ross, F.A.; Hawley, S.A. (2017): AMPK – a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*13(4):251-262.

Hasselbalch, S. G.; Knudsen, G. M.; Jakobsen, J.; Hageman, L. P.; Holm, S.; Paulson, O. B. (1995): Blood-brain barrier permeability of glucose and ketone bodies during short-term starvation in humans. *American Journal of Physiology*. 268(6):E1161-E1166.

Haupt, S.S. (2004): Antennal sucrose perception in the honey bee (*Apis mellifera* L.): behaviour and electrophysiology. *J Comp Physiol A*. 190: 735–745.

Henry, M.; Béguin, M.; Requier, R.; Rollin, O.; Odoux, J-F.; Aupinel, P., Aptel, J.; Tchamitchian, S.; Decourtye, A. (2012): A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *SCIENCE*. 336: 348-350.

Huang, S.; Czech, M. P. (2007): The GLUT4 Glucose transporter. *Cell Metabolism*. 5:237-252.

Ihle, K.E.; Baker, N.A.; Amdam, G.V. (2014): Insulin-like peptide response to nutritional input in honey bee workers. *Journal of Insect Physiology*. 69:49-55.

Illsley, N. P. (2000): Glucose Transporters in the Human Placenta. *Placenta*. 21:14-22.

Infante-Garcia, C.; Garcia-Alloza, M. (2019): Review of the Effect of Natural Compounds and Extracts on Neurodegeneration in Animal Models of Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 2533

Jagust, W. J.; Seab, P.; Huesman, R. H.; Valk, P. E.; Mathis, C. A.; Reed, B. R.; Coxson, P. G.; Budinger, T. F. (1991): Diminished Glucose Transport in Alzheimer's Disease: Dynamic PET Studies. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 11:323-330.

Jimenez, D. R.; Gilliam, M. (1990): Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. *Cell and Tissue Research*. 261:431-443.

Johnson, E.C.; Kazgan, N.; Bretz, C.A.; Lawrence, J.F.; Hector, C.E.; Worthen, R.J.; Onyenwoke, R.; Brenman, J.E. (2010): Altered Metabolism and Persistent Starvation Behaviors Caused by Reduced AMPK Function in *Drosophila*. *PLoS ONE*. 5(9):e12799.

Joost, H-G; Bell, G. I.; Best, J. D.; Birnbaum, M. J.; Charron, M. J.; Chen, Y. T.; Doege, H.; James, D. E.; Lodish, H. F.; Moley, K. H.; Moley, J. F.; Mueckler, M.; Rogers, S.; Schürmann, A.; Seino, S.; Thorens, B. (2001): Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282:E974–E976.

Jung, J. W.; Park, K. W.; Ahn, Y-J.; Kwon, H. W. (2015): Functional characterization of sugar receptors in the western honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 18:19-26.

Kent, L. B.; Robertson, H. M. (2009): Evolution of sugar receptors in insects. *BMC Evolutionary Biology*. 9:41.

Khalil, S. R.; Awad, A.; Mohammed, H. H.; Nassan, M. A. (2017): Imidacloprid insecticide exposure induces stress and disrupts glucose homeostasis in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 55:165-174.

Kim, J.; Park, Y.; Yoon, K. S.; Clark, J. M.; Park, Y. (2013): Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, induces insulin resistance. *The Journal of Toxicological Sciences*. 38(5):655-660.

Klip, A.; McGraw, T. E.; James, D. E. (2019): Thirty sweet years of GLUT4. *J.Biol.Chem*. 294(30):11369–11381.

Koch, H.; Weber, Y. G. (2019): The glucose transporter type 1 (Glut1) syndromes. *Epilepsy & Behavior*. 91: 90-93.

Krupke, C.H.; Hunt, G.H.; Eitzer, B.D.; Andino, G.; Given, K. (2012): Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PLoS ONE*. 7(1): e29268. doi:10.1371/journal.pone.0029268.

Kumagai, A.K.; Kang, Y-S.; Boado, R. J.; Pardrige, W.M. (1995): Upregulation of Blood-Brain Barrier GLUT1 Glucose Transporter Protein and mRNA in Experimental Chronic Hypoglycemia. *Diabetes*. 44(12):1399-1404.

