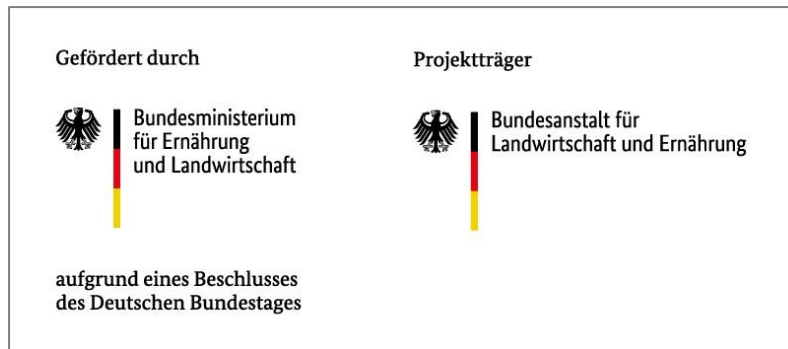




Gefördert durch Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines  
Beschlusses des Deutschen Bundestages

## EasyLife: Entwicklung eines Applikationsverfahrens zur systemischen Varroa-Bekämpfung mit Lithiumchlorid für Bienenvölker

### Teilprojekt B

**FKZ: 281C301B19**

Laufzeit: 01.02.2021 – 31.03.2024

Zuwendungsempfänger: siTOOLS Biotech GmbH  
Lochhamerstrasse 29A  
82152 Planegg



## I. Kurzbericht

### 1. Ursprüngliche Aufgabenstellung und Stand der Technik

Die systemische Gabe von Lithium Salzen an Bienenvölker (*Apis mellifera*) ist eine wirkungsvolle Maßnahme zur Bekämpfung der parasitischen Varroa-Milbe, *Varroa destructor*. In einer Vielzahl unabhängiger Experimente konnte bereits gezeigt werden, dass Lithium Chlorid, Lithium Citrat und andere Lithium Salze bei Konzentrationen zwischen 20 und 50mM mehr als 95% der Milben innerhalb weniger Tage abtöten können, ohne adulte Bienen zu schädigen. Allerdings zeigten Versuche in brütenden Völkern, dass die Bienenlarven schon bei niedrigen Konzentrationen in ihrer Entwicklung massiv gestört werden und die beschädigte Brut ausgeräumt wird. Die Schädigung der Brut ist die einzige Einschränkung der sonst idealen Eigenschaften von Lithium-Salzen zur Behandlung der Varroose. Aus diesem Grund sollten im Rahmen des Projektes einerseits Behandlungsmethoden für frei-fliegende Völker optimiert und andererseits die molekularen Ursachen der Wirksamkeit von Lithium unterschiedliche Organismen und Entwicklungsstadien untersucht werden. Während die Behandlungsmethoden vom Projektpartner an der Landesanstalt für Bienenkunde in Hohenheim optimiert wurden, fokussierte siTOOLS Biotech auf die molekularen Aspekte des Forschungsprojekts. Dabei sollten die molekularen Antworten auf die systemische Aufnahme von Lithium mittels Expressionsprofilierung analysiert werden. Zusätzlich sollte durch histologische Analysen die Toxizität auf Bienenlarven aufgeklärt werden.

### 2. Ablauf des Vorhabens

Zur Untersuchung des Expressionsprofils von *Varroa destructor* wurde RNA aus Milben präpariert, deren Wirts-Bienen sich ausschließlich von Lithium-haltigem Futter ernähren konnten. Die Genexpression wurde mit der von Milben verglichen, die auf unbehandelten Bienen parasitierten. Gegenüber den Kontrollmilben konnten unter anderem Veränderungen im Expressionsniveau von Genen mit Funktion in Kutikula und Chitin Biosynthese. Da vergleichbare Untersuchungen in Bienenvölkern schwer durchführbar sind, wurde auf ein geeignetes Tiermodell, *Drosophila melanogaster*, zugegriffen. Auch hier fanden sich Gene mit Funktion in die Kategorie Chitin Metabolismus und Entwicklung. Dies ist besonders interessant, weil es mit den beobachteten Phänotypen korreliert. Die histologischen Untersuchungen fokussierten auf Imaginalscheiben in Fliegenlarven, die nach Präparation mit fluoreszenten Markern behandelt und mikroskopisch analysiert wurden. Imaginalscheiben sind Strukturen in larvalem Gewebe die bereits die Anlagen für die späteren Organe und Körperteile der erwachsenen Fliege enthalten. Während der Larvalentwicklung bleiben sie in einer undifferenzierten Form, bis sie während der

Puppenentwicklung stark proliferieren und sich differenzieren. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Imaginalscheiben aus behandelten und unbehandelten Larven ergaben aber keine weiteren Aufschlüsse. Darüber hinaus wurden weitere Experimente an Fruchtfliegen durchgeführt: Die Versuche zeigten, dass die systemische Gabe von Lithium in Konzentrationen zwischen 10 und 20 mM zu massiven Verzögerungen der Larvalentwicklung führt. Ebenso wie in Bienen weisen adulte Fliegen, die in Gegenwart von Lithium die Larvalentwicklung und das Puppenstadium durchliefen, keine phänotypischen Veränderungen. Ebenso stellte sich heraus, dass adulten Fruchtfliegen Lithium in den genannten Konzentrationen gut tolerieren konnten. Entsprechend sind trotz großer evolutiver Distanz Ähnlichkeiten im Ansprechverhalten auf Lithium von Bienen und Fliegen vorhanden.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass Lithium bereits Embryonen (Eier) schädigen kann. Bislang war davon ausgegangen worden, dass das Ei der Fruchtfliege von teratogenen Giften nicht geschädigt wird. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Lithium aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften in den Embryo eindringen kann und die Schlüpfrate der ersten Instar-Larve dosis-abhängig verringert. Konzentrationen von mehr als 22 mM LiCl im Nährmedium unterdrückten das Schlüpfen von Larven vollständig. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass Verlangsamung der Larvalentwicklung bereits bei 5mM Lithium Chlorid zu beobachten ist. 20mM LiCl erlaubte zwar noch die Entwicklung weniger Larven, doch entwickelten sich daraus keine adulten Fliegen mehr. Anhand lichtmikroskopischer Beobachtungen der Lithium-behandelten Larven konnten komplexe Veränderungen gegenüber unbehandelten Fliegen-Larven festgestellt werden. Dies umfasst den Zeitpunkt von Häutungen, Größenwachstum aber auch morphologische Veränderungen, zB in der Ausbildung der lateralen Spiracles. Bei Bienen sind bereits bei Konzentrationen von weniger als 2mM massive Brutschäden zu beobachten. Allerdings wurde weder an Bienen- noch an Fliegen Larven die Exposition und die Menge an aufgenommenem Lithium quantifiziert. Für Bienen wurde beobachtet, dass bestimmte Stadien der Larval-Entwicklung besonders empfindlich auf Lithium reagieren. Untersuchungen an Fliegen-Larven zeigen aber, dass die Konzentration und die Dauer der Lithiumexposition, nicht aber der Zeitpunkt der Gabe entscheidend für die Toxizität von Lithium entscheidend sind. Eine wesentliche Erkenntnis ergab sich aus der Beobachtung vieler Larven bei unterschiedlichen Lithium Konzentrationen. Hier zeigte sich, dass bei steigenden Lithium Konzentrationen die individuellen Reaktionen auf Lithium im Futterteig stärker divergierten: Während einige individuelle Larven nur marginal langsamer wuchsen und in einem nur geringfügig verlängerten Zeitraum die Größe von unbehandelten Larven erreichten um sich dann erfolgreich zu verpuppen, verblieben andere Individuen in frühen Larval-Stadien und zeigten kaum Zuwachs an Größe oder Gewicht. Offensichtlich bestehen also individuelle Unterschiede im Ansprechverhalten