Leto, D.; Saltiel, A. R. (2012): Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Molecular Cell Biology*. 13:383-397.

Lundin, O.; Rundlöf, M.; Smith, H. G.; Fries, I.; Bommarco, R. (2015): Neonicotinoid Insecticides and Their Impacts on Bees: A Systematic Review of Research Approaches and Identification of Knowledge Gaps. *PLOS ONE*. DOI:10.1371/journal.pone.0136928.

Lundsgaard, E.; Nielsen, N. A.; Orskov, S. L. (1939): On the possibility of demonstrating an effect of insulin on isolated mammalian liver. *Skandinavisches Archiv für Physiologie*. 81:11-19.

Maher, F.; Vannucci, S. J.; Simpson, I. A. (1994): Glucose transporter proteins in brain. *The FASEB Journal*. 8:1003-1011.

Mason, R.; Henk Tennekes, H.; Sánchez-Bayo, F.; Jepsen, P. U. (2013): Immune Suppression by Neonicotinoid Insecticides at the Root of Global Wildlife Declines. *Journal of Environmental Immunology and Toxicology*; 1:3-12.

Minnich, D.E. (1932): The contact chemoreceptors of the honey bee , *Apis mellifera* Linn. *J. exp. Zool*. 61:375-393.

Mueckler, M.; Caruso, C.; Baldwin, S.A.; Panico, M.; Blench, I.; Morris, H.R.; Allard, W.J.; Lienhard, G.E.; Lodish, H.F. (1985): Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. 229(4717):941-945.

Mueckler, M. (1990): Family of Glucose Transporter Genes. Implications for Glucose Homeostasis and Diabetes. *Diabetes*. 39:6-11.

Mueckler, M: (1993): Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem*. 219:713-725.

Mueckler, M.; Makepeace, C. (2009): Model of the Exofacial Substrate-Binding Site and Helical Folding of the Human Glut1 Glucose Transporter Based on Scanning Mutagenesis. *Biochemistry*. 48:5934-5942.

Nicodemo, D.; Maioli, M. A.; Medeiros, H. C. D.; Guelfi, M.; Balieira, K. V. B.; De Jong, D.; Mingatto, F. E. (2014): Fipronil and Imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33(9):2070–2075.

Nilsen, K-A.; Ihle, K. E.; Frederick, K.; Fondrk, M.K.; Smedal, B.; Hartfelder, K.; Amdam, G.V. (2011): Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. *The Journal of Experimental Biology*. 214:1488-1497.

Paes de Oliveira, V.T.; da Cruz-Landim, C. (2003): Morphology and function of insect fat body cells: A Review. *BIOCIÊNCIAS*. 11(2):195-205.

Park, Y.; Kim, Y.; Kim, J.; Yoon, K. S.; Clark, J.; Lee, J.; Park, Y. (2013): Imidacloprid, a Neonicotinoid Insecticide, Potentiates Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Agric. Food Chem*. 61:255–259.

Price, D. R. G.; Wilkinson, H. S.; Gatehouse, J. A. (2007): Functional expression and characterisation of a gut facilitative glucose transporter, NIHT1, from the phloemfeeding insect *Nilaparvata lugens* (rice brown planthopper). *Insect Biochem Mol Biol*. 37(11):1138–1148.

Ramirez-Romero, R.; Chaufaux, J.; Pham-Delègue, M-H. (2005): Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Adipologie*. 36(4):601-611.

Rether, K. (2012): Die Regulation der Hämolymphe-Glucose und ihre Bedeutung für die sensorische Sensitivität sowie das appetitive Lernen und Gedächtnis der Honigbiene (*Apis mellifera*). Dissertation.

Rinderer, T.E.; Rothenbuhler, W.C. (1974): The Influence of Pollen in the Susceptibility of Honey Bee Larvae to *Bacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 23:347-350.

Rinderer, T.E.; Elliott, K.D. (1977): Worker Honey Bee Response to Infection with *Nosema apis*: Influence of Diet. *Journal of Economic Entomology*. 70(4):431-433.