auf Lithium, die bei erhöhten Konzentrationen zunehmend deutlich sichtbar werden. Wenn diese Unterschiede auf genetischen Ursachen beruhen, sollten diese in mehreren Generationen anzureichern sein. In der Tat konnten wir nach mehreren Generationen auf Nährmedium mit 17 mM Lithium Chlorid eine Adaptation feststellen. Nach 10 Generationen auf Lithium-haltigem Nährmedium konnte eine Erhöhung des Bruterfolgs und eine Verringerung der Entwicklungsverzögerung gegenüber nicht-adaptierten Fliegen-Larven gezeigt werden

### **3. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Zur Untersuchung der Toxizität von Lithium auf die Entwicklung von Bienenlarven ist die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ein geeigneter Modellorganismus. Mit steigenden Lithium-Konzentrationen im Futterteig verzögert sich die Entwicklung zunehmend und das Wachstum der Larven wird teilweise massiv gehemmt. Aus Expressionsprofilierungen ergaben sich Lithium-abhängigen Veränderungen in Chitin- und Kutikula Stoffwechsel. Hinweise auf eine Beteiligung der Imaginalscheiben ergaben sich nicht. Die Untersuchungen an Fruchtfliegen wurden ermöglicht durch die großzügige Bereitstellung von Laborfläche und Infrastruktur am Biozentrum der LMU, München durch Herrn Prof. N. Gompel.

## II. Eingehende Darstellung der durchgeführten Arbeiten

### 1) Durchgeführten Experimente im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung

#### **Arbeitspaket 5: Molekulare Untersuchung der Effekte von Lithium auf Varroa Milben, Bienenlarven sowie adulte Bienen durch genomweite Expressionsanalyse**

Ziel der Arbeiten in diesem Arbeitspaket war ein verbessertes Verständnis der Wirksamkeit von Lithium auf Bienen und Varroa-Milben. Aufgrund des lückenhaften Verständnisses der Wirkungsweise von Lithium auf die unterschiedlichen Organismen wurde ein unvoreingenommenes und nicht Hypothesen-basiertes Vorgehen für die Untersuchung ausgewählt. Entsprechend sollte die Dosis-abhängige Änderung der Expressionsprofile in Bienen, Bienenlarven und Milben mittels Expressionsprofilierung analysiert werden. Dazu sollten RNA-Proben vorbereitet, RNA-Seq Bibliotheken hergestellt und die Werkzeuge zur bioinformatischen Analyse etabliert werden. Nach Durchführung der Expressionsanalyse sollten die deregulierten Gene orthogonal validiert werden.

#### Expressionsprofilierung von Lithium-behandelten Varroa Milben

Phoretische Varroa Milben auf Bienen, denen nur Lithium-haltiges Futter zur Verfügung stand wurden vom akademischen Partner aus Hohenheim in Ethanol geschickt und dann bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufgehoben. Auf diese Weise konnte die RNA am besten vor Abbau geschützt werden. Die RNA wurde mit dem RNA-Extraktionskit von Machery und Nagel präpariert und zu RNA Seq-Genbibliotheken weiter prozessiert. Insgesamt wurden 4 Kontroll-Proben von unbehandelten und 4 Proben von behandelten Milben sequenziert. 90% der Reads entsprachen Genen aus dem annotierten Varroa-Genom, lediglich eine Kontroll-Probe wies Sequenzen aus dem Deformed Wing Virus (DWV) auf, das von Varroa Milben übertragen wird. Der Vergleich der verschiedenen Proben ergab, dass die Kontrollen in ihren Expressionsmustern stärker divergierten als die Kontrollen verglichen mit den behandelten Proben. Entsprechend sind die so erhaltenen Sequenzdaten nur eingeschränkt nutzbar. Dennoch sollen hier die signifikant deregulierten Transkripte angesprochen werden, die funktionellen Gruppen zugeordnet werden können und auch in den Sequenzierungen der anderen Organismen dereguliert waren.

Gene mit erhöhten Expressionsniveau: 61 Gene wurden als höher exprimiert gegenüber der Kontrolle identifiziert. 17 dieser Gene kodierten für ein unbekanntes Protein, in der zweitgrößten Familie fanden sich 15 Gene mit Funktion in der Biogenese der Cuticula.

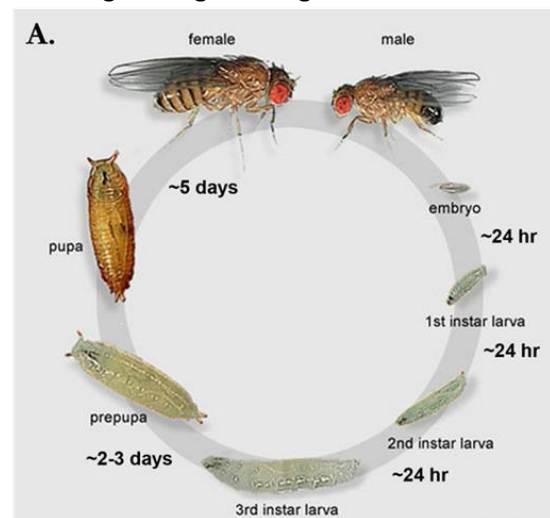
Gene mit niedrigerem Expressionsniveau: Nur 11 Transkripte wurden gegenüber der Kontrolle signifikant seltener gefunden. Neben Genen die für Proteine mit unbekannter Funktion kodieren handelt es sich um das Gen Vitellogenin, ein Gen mit Funktion im Fettsäure Stoffwechsel, ein

Homeobox-Gen, das in der Entwicklung eine Rolle spielt, Histon H2B und eine cAMP abhängige Kinase.

### Expressionsanalyse von Lithium behandelten Honigbienen und Sequenzvergleich mit dem annotierten Bienenengenom

Um zu untersuchen warum adulte Bienen anders als Varroa Milben keinen starken Phänotyp nach Fütterung von Zuckerwasser mit 25mM LiCl entwickeln wurden auch an adulten *Apis mellifera* Arbeiterinnen Expressionsprofile erhoben. Hier ergaben sich Verschiebungen in den Expressionsprofilen gegenüber unbehandelten Bienen in nur 37 Transkripten, wobei 23 Gene über- und 14 Gene unterexprimiert vorlagen. Nur 2 der identifizierten Gene hatten eine Funktion in der Cuticula Biosynthese. Grundsätzlich erwies sich sowohl die genetischen als auch die organismischen Fragestellungen als technisch schwer und aufwendig umsetzbar. So ist durch das komplexe Verhalten von Honigbienen als staatenbildende Insekten mit unterschiedlichen Aufgaben im Volk die Gleichverteilung von Lithium in der Kolonie schwer sicher zu stellen. Honigbienen sind nur für eine gewisse Zeit im Jahr aktiv und schränken die Möglichkeiten für Untersuchungen weiter ein. Entsprechend wurde nach einem Modellorganismus gesucht der einerseits leicht handhabbar ist, andererseits genetisch gut verstanden und annotiert ist und vor allem auf die Fütterung mit Lithium in vergleichbarer Weise reagiert.

In Hinsicht auf die beobachteten Auf die systemische Verabreichung von Lithiumsalzen entsprechen sich Fliegen und Bienen in bemerkenswerter Weise: Beide zeigen einen binären Phänotyp, in beiden Fällen tolerieren adulte Insekten Lithium, während Larven maßgeblich geschädigt werden und der Konzentrationsbereich in dem Bienen- und Fliegenlarven mit Verlangsamung und Verkümmern reagieren überschneiden sich im niedrig nanomolaren Konzentrationsbereich. Bei Bienen sind bereits bei Konzentrationen von weniger als 2mM massive Brutschäden zu beobachten. Entsprechend wurden die Auswirkungen von Lithium auf die Larvalentwicklung von Larven der Fruchtfliegen (Abbildung 1) eingehend studiert, um anschließend Rückschlüsse auf die Unverträglichkeit von Bienenlarven zu erlauben. Parallel zu den Testungen von Lithium Chlorid auf die Entwicklung von Fliegenlarven sowie



**Abbildung 1:** Lebenszyklus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* mit Embryo (Ei), Instar Larven und Verpuppung. Der gesamte Verlauf bis zum Schlüpfen findet innerhalb von 11- 12 Tagen statt.

dessen Verträglichkeit von adulten Fliegen wurden auch an adulten Fliegen Expressionsprofilierungs-Experimente durchgeführt.

*Drosophila melanogaster* ist ein geeigneter Modell-Organismus um die Verträglichkeit von Lithium auf adulte Bienen und Bienenlarven zu untersuchen

In Honigbienen zeigt sich die hohe Wirksamkeit unterschiedlicher Lithium Salze in einem Konzentrationsbereich von 20 - 50 mM bezogen auf die Konzentration der gelösten Lithium Ionen. Die Untersuchungen ergaben auch, dass adulte Bienen Lithium auch in höheren Konzentrationen gut tolerieren und erst bei Dauerfütterung eine Verkürzung der Lebensdauer beobachtet werden kann. Da Lithium seine akarizide Wirkung im geeigneten Konzentrationsbereich schnell entfaltet, reicht eine kurze Exposition um die gewünschte Entmilbung zu erreichen ohne adulte Bienen zu schädigen. Gleichzeitig wurde aber auch beobachtet, dass in den therapeutisch wirksamen Dosen die Brut fast vollständig ausgeräumt wird. In der Tat reagieren Bienenlarven sensitiv bereits auf niedrige Dosen von Lithium im Futter. Unter aufwendigen in vitro Aufzucht Experimenten zeigte sich einerseits die Schädigung der Brut bereits bei 2 mM Lithium im Futter und andererseits konnte die Art der Schädigung angesprochen werden. Unter Lithium-Einfluss wird die Entwicklung der Larven signifikant verlangsamt und Bienenlarven bleiben in ihrem Wachstum zurück. Allerdings wurde auch beobachtet, dass adulte Bienen, die aus verdeckelter Brut nach Lithium-Behandlung schlüpfen phänotypisch unauffällig sind. Daraus ergibt sich ein binäres Ansprechverhalten, das entweder zu larvaler Retardierung und Tod oder nach einer unauffälligen Entwicklung zu einer gesunden adulten Biene führt. Da diese Untersuchungen an Bienenlarven schwer durchführbar sind wurde versucht an einem geeigneten Modellorganismus die toxische Wirkung von Lithium auf die Larval-Entwicklung besser zu verstehen.

Expressionsanalyse von Lithium-behandelten adulten Fliegen und Sequenzvergleich mit dem annotierten *Drosophila* Genom

Fliegen wurden für 2 Tage auf Futter mit 25mM LiCl kultiviert. Anschließend wurden 3 x 30 Fliegen gesammelt homogenisiert und entsprechend etablierter Protokolle für die RNA-Extraktion weiterverarbeitet. Als Kontrolle wurden unbehandelte Fliegen nach dem gleichen Protokoll prozessiert. Die extrahierte RNA wurde sequenziert und mit dem annotierten *Drosophila* Genom abgeglichen. Die gelesenen Sequenzen konnten in den unbehandelten Fliegen zu 90% in den behandelten Fliegen nur zu 65% im *Drosophila* Genom wiedergefunden werden. Basierend auf dem Vergleich der Häufigkeiten der Sequenz- „Reads“ wurden die Gene identifiziert, die gegenüber den Kontrollen dereguliert waren.

Gene mit erhöhten Expressionsniveau: 62 Gene wurden als überexprimiert gefunden und 17 funktionellen Gruppen zugewiesen. Von 62 Genen waren für 23 die Funktion unbekannt. Die meisten Gene vielen in die Kategorie Chitin Metabolismus (1) und Entwicklung (2). Dies ist besonders interessant, weil es mit den beobachteten Phänotypen korreliert.

Gene mit niedrigerem Expressionsniveau: 222 Gene wurden identifiziert, die gegenüber der Kontrolle signifikant schwächer transkribiert wurden. 33% (71 Gene) waren bezüglich ihrer Funktion nicht charakterisiert. Mit 51 Genen (22%) bildete Chitin und Cuticula assoziierte Transkripte die größte funktionelle Gruppe. Gene wie *krotzkopf verkehrt*, *vermiform* und *serpentine* wurden in dieser Gruppe gefunden. Weitere schwächer transkribierte Gene übernehmen Funktionen im Bereich Muskulatur und Neuronen (je 5%)

#### Vergleich der Genexpressionsprofile zwischen Bienen und Fliegen

Ein Vergleich der Expressionsprofile zwischen Fliege und Bienen ergibt wenig Überschneidungen. Lediglich zwei Gene, *spatzle3* und der Toll-like Rezeptor werden in beiden Organismen weniger stark transkribiert. Interessanterweise kodiert Spatzle 3 für einen Liganden des Toll-like Rezeptors und fällt so in dieselbe funktionelle Gruppe. Interessanter wäre der Vergleich von Bienenlarven mit Larven der Fruchtfliegen, wobei die identifizierten Phänotypen getrennt untersucht werden sollten. Ein RNA-seq Experiment, das die Fliegenlarven mit Petitphänotyp und normaler Entwicklung vergleicht ist geplant.