Roces, F.; Blatt, J. (1999): Haemolymph sugars and the control of the proventriculus in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*. 45:221-229.

Rolfe, D. F. S.; Brown, G. C. (1997): Cellular Energy Utilization and Molecular Origin of Standard Metabolic Rate in Mammals. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*. 77(3):731-758.

Rutter, G.A.; Da Silva Xavier, G.; Leclerc, I. (2003): Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem.J.* 375:1-16.

Scheepers, A.; Joost, H-G; Schürmann, A. (2004): The Glucose Transporter Families SGLT and GLUT: Molecular Basis of Normal and Aberrant Function. *JOURNAL OF PARENTERAL AND ENTERAL NUTRITION*. 28(5):364-371.

Simpson, I. A.; Appel, N. M.; Hokari, M.; Oki, J.; Holman, G. D.; Maher, F.; Koehler-Stec, E. M.; Vannucci, S. J.; Smith, Q. R. (1999): Blood-Brain Barrier Glucose Transporter: Effects of Hypo- and Hyperglycemia Revisited. *Journal of Neurochemistry*. 72:238-247.

Snodgrass, R. E. (1984): Anatomy of the honey bee. Comstock Pub. Associates (Ithaca).

Sun, Q.; Xiao, X.; Kim, Y.; Kim, D.; Yoon, K. S.; Clark, J. M.; Park, Y. (2016): Imidacloprid Promotes High Fat Diet-Induced Adiposity and Insulin Resistance in Male C57BL/6J Mice. *J. Agric. Food Chem.* 64:9293-9306.

Taleux, N.; De Potter, I.; Deansart, C.; Lacraz, G.; Favier, R.; Leverve, X.M.; Hue, L.; Guigas, B. (2008): Lack of starvation-induced activation of AMP-activated protein kinase in the hypothalamus of the Lou/C rats resistant to obesity. *International Journal of Obesity*. 32:639-647.

Terra, W. R.; Ferreira, C.; de Bianchi, A. G. (1979): Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology*. 25(6):487-494.

Terra, W. R.; Ferreira, C. (1994): Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B:1-62.

Terra, W. R. (2001): The Origin and Functions of the Insect Peritrophic Membrane and Peritrophic Gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 47:47-61.

Thorens, B.; Mueckler, M. (2009): Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298:E141–E145.

Tison, L.; Hahn, M.-L.; Holtz, S.; Rößner, A.; Greggers, U.; Bischoff, G.; Menzel, R. (2016): Honey Bees' Behavior Is Impaired by Chronic Exposure to the Neonicotinoid Thiacloprid in the Field. *Environ. Sci. Technol.* 50, 7218–7227.

Tomizawa, M. und Casida, J. E. (2005): NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45:247–68.

Tosi, S.; Burgio, G.; Nieh, J. C. (2016): A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. *Scientific Reports* 7: 1201 DOI:10.1038/s41598-017-01361-8.

Vittori, A.; Breda, C.; Repici, M.; Orth, M.; Roos, R. A. C.; Tiago F. Outeiro, T. F.; Giorgini, F.; Hollox, E. J. (2014): Copy-number variation of the neuronal glucose transporter gene *SLC2A3* and age of onset in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*. 23(12): 3129–3137.

Waché, B. (2016): Einfluss von subletalen Dosen des Neonicotinoid Metabolites Acetamiprid-N-Desmethyl auf Lernen, Gedächtnisbildung und Histonmodifikationen der Honigbiene. Bachelorarbeit an der Universität des Saarlandes.

Wahl, O.; Ulm, K. (1983): Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Oecologia*. 59:106-128.

Wang, D.; Pascual, J. M.; De Vivo, D. (2002): Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome. *GeneReviews*.

Wang, M.; Wang, C. (1993): Characterization of glucose transport system in *Drosophila* Kc cells. *FEBS Lett.* 317(3):241-244.

Whitehead, A. T.; Larsen, J. R. (1976): Electrophysiological responses of galeal contact chemoreceptors of *Apis mellifera* to selected sugar and electrolytes. *J. Insect Physiol.* 22: 1609-1616.