#### Expressionsprofilierung von Drosophila Larval-Stadien

Um die Toxizität auf die Larval-Entwicklung besser zu verstehen wurden Expressionsprofilierungen auch in Fliegenlarven initiiert. Die Methodenentwicklung zur Manipulation von Fliegenlarven ist essentiell um statistisch robuste Ergebnisse zu erzielen. Eine wesentliche Herausforderung bestand deshalb in der Etablierung von Techniken und Protokollen zur Anzucht, Quantifizierung und Manipulation von Drosophila-Larven. Die Methoden umfassten die Herstellung von Lithium-haltigen Nährmedien, die Ernte von Eiern, den Transfer von Larven auf unterschiedliche Nährmedien mit und ohne Lithium, sowie die Isolierung von Wachstums-retardierten Larven unterschiedlicher Häutungsstadien. Da Larven auf unterschiedliche Bedingungen sehr differenziert reagieren mussten Parameter wie Anzahl der Larven pro Anzuchtbecher, Dauer der Eiablage, Alter der Männchen und Weibchen bei der Eiablage, sowie das Alter des Nährmediums kontrolliert werden. Darüber hinaus bleibt auch die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ein Tier mit nicht immer komplett vorhersagbaren Verhalten (zB. Eilage), so dass trotz allen Bemühungen die experimentellen Bedingungen einer unvermeidbaren Schwankung unterlagen.

In langwierigen Tests wurden zunächst Wachstums-Konditionen gesucht, die verlässlich reproduzierbare Phänotypen in sich entwickelnden Larven erzeugen (Abbildung 2). Dazu wurden 50 – 100 Fliegen von Standard-Futter (FlyFood mit 0 mM LiCl = FF0) auf Futterteig mit 17 mM LiCl umgesetzt (FlyFood 17mM = FF17). Die Eiablage erfolgte über 12h bis 18h um die Ablage von 100 bis 200 Eiern zu ermöglichen. Sollten deutlich mehr Eier gelegt werden und entsprechend mehr Larven den Futterteig besiedeln ergeben



**Abbildung 2:** Größenvergleich von L3-Larven gleichen Alters in einer Larven-Population. Der Petit-Phänotyp soll mittels Expressionsanalyse genetisch besser verstanden werden.

sich zusätzliche phänotypische Ausprägungen und Verhaltensänderungen, die eine Ernte von den gesuchten Larven-Phänotypen zusätzlich erschwert. Bei zu niedriger Dichte an Eiern können die geschlüpften Larven das Futter nicht durcharbeiten, so dass Hefe den Futterteig überwächst und die Fliegenlarven anderen Stressoren ausgesetzt sind, mit nicht vorhersehbaren Folgen auf die Genexpression. Entsprechend sollten die Besiedelungsdichten in den Anzuchtbechern konstant gehalten werden. Nach 4 – 8 Tagen können dann Fliegenlarven geerntet werden, die signifikant kleiner sind, verglichen mit ihren sich synchron entwickelnden Larven aus demselben Brutansatz. Dabei muss genau untersucht werden, ob die phänotypischen Ausprägungen der einer L3-Larve oder einer L2-Larve entspricht. Als Merkmale gelten die pigmentierten posterioren Ende der Spirakel (Engl.: spiracles). In der Drosophila-Larve spielen die Spirakel eine zentrale Rolle bei der Atmung, indem sie den Gasaustausch ermöglichen. Sie sind Teil eines speziellen Systems von röhrenförmigen Strukturen, die das Insekt mit Sauerstoff versorgen, ohne dass ein Blutkreislaufsystem für den Sauerstofftransport erforderlich ist. Bei L2 Larven sind diese posterioren Ende noch unpigmentiert und sind nach der darauffolgenden Häutung orange eingefärbt. Ebenso sind die anterioren Enden der Spirakel zwischen L2- und L3-Larven morphologisch unterschiedlich und erlauben eine Unterscheidung. Zur Ernte von wachstums-retardierten L3- und L2 Larven wurden die FF17 Larven Populationen unter dem Stereomikroskop beobachtet und die phänotypisch entsprechenden Individuen mit einer Nadel vorsichtig aus dem Futterteig gehoben. Die Larven wurden auf in eine Eisgekühlte Petrischale mit RNase-freier Ringerlösung überführt, unter dem Stereomikroskop erneut analysiert, dokumentiert, von Futter Resten befreit und bei -80°C eingefroren.

Bislang wurden verschiedene RNA-Extraktions Kits erprobt um mit geringen Verlusten aus den wenige Millimeter großen Larven ausreichend RNA für die Expressionsanalyse zu gewinnen. Die

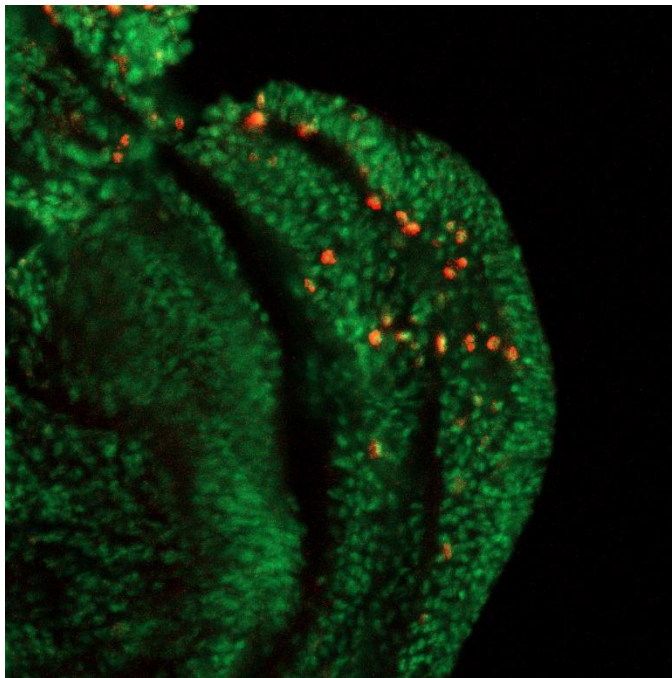
RNA-Extraktion aus den geernteten Larven hat aus Zeitgründen noch nicht stattgefunden. Ziel ist es durch Vergleich mit unbehandelten Larven deregulierte Gene zu identifizieren. In einem weiteren Schritt könnten dann in Bienenlarven, die durch Lithium geschädigt wurden mit RT-PCR zu überprüfen, ob homologe Gene ebenfalls dereguliert wurden.

#### **Arbeitspaket 6: Histologische Untersuchung zur Aufklärung der Lithium-abhängigen Toxizität auf Bienenlarven**

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes sollen etablierte Methoden der entwicklungsbiologischen Forschung eingesetzt werden, um die Fehlbildungen durch Lithium-Fütterung besser zu verstehen. Aus in vitro Aufzucht-Versuchen an Bienenlarven war bereits im Vorfeld beobachtet worden, dass Bienenlarven im Verdeckelungs-Stadium eine fehlerhafte holometabole Metamorphose durchlaufen. Auf Basis dieser Beobachtungen sollte geprüft werden, ob die Imaginalscheiben in den Larval-Stadien unterschiedlichen Muster in Abhängigkeit von Lithium ausbilden. Imaginalscheiben sind epitheliale Zellstrukturen in den Larven holometaboler Insekten, die während der Metamorphose zu den adulten Körperteilen wie Flügeln, Beinen, Augen, Geschlechtsplatten und Antennen differenzieren. Sie bleiben im Larvenstadium weitgehend undifferenziert, wachsen jedoch durch Zellteilung und Faltung, um die zukünftige Körperform vorzubereiten. Während der Puppenphase durchlaufen sie gezielte Zellproliferation und -differenzierung, gesteuert durch hormonelle Signale wie Ecdyson, um die endgültige Morphologie des erwachsenen Insekts zu bilden. Aus Gründen der Machbarkeit wurden diese Untersuchungen nicht in Bienenlarven, sondern in Larval-Stadien der Fruchtfliege mit etablierten Protokollen durchgeführt. Die Proliferation der Imaginalscheiben sollte nach Präparation durch histologische Färbung mit fluoreszent markierten Antikörpern gegen Proliferationsmarker lichtmikroskopische gezeigt werden. Als Marker wurde die Phosphorylierung von Histon H3B (PH3B) genommen, gegen das spezifische Antikörper verfügbar waren.

### Die Färbung der Imaginalscheiben in behandelten und unbehandelten Larven zeigt keinen Unterschied

Die Umformung einer Larve zu einem adulten Insekt erfolgt in holometabolen Organismen über einen Verpuppungsschritt. In diesem werden alle larvalen Strukturen aufgelöst und Strukturen des adulten Insekts entstehen aus den im Larval Stadium angelegten Imaginalscheiben. Dieses spezielle Gewebe in den Larvenstadien von *Drosophila* übernimmt eine zentrale Rolle in der Entwicklung von adulten Strukturen. Die scheibenförmigen Zellansammlungen bleiben während der Larvenentwicklung zunächst inaktiv, durchlaufen jedoch eine intensive Zellproliferation und -differenzierung während der Metamorphose. Aus den Imaginalscheiben entstehen die adulten Körperteile der Fliege, wie Flügel, Beine, Augen, und Antennen. Sie sind entscheidend für das Verständnis der Musterbildung und Organentwicklung, da sie als Modell für morphogenetische Prozesse dienen und Einblicke in die genetische Kontrolle der Entwicklung bieten. Durch immunhistologische Analyse lässt sich die Proliferationstätigkeit der larvalen Imaginalscheiben



**Abbildung 3:** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme einer Imaginalscheibe aus einer L3 Larve von *Drosophila*. Mitotische Zellen in Rot, Zellkerne in Grün. Die Aufnahme wurde mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop der Firma Zeiss aufgenommen (CLSM520)

untersuchen. Ein Marker für die Zellteilung ist das phosphorylierte Histon H3B gegen das Antikörper kommerziell erhältlich sind. Eine Arbeitshypothese dieses Antrags war zu überprüfen, ob die Aktivität der Zellproliferation unter Einfluss von Lithium verändert wird. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurden Larven auf Futterteig mit Lithium angezogen, im L3 Stadium geerntet und die Imaginalscheiben präpariert. Die Zellscheiben wurden in Puffer inkubiert, und entsprechend etablierter Protokolle mit Antikörpern auf phosphoryliertes Histon H3 (PH3) untersucht. Unter natürlichen Bedingungen sind die meisten Zellen in der Interphase und nur

vereinzelt mit dem Mitosemarker PH3 markierbar. In der Abbildung sind einzelne Zellen in der Peripherie der Imaginalscheibe positiv auf den Mitosemarker. Die Zellkerne sind in grün dargestellt (Abbildung 3). Ein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Larven war auch bei einer großen Anzahl von Imaginalscheiben nicht zu beobachten. Vor dem Hintergrund der im

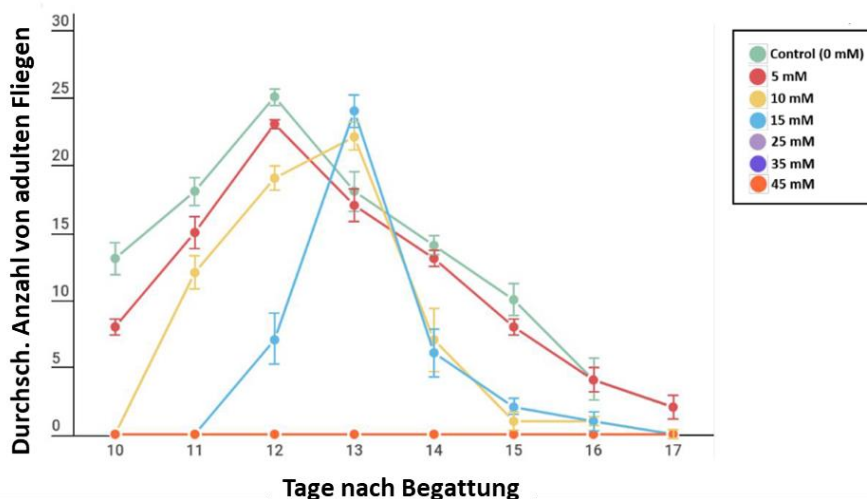
Projektverlauf gewonnenen Erkenntnisse ist dieser Befund nicht überraschend. Während Lithium die Larval Stadien stark beeinträchtigt, ist die Umformung während dem Puppenstadium unbeeinträchtigt. Da bekannt ist, dass die Imaginalscheiben während der Larval Entwicklung wenig Aktivität zeigen und die Ausbildung der Strukturen erst in der Metamorphose erfolgt, passt der Befund ins Gesamtbild, demzufolge die holometabole Metamorphose von Lithium nicht beeinträchtigt wird. Anstelle einer Fortführung von histologischen Untersuchungen wurde stattdessen die Wirkungsweise von Lithium auf die Entwicklung von Drosophila Larven tiefergehend untersucht:

#### Die Lebensspanne von Fruchtfliegen verlängert sich nicht nach Lithiumfütterung

Aus Käfig-Experiment an Bienen ergaben sich Hinweise auf Lebenszeit-verlängernde Wirkung von Lithium bei niedrigen Konzentrationen. Um bei adulten Fruchtfliegen einen vergleichbaren Effekt nachzuweisen wurden frisch geschlüpfte Fruchtfliegen auf Nährmedien mit 0 mM, 2 mM und 4 mM LiCl gehalten und in neue Becher überführt, bevor deren Brut schlüpfen kann. Insgesamt wurde das Überleben der Fliegen über einen Zeitraum von 52 Tagen beobachtet bis die letzte Fliege gestorben war. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen konnte eine Verlängerung der Lebensspanne in Abhängigkeit der Lithium-Konzentration im Medium aber nicht nachgewiesen werden.