Wood, I. S.; Trayhurn, P. (2003): Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition.* 89:3–9.

Yang, E. C.; Chuang, C.; Chen, Y. L.; Chang, L. H. (2008): Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 101(6): 1743-1748.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bindung von Neonicotinoiden (in diesem Fall Imidacloprid) an den nAChR von a) Insekten und b) Säugetieren. Aufgrund der fehlenden Ammoniakgruppe im nAChR der Säugetiere kommt es hier zu keiner Bindung (Tomizawa und Casina, 2005; modifiziert)..... 4

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Insulin vermittelten Translokation von GLUT4. a) unter natürlichen Bedingungen: Durch die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor (IR) wird eine Phosphorylierungskaskade über die Insulinrezeptor Substrate (IRS) in Gang gesetzt. Durch die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) wird Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) umgesetzt. Dadurch wird wiederum die Phosphoinositide-abhängige Kinase 1 (PDK1) aktiviert, was zur Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT) führt. Am Ende dieser Kaskade werden die GLUT4 Speichervesikel (GSV) transloziert und GLUT4 wird in die Plasmamembran eingebaut. Welche Rolle die AMP-abhängige Kinase (AMPK) dabei spielt, gilt es noch aufzuklären. b) unter Einfluss von Imidacloprid wird die Phosphorylierung der AKT verhindert, dadurch werden weniger GLUT4 in die Membran eingebaut..... 10

Abbildung 3: Vermutliche sekundäre Struktur der Glucosetransporter Klasse I und II. CB: Cytochalasin B. Die Glycosylierung ist von großer Bedeutung beim Transport der Glucose, da sie die Struktur der Transporter aufrechterhält. (Modifiziert nach Augustin und Mayoux, 2014)..... 12

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Verdauungstraktes der Honigbiene (modifiziert nach Terra und Ferreira, 1994). Vorderdarm: bestehend aus Kropf und Proventriculus; Mitteldarm: bestehend aus Ventrikel und peritrophischer Membran und Enddarm: bestehend aus Ileum, Rektum und Malpighi Gefäßen. 17

Abbildung 5: Zeitstrahl zum Ablauf der Hämolymp-*Glucose*-Messung..... 30

Abbildung 6: Überblick auf das Bienehirn nach Öffnen der Kopfkapsel..... 33

Abbildung 7: Sterberate nach Behandlung der Bienen mit a) 1,2 ng/Biene, b) 1 ng/Biene, c) 0,6 ng/Biene und d) 0,3 ng/Biene Thiamethoxam, 2 h und 24 h nach Fütterung. weiße Balken: Kontrollgruppe, graue Balken: mit Thiamethoxam behandelte Bienen. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken. *: $p < 0,05$, χ^2 -Test. . 40

Abbildung 8: Test auf Zuckerwasserempfindlichkeit nach Behandlung mit 0,6 ng/Biene und 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Dargestellt ist der mittlere Score vor, 2 h und 24 h nach der Behandlung mit a) 0,6 ng/Biene und b) 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. weiße Balken: Kontrollgruppe, graue Balken: mit Thiamethoxam behandelte Bienen. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken. * $p < 0,05$ Whitney-Mann-U-Test. .. 42

Abbildung 9: Test auf Zuckerwasserempfindlichkeit nach Behandlung mit 0,6 ng/Biene und 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Dargestellt ist der PER (Proboscis Extension Response) in Prozent vor, 2 h und 24 h nach der Behandlung mit a) 0,6 ng/Biene und b) 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. weiße Balken: Kontrollgruppe, graue Balken: mit Thiamethoxam behandelte Bienen. Die Anzahl der getesteten Tiere ist der Legende zu entnehmen..... 44

Abbildung 10: Relativer Zuckerkonsum pro Biene pro Stunde \pm Standardabweichung; a): In den Zeitfenstern 0-24 h (blaue Balken), 24-48 h (rote Balken) und 48-72 h (grüne Balken) nach Behandlung mit 0,0045 % DMSO / 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant; $p < 0,0016$, korrigiert nach Bonferroni. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Futtermenge der einzelnen Tage auf die Futtermenge normiert, die über 72 h konsumiert wurde. b): relativer Zuckerkonsum pro Biene pro Stunde \pm Standardabweichung über 72 h; weiße Balken: Kontrollgruppe, graue Balken: mit Thiamethoxam behandelte Bienen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde hier auf die Kontrollgruppe normiert. Die Anzahl der durchgeführten Experimente steht über den Balken..... 47

Abbildung 11: Veränderung des Hämolymphe-Glucosespiegels 3 h und 24 h nach der Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. grauer Balken: Behandlung mit Thiamethoxam; weißer Balken: Kontrollgruppe. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken; *: $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test. 50

Abbildung 12: 2-NBDG Messung in der Hämolymphe 30 min, 60 min und 180 min nach der Behandlung mit 2-NBDG. grauer Balken: Behandlung mit 2-NBDG; weißer Balken: Kontrollgruppe. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken. 52

Abbildung 13: 2-NBDG Messung in der Hämolymphe 30 min und 180 min nach der Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. grauer Balken: Behandlung mit Thiamethoxam; weißer Balken: Kontrollgruppe. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken. *: $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test. 53

- Abbildung 14:** Kropf und Mitteldarm der Arbeiterin ohne vorherige Fütterung mit 2-NBDG, 30 min und 3 h nach der Fütterung mit 2-NBDG. Um die Wirkung von Thiamethoxam auf die Funktionalität des Schließmuskels zwischen Kropf und Mitteldarm (Proventriculus; nicht zu sehen) zu untersuchen, wurde nach der Fütterung mit 2-NBDG sowohl das Fluoreszenzsignal des Kropfes als auch dasjenige des Mitteldarms gemessen und dividiert (Mitteldarm/Kropf = Übergangsrate)..... 55
- Abbildung 15:** Messung der Übergangsrate (Fluoreszenzsignal Mitteldarm geteilt durch Fluoreszenzsignal Kropf) von 2-NBDG vom Kropf zum Mitteldarm mit Hilfe von 2-NBDG. Die Messung erfolgte 30 min und 180 min nach der Fütterung von 2-NBDG bzw. Kontrolllösung (weißer Balken) bzw. 2-NBDG und 0,3 ng/Biene Thiamethoxam (grauer Balken). Die Anzahl der getesteten Tiere ist den Balken zu entnehmen. 57
- Abbildung 16:** Messung der Durchlässigkeit des Mitteldarms mit Hilfe von 2-NBDG, sowohl 30 min und 180 min nach der Fütterung mit 2-NBDG (graue Balken) oder der Kontrolllösung (weiße Balken), als auch nach Ausquetschen des gesamten Darminhalts. Anzahl der Messung steht über den Balken. *: $p < 0,05$, T-Test..... 59
- Abbildung 17:** Messung der Durchlässigkeit des Mitteldarms mit Hilfe von 2-NBDG, sowohl 30 min als auch 3 h nach der Fütterung mit 2-NBDG bzw. Kontrolllösung (weiße Balken) bzw. 0,3 ng/Biene Thiamethoxam (graue Balken), als auch nach Ausquetschen des gesamten Darminhalts. Zum Vergleich wurden die Signal nach 30 min und nach 3 h auf den gesamten Darminhalt (ausgequetscht) bezogen. Anzahl der Messungen steht über den Balken. 60
- Abbildung 18:** Messung der Durchlässigkeit des Mitteldarms der Sommerbienen (weißer Balken) und der Winterbienen (grauer Balken) mit Hilfe von 2-NBDG, sowohl 30 min als auch 3 h nach der Fütterung mit 2-NBDG, als auch nach Ausquetschen des gesamten Darminhalts. Anzahl der Messungen steht über den Balken. *: $p < 0,05$; TTest. 60
- Abbildung 19:** Relative Proteinmenge der beiden GLUT 1 Isoformen a und b und R1H7 bzw. des acetylierten Tubulins, gemessen 3 h nach der Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. grauer Balken: Behandlung mit Thiamethoxam; weißer Balken: Kontrollgruppe. a): Messung von Gehirnhomogenaten; b): Messung von Abdomenhomogenaten; c): Messung von Mitteldarmhomogenaten. Die Anzahl der getesteten Tiere ist Balken zu entnehmen. *: $p < 0,05$, TTest. 63