#### Die Larval-Entwicklung von Drosophila wird signifikant verlangsamt

In einem weiteren Satz von Experimenten wurden die Beobachtungen zur Entwicklung von Fliegen bestätigt. Dazu wurden je 50 männliche und 50 weibliche Fliegen für 24h in einem Aufzucht Röhrchen mit 13ml Futterteig bei 25°C zur Eiablage kultiviert (Abbildung 4). Die Menge der abgelegten Eier konnte unter einem Stereomikroskop qualitativ abgeschätzt werden. Durch das kurze Zeitfenster von 24h für die Eiablage kann eine präzisere Analyse der verzögerten Entwicklung ermöglicht. Lithium wurde in Konzentrationen von 0 mM, 5 mM, 10 mM, 12

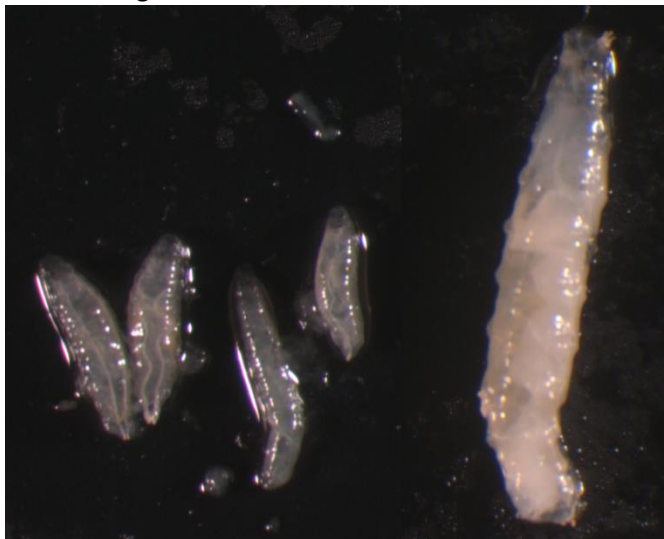


**Abbildung 4:** Konzentrationsabhängige Verzögerung der Larval Entwicklung sowie Reduktion des Bruterfolgs durch Lithium im Futterteig. Bei Konzentrationen jenseits der 20 mM LiCl können sich adulte Fliegen nicht mehr entwickeln.

mM, 15 mM, 17 mM, 19 mM und 20 mM zugesetzt. Folgende Beobachtungen ergaben sich aus der Analyse: (a) Lithium in einer Konzentration von 20 mM erlaubt noch die Embryogenese und das Schlüpfen von Larven, doch sterben die Larven vor der ersten Häutung. Ebenso lässt sich beobachten, dass sich die Larven verglichen mit unbehandelten Larven langsamer fortbewegen und träge wirken. Nach 3 Tagen Inkubation auf Futterteig mit 20mM Lithium waren alle Larven gestorben, wobei die Oberfläche des Futterteigs nicht aufgewühlt wurde. Unbehandelte Larven haben sich in diesem Zeitraum bereits zum zweiten Mal gehäutet und begonnen sich in den Futterteig zu fressen. Eine weitere interessante Beobachtung bezieht sich auf das Schlüpfen von Larven aus Eiern: Anders als auf Lithium-freien Medien schlüpfen nur wenige Larven aus den gelegten Eiern. Dies lässt den Schluss zu, dass Lithium in das Ei eindringt und dort auf die Embryogenese wirken kann. (b) Konzentrationen von 19 mM erwiesen sich als gerade noch permissiv für die stark verzögerte (bis zu 5 Tagen) aber erfolgreiche Entwicklung zu adulten Fliegen. Allerdings sterben die meisten Larven vor oder während der Verpuppung ab. (c) Massive Verzögerung in der Entwicklung sind in einem Konzentrationsbereich zwischen 18 mM – 12 mM zu beobachten. Im Mittel beginnen aus den Puppen mit einer Verspätung von 2 – 4 Tagen adulte Fliegen zu schlüpfen. (d) 10 mM und 5mM Lithium im Futterteig verzögert die Zeit zur Verpuppung und zum Schlüpfen der adulten Fliege um 1 – 2 Tage (Abbildung 3).

#### Die Verzögerung der Larval-Entwicklung unterscheidet sich stark innerhalb einer Population

Unter Einfluss von Lithium weisen Larven signifikante Unterschiede in ihrer Entwicklung auf. Interessanterweise koexistieren bei einer bestimmten Konzentration von Lithium verschiedenen Entwicklungsstadien nebeneinander. So leben im Futterteig Larven, die nach 5 Tagen erst eine



**Abbildung 5:** Größenvergleich von L3-Larven gleichen Alters in einer Larven-Population, die sich auf 17mM LiCl-haltigem Futterteig entwickelt

Häutung vollzogen haben und entsprechend einiger Merkmale klar einer L2 (2nd Instar) zuzuordnen sind. Es sind dies die Struktur und Farbe der anterioren und posterioren Enden der Tracheen: Die „Spiracles“ an den anterioren Enden der linken und rechten Tracheen, die sich entlang der seitlichen Körperachse durch die Larve ziehen sind bei L2 Larven spitz zulaufend, während nach der letzten Häutung zur L3 Larve die Spiracles in mehrere Blätter auffächern. Das hintere

Ende der Tracheen, die am posterioren Ende der Larve aus dem Körper ragen sind in der L2 Larve noch farblos und als L3 Larve orange pigmentiert. Entsprechend dieser Merkmale sind Größen unabhängig die Larven ihren Stadien zuzuordnen. Bei höheren Konzentrationen von Lithium sind auch nach mehreren Tagen noch L2 Larven im Futterteig zu sehen. Andere Larven sind zur selben Zeit voll entwickelt. Lithium wirkt also nicht homogen auf alle Larven im gleichen Maße (Abb. 5).

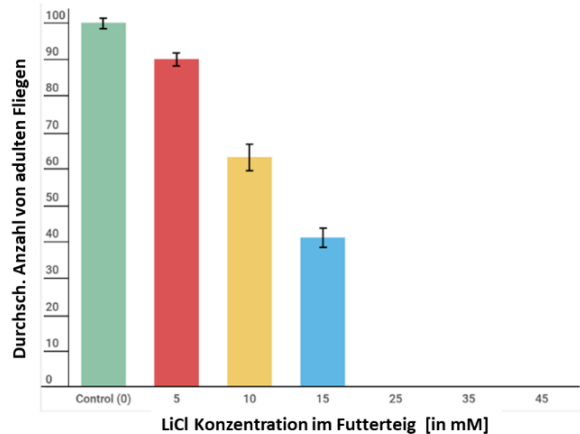
#### Adulte Fliegen aus Larven unter Lithium-Gabe haben keinen Phänotyp

Bezogen auf den Phänotyp der adulten Fliege sind auch knapp unterhalb der nicht permissiven Li-Konzentration (16 mM - 19 mM LiCl) keine Fehlbildungen zu beobachten. Licht-mikroskopische Untersuchungen zeigen, dass unter den geschlüpften Fliegen wenige signifikant kleinere Tiere zu finden sind. Auf eine Quantifizierung der Größen und Gewichtsverteilung frisch geschlüpfter Fliegen wurde deshalb verzichtet. Ebenso konnte die ursprüngliche Beobachtung einer ungleichen Geschlechterverteilung in der F1-Generation nicht bestätigt werden. Auch der Erfolg der holometabolen Entwicklung zu einer adulten Fliege unterscheidet sich nicht zwischen behandelten und unbehandelten Populationen. Daraus folgt, dass sich die Verzögerung und Störung der Entwicklung einerseits nicht homogen auf alle Individuen einer Lithium-behandelten Population auswirkt und die Wirkung nur über den Zeitraum der Larval-Entwicklung, nicht aber des Puppenstadiums andauert. Sobald eine Larve verpuppt ist, entsteht in behandelten und unbehandelten Populationen mit derselben Wahrscheinlichkeit eine phänotypisch unauffällige adulte Fliege. Dieser Befund korreliert mit der Verweildauer von Lithium im Organismus. Da Lithium von molekularen Translokatoren, Pumpen und Kanälen nicht aktiv transportiert wird, ist die Verweildauer im Organismus kurz. Da zum Zeitpunkt der Verpuppung kein neues Lithium zugeführt wird, könnte die für die Entwicklung inhibierenden Konzentrationen von Lithium schnell unter den kritischen Schwellenwert fallen. Die Beobachtung deckt sich ebenfalls mit der Larval-Entwicklung von Bienen: Auch hier schlüpfen adulte Bienen ohne Schädigung aus der verdeckelten Brut.

#### Die Überlebensquote bis zur Verpuppung sinkt signifikant

Versuche mit Eiern und frühen Larval Stadien zeigen, dass mit steigender Li-Konzentration signifikant weniger adulte Fliegen schlüpfen. Verglichen mit unbehandelten Kontrollen der Brutentwicklung zeigt sich, dass bereits die Menge an Verpuppungen mit steigenden Lithium Konzentrationen abnimmt (Abbildung 6). Der teratogene Effekt erfasst also das Ei (Embryo) und die Larvenstadien.

In Hinsicht auf den Embryo ist das auch deshalb bemerkenswert, da in der Literatur das Ei als unzugänglich für teratogene Einflüsse beschrieben wurde. Unsere Versuche zeigen allerdings, dass bei Konzentrationen über 20 mM LiCl keine Larven mehr aus Eiern schlüpfen. Die Wirkung muss entsprechend also schon im Ei erfolgen können. In der Abbildung 3 wird die Abnahme des Bruterfolgs in Abhängigkeit von Lithium im Futterteig gezeigt. Bei Konzentrationen von 20mM LiCl wurden nur selten adulte Fliegen beobachtet.



**Abbildung 6:** Bruterfolg von Fliegenlarven bei unterschiedlichen Lithium Konzentrationen

#### Puppen aus Lithium-behandelten Larven finden sich vermehrt im Futterteig

Nachdem die L3 Larve ausreichend Gewichtszunahme erreicht hat, wird durch Synthese von Hydroxy-Ecdysone in Abwesenheit von Juvenil-Hormon (JH) die Verpuppung eingeleitet. Dazu verlassen die L3 Larven den Futterteig und kriechen an der Gefäßwand zu einem höher gelegenen Ort, um sich mit einem Mix aus adhäsiven Proteinen zu umhüllen und an der Gefäßwand anzukleben. Drosophila besitzt 8 Gene der Glue-Familie, die alle in exokrinen Zellen gebildet und in den Speicheldrüsen gespeichert werden. Sobald Drosophila L3 Larven einen Ort für die Verpuppung gefunden haben, entleeren sich die Speicheldrüsen, verteilen sich über die Oberfläche der Larve und verkleben bei der Aushärtung innerhalb weniger Minuten mit der Gefäßwand. Bei der visuellen Untersuchung der Larval-Entwicklung zeigte sich, dass Larven die sich in Lithium-haltigen Futterteig entwickelten, vermehrt im Futterteig zu liegen kommen – dort können die Puppen eventuell weiter ihre Metamorphose fortsetzen, dann aber beim Schlüpfen den Futterteig nicht verlassen und verenden oftmals. Zur Erklärung dieser Beobachtung werden verschiedene Hypothesen erwogen. Einerseits könnten Larven, deren Entwicklung gestört ist, einen unvollständigen Satz an Glue-Proteinen exprimieren. Dies wiederum beeinflusst die Festigkeit der Klebung und kann dann zur Ablösung führen. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Puppen aus Lithium-Futter die Tendenz haben, nicht an die Gefäßwand, sondern an andere Puppen zu kleben – so könnten sich entweder beide Puppen ablösen, da die Stärke des Klebers nicht beide Puppen zu halten vermag. Alternativ könnten Puppen, die nicht an der Gefäßwand verklebt sind aufgrund der geringeren Klebefläche leichter „abstürzen“. In der Literatur werden Methoden zur Testung der Verklebungs-Stärke beschrieben. Im einfachsten Fall wird mit einer Pinzette die Puppe von der Gefäßwand gezupft und

manuelle die Kraft eingeschätzt, die notwendig ist um die Klebung zu lösen. Mit dieser Methode wurden adhärierte Puppen aus behandelten und unbehandelten Populationen verglichen. Aus dieser manuellen Analyse ergab sich allerdings kein deutlich spürbarer Unterschied in der Festigkeit der Anheftung. Andererseits könnten aber L3 Larven auch durch veränderte Verhaltensmuster im Futterteig verbleiben, ohne an den Gefäßwänden eine exponierte Stelle zur Verpuppung aufzusuchen. Ob Lithium auch auf das Verhalten der Larven Einfluss nimmt, geht aber über die Fragestellung hinaus und verspricht keine Lösung im Zusammenhang mit der Toxizität auf Bienenlarven. Das vermehrte Auffinden von Puppen im Futterteig kann ab einer Konzentration von 12 mM LiCl beobachtet werden.