Abbildung 20: Relative Proteinmenge der beiden GLUT 1 Isoformen a und b und R1H7 bzw. des acetylierten Tubulins, gemessen 24 h nach der Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. grauer Balken: Behandlung mit Thiamethoxam; weißer Balken: Kontrollgruppe. a: Messung von Gehirnhomogenaten; b: Messung von Abdomenhomogenaten; c: Messung von Mitteldarmhomogenaten. Die Anzahl der getesteten Tiere ist Balken zu entnehmen. *: $p < 0,05$, TTest. 65

Abbildung 21: Dot Blot von homogenisiertem Darmgewebe, entweder mit SDS denaturiert oder nicht mit SDS denaturiert. Detektiert wurden die beiden Isoformen GLUT 1a und GLUT 1b. Die Graphen zeigen die zugehörigen Steigungen der Konzentrationsreihen..... 67

Abbildung 22: Dot Blot von homogenisiertem Hirngewebe, mit SDS denaturiert oder unverarbeitet. Detektiert wurden die beiden Isoformen GLUT 1a und GLUT 1b. Die Graphen zeigen die zugehörigen Steigungen der Konzentrationsreihen..... 68

Abbildung 23: Relative mRNA Menge der beiden GLUT 1 Isoformen a und b, sowie des Elongationfaktor (EF1-alpha) 3 h nach der Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam in a) Gehirn, b) Abdomen und c) Mitteldarm. EF1-alpha diente als Referenzgen. Weiße Balken: Kontrollgruppe; Graue Balken: Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Die Anzahl der getesteten Tiere steht über den Balken. *: $p < 0,05$, TTest. 70

Abbildung 24: Auswirkung von Thiamethoxam auf die Histonmodifikationen H3 K4ac; H3 K9ac; H3 K18 me3 und H3 K27 me3 im Mitteldarm der Biene, a) 3 h und b) 24 h nach der Behandlung. Weiße Balken: Kontrollgruppe; Graue Balken: Behandlung mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Die Anzahl der Experimente steht über den Balken..... 72

Abbildung 25: Schematische Darstellung der Auswirkungen der oralen Gabe von 0,3 ng/Biene Thiamethoxam. Grüner Smiley: keine Auswirkungen; Roter Smiley: signifikante Effekte. 73

Abbildung 26: Schematische Darstellung der Effekte auf die „Glucose Zufuhr“ (grün) und die „Glucose Verbrauch“ (lila) mit möglichen Erklärungen für die gezeigten Effekt von Thiamethoxam auf den Hämolymp-Glucosespiegel der Biene. 77

Abbildung 27: Eine Verschiebung des ATP:AMP Verhältnisses hin zu AMP bewirkt die Aktivierung der AMPK. Dadurch werden anabole Prozesse wie Glykogensynthese, Gluconeogenese, Fettsäure- und Proteinsynthese gehemmt, wohingegen katabole

Prozesse wie Fettsäureaufnahme, Fettsäureoxidation, Glucoseaufnahme und Glycolyse angekurbelt werden. 85

Abbildung 28: Schematische Darstellung der möglichen Auswirkung von Thiamethoxam auf die Translokation der Glucosetransporter bei den Glucose Verbrauchern. Durch die Behandlung mit Thiamethoxam und des potentiell erhöhten Energiebedarfes durch Entgiftungsprozesse wird das ATP:AMP Verhältnis in Richtung AMP verschoben. Dies aktiviert die AMPK, welche ihrerseits durch die vermehrte Translokation der Glucosetransporter den Transport der Glucose aus der Hämolymphe steigert. Daraus resultiert ein rasch abfallender Hämolymphe-Glucosespiegel..... 87

Abbildung 29: Schematische Darstellung der hypothetischen Auswirkungen von Thiamethoxam auf die insulinvermittelte Translokation der Glucosetransporter. Diese Veränderung wirkt sich auf die Glucoseaufnahme in Gewebe/Zellen aus. Durch die Behandlung mit Thiamethoxam könnte vermehrt Insulin ausgeschüttet werden. Dadurch würden mehr Transporter in die Plasmamembran eingebaut, wodurch mehr Glucose aus der Hämolymphe aufgenommen würde und der der Hämolymphe-Glucosespiegel deutlich schneller sinken würde. Nach 24 h ist Thiamethoxam soweit metabolisiert, sodass sich hier kein Unterschied mehr zeigt. *Iip*: Insulin ähnliche Peptide; *InR*: Insulinrezeptor..... 89

Abbildung 30: Schematische Darstellung der saisonalen Unterschiede. Im Winter könnten sich weniger Insulin ähnliche Peptide (*Iip*) in der Hämolymphe befinden. Dementsprechend könnte nicht auf den erhöhten Energiebedarf durch die Entgiftung reagiert werden und die Tiere zeigen eine erhöhte Sterberate. Im Sommer dagegen könnte aufgrund des erhöhten Vorkommens an *Iip* adäquat auf den erhöhten Energiebedarf reagiert werden. Hier überleben vergleichsweise mehr Tiere. 96

Tabelle 1: Sequenzen der in der in der real-time PCR verwendeten Primer..... 37

Tabelle 2: Fluoreszenzsignal des Verdauungstraktes (Kropf und Mitteldarm). Die Messungen erfolgten ohne vorherige Fütterung mit 2-NBDG (Hintergrund) und nach der Fütterung mit 2-NBDG. Verglichen wurden sowohl Kontrolltiere und mit 0,3 ng/Biene Thiamethoxam behandelte Tiere, 30 min und 3 h nach der Behandlung. Es wurden sowohl Sommer- als auch Winterbienen gemessen. Hellgrau hinterlegte Experimente

unterschieden sich nicht vom Hintergrund ($p > 0,00625$, T-Test, nach Bonferroni korrigiert). 56

Tabelle 3: Zusammenstellung der Unterschiede zwischen Sommerbienen und Winterbienen. Gezeigt sind sowohl Unterschiede bei unbehandelten als auch bei behandelten Tieren. a): Unterschiede, die bereits aus anderen Publikationen bekannt sind; b) Unterschiede, welche in dieser Dissertation gefunden wurden..... 90

Abkürzungsverzeichnis

2-NBDG	2-(N-(7-Nitrobenz-2oxa-1,3-diazol-4-yl)-Amino)-2-Deoxyglucose
ADP	Adenosindiphosphat
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid 1--D-Ribofuranosid
AKT	Proteinkinase B
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CB	Cytochalasin B
cDNA	copy-DNA, komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dT	Deoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1	alpha Elongationsfaktor 1 alpha
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
for	Forward-Primer
g	Gramm

Abkürzungsverzeichnis

Glut1 a	Glucosetransporter 1, Isoform a aus der Honigbiene
Glut1 b	Glucosetransporter 1, Isoform b aus der Honigbiene
GLUT	Glucosetransporter
GSV	Speichervesikel
H ₂ O	dest. destilliertes Wasser
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
ILP	Insulin-like Peptide, Insulinähnliches Hormon
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptor Substrate
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar, mol pro Liter
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	Phosphoinositide-abhängige Kinase 1

Abkürzungsverzeichnis

PER	Proboscis Extension Reflex, Rüsselreflex
PKA	Proteinkinase A
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase PKA Proteinkinase A
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
qPCR	quantitative Echtzeit PCR
R1H7	regulatorische Untereinheit der PKA Typ 2
rev	Reverse-Primer
RNA	Ribonucleinsäure
v/v	Volume per volume, Volumenprozent
w/v	Weight per volume, Gewichtsprozent
Z-Chem	Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes

Danksagung

An erster Stelle geht mein Dank an Herrn Professor Doktor Uli Müller, für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe dieses Projekt zu verwirklichen und für die motivierenden und inspirierenden Gespräche. Ich möchte Dir auch für die große Geduld danken, mit der du mir immer wieder geholfen und mich angespornt hast.

Ein weiteres, großes Dankeschön möchte ich Herrn Professor Doktor Uwe Walldorf für die Übernahme der Zweitkorrektur aussprechen.

Meinen Mitstreiterinnen Marie Luise Kümmel, Rebecca Kochems und Sandra Mühlenbacher, ebenso Janick Peter und Lina Bugaeva danke ich von Herzen für ihre Freundschaft. Vielen Dank für eure Unterstützung, die lieben Worte, das Korrekturlesen und natürlich fürs Amüsement. Ohne euch hätte ich die Zeit im Saarland vermutlich nur halb so gut überstanden.

Mein herzlichster Dank geht auch an Nina Walter. Danke dafür, dass du mir eine so gute Freundin bist und ich mit immer auf dich zählen kann.

Meiner Mutter Petra und meiner Schwester Janina, die Menschen, welche immer für mich da waren und mich immer unterstützt haben, gilt ein ganz besonderer Dank. Ohne euch wären weder mein Studium noch die Promotion möglich gewesen. Bedanken möchte ich mich auch bei Benno. Dein fröhliches Gemüt zaubert mir immer ein Lächeln ins Gesicht. Bleib wie du bist!

Und natürlich darf hier mein Specki nicht fehlen, ohne den ich nie da wäre, wo ich jetzt bin. Ich danke Dir für deine bedingungslose Freundschaft, dein wunderbares Wesen, deine Güte und deine Genügsamkeit. Du lehrst mich jeden Tag ein besserer Mensch zu sein.

„Dies ist ein Anti-Terror-Anschlag des Asozialen Netzwerks“ – Das Känguru

Lebenslauf und akademischer Werdegang

Name: Sonja Maria Dähn

Geburtstag: 21.12.1989

Geburtsort: Heidelberg

Schulbildung:

1997-2001: Theodor-Heuss-Grundschule Eppelheim

2001-2009: Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Eppelheim

Hochschulausbildung:

2013-2013: Studium der Biologie an der Universität Hohenheim mit Schwerpunkt Zoologie. Abschluss: Bachelor of Science mit Note 2,0. Thema Bachelorarbeit: „Intra- und interspezifische Konkurrenz bei den Erzwespen *Nasonia vitripennis* und *Dibrachys cavus*“. Betreuer: Prof. Dr. Johannes Steidle.

Juni 2016 bis August 2016: Auslandsaufenthalt an der Hebräischen Universität Jerusalem, Rechovot, Israel.

2013-2016: Studium der Biologie an der Universität Hohenheim mit Schwerpunkt Zoologie. Abschluss: Master of Science mit Note 1,5. Thema Masterarbeit: „Die Rolle von Endosymbionten als Isolationsbarriere bei verschiedenen Stämmen von *Nasonia vitripennis*“. Betreuer: Prof. Dr. Johannes Steidle.

2016: Beginn der Promotion am Institut für Zoologie und Physiologie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uli Müller.

2016-2019: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zoologie und Physiologie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken.

Publikationen und Tagungsbeiträge

Hötling, S.; Bittner, C.; Tamm, M.; Dähn, S.; Collatz, J.; Steidle, J.L.M.; Schulz, S. (2015): Identification of a Grain Beetle Macrolide Pheromone and Its Synthesis by Ring-Closing Metathesis Using a Terminal Alkyne. *Organic Letters*. 17(20):5004-5007.

125. Meeting der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Graz 2015: The role of endosymbionts as isolating barrier for *Nasonia* strains from different host habitats

28th Neurobiological Doctoral Students Workshop, Marburg 2017: Effects of Neonicotinoids on central aspects of metabolism

11th FENS Forum of Neuroscience, Berlin 2018: The Neonicotinoid Thiamethoxam affects glucose metabolism in honey bees

29th Neurobiological Doctoral Students Workshop, Berlin 2018: The honeybee glucose metabolism is affected by the neonicotinoid Thiamethoxam

12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen 2019: Energy metabolism in honey bees is affected by the neonicotinoid Thiamethoxam

30th Neurobiological Doctoral Students Workshop, Würzburg 2019: The neonicotinoid Thiamethoxam affects energy homeostasis in honey bees

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Ort, Datum

(Unterschrift)