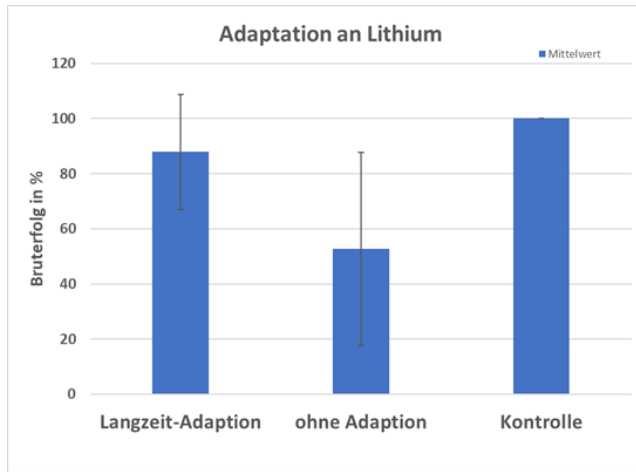
#### Der Zeitpunkt der Lithiumgabe ist für die Verzögerung der Larval-Entwicklung unerheblich

In einer Vielzahl von unabhängigen Experimenten wurde untersucht ob Lithium zu einem frühen oder späten Zeitpunkt in der Larval Entwicklung besonders empfindlich stört oder besser vertragen wird. Dazu wurden Fliegen auf Apfelagar ohne Lithium zur Eiablage gehalten. Die Eier aus einem Zeitfenster von maximal 18h wurden geerntet und auf unbehandeltes bzw. Lithium-haltiges Futter überführt. Alternativ wurden Larven nach Inkubation auf Lithium-haltigen nach 1 – 3 Tagen auf unbehandeltes Futter umgesetzt. Ebenso wurden Larven nach 1 -3 Tagen Inkubation auf unbehandeltem Futter auf lithium-haltiges Futter umgesetzt. Die Motivation für dieses Experiment ergab sich aus Beobachtungen bei Bienen, deren Brut zu unterschiedlichen Zeitpunkten besonders empfindlich auf Lithium im Nahrungskreislauf des Volkes reagiert. Unsere Experimente legen nahe, dass allein die Dauer und die Konzentration der Lithiumgabe eine Rolle für die Entwicklung spielt, der Zeitpunkt der Exposition ist im Gegensatz dazu offenbar weniger entscheidend. Die Beobachtungen im Bienenvolk könnten stattdessen auch auf die Menge des Zuckerwasseranteils im Futtersaft bzw den Anteil des Sekrets aus den Hypopharynx-Drüsen zurückzuführen sein.

#### Durch Selektion lassen sich Subpopulationen mit erhöhter Resilienz gegenüber Lithium heranziehen

Wie bereits beschrieben reagieren Larven uneinheitlich auf Lithium im Futter. Während für einige Larven die Exposition zu einem massivem Entwicklungsdefizit führt, sind andere Larven in Größe und Entwicklungsgeschwindigkeit nur geringfügig betroffen. Würde eine genetische Disposition einen Entwicklungsvorteil bedingen sollte durch konsequentes Selektieren nach mehreren Generationen die unempfindliche Subpopulation angereichert werden. Entsprechend sollten Larven als Nachkommen von adulten Fliegen, die in jeder Generation als erste in Gegenwart von Lithium aus Puppen geschlüpft waren ihrerseits zu einem höheren Prozentsatz schnell und erfolgreich zu adulten

Fliegen reifen. Dies würde auch den Schluss nahelegen, dass die Resilienz genetisch bedingt ist und nicht mit ungleichmäßiger Nahrungsaufnahme oder inhomogener Verteilung von Lithium korreliert. Dazu wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten Fliegen auf 17 mM Lithium herangezogen, und die Züchtung mit den Individuen fortgesetzt, die als erste aus den Puppen schlüpften. Die Entwicklung wurde dann mit nicht adaptierten Larven verglichen sowie mit Kontroll-Larven, die sich auf Medium ohne Lithium entwickeln konnten. In der Tat zeigte sich, dass die Anzahl der erfolgreichen



**Abbildung 7:** Die Adaptation an Lithium kann nach mehreren Generationen zu einer erhöhten Lithium Toleranz bei Larven führen

Brutverläufe gegenüber nicht adaptierten Populationen anstieg. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der Prozentsatz von verzögert reifenden Larven in der adaptierten Population sank. Die Adaptation befördert also sowohl Bruterfolg als auch die Entwicklungsgeschwindigkeit. In der Logik der Antragsstellung könnte dies bedeuten, dass es möglich wäre Bienen zu züchten, deren Larven weniger sensibel auf Lithium reagieren (Abbildung 7).

#### Zusammenstellung eines Dokuments zum MRL von Lithium (MRL = maximum residue limit)

Zusätzlich zu den Arbeiten am Modellorganismus *Drosophila* wurden erste Vorbereitungen für die Zulassung von Lithium als Therapeutikum zur Behandlung der Varroose unternommen. Die Zulassung veterinärmedizinischer Produkte verlangt den Nachweis von Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit. Zusätzlich verlangt die Behörde die Ausstellung eines MRLs, wenn das veterinärmedizinische Produkt an Tiere verabreicht wird, das bei der Lebensmittelproduktion eine Rolle spielt. Da Bienen als Honigproduzenten verfüttertes Lithium in den geernteten Honig weiter geben könnten muss auch für Lithium ein MRL erstellt werden. Ein MRL wird über die EMA von der Europäischen Kommission ausgegeben – Hierfür müssen vom Antragsteller alle verfügbaren relevanten Informationen zusammengetragen und in einem Dossier kompiliert werden. Da Lithium in der Humanmedizin zur Therapie von bipolarer Störung eingesetzt wird ist die Menge an verfügbaren Informationen überwältigend. Gleichzeitig geht aus den Studien sehr klar hervor welche Konzentrationen notwendig sind, um eine Gesundheitsschädigung zu bewirken. Außerdem ist Lithium ein Mikro-Spurenelement das in niedrigsten Konzentrationen in jedem Lebensmittel vorkommt. Das natürliche Vorkommen von Lithium ist mineralisch, über Auswaschungsvorgänge gelangt Lithium dann in Wasser, von wo es in Pflanzen aufgenommen wird. Die Konzentration von

Lithium ist in Gemüse vergleichsweise hoch, in Milchprodukten und Fleisch niedriger. Die Menge an Lithium in Lebensmitteln hängt von den Lithium-Konzentrationen in Boden und Wasser der Region ab. Im Rahmen der Anstrengungen um die Kommerzialisierung von LIMITEX wurde bereits begonnen wesentliche Daten zu Lithium in Wasser, Lebensmitteln im Allgemeinen und Honigen im Speziellen, sowie als Arzneimittel zusammenzutragen und in einem Dokument ebenfalls für Interessierte Investoren verfügbar zu machen. Gleichmaßen soll das Dokument bei der Erstellung des MRL-Dossiers als Grundlage dienen

## **2) Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

1) Personalkosten: Die Arbeiten sind allesamt Arbeits-intensiv und experimentell aufwendig. Der größte Teil der Arbeitszeit wurde auf unterschiedliche Aspekte der Larval Entwicklung von *Drosophila* aufgewendet.

2) Kosten für Sequenzierungen im Rahmen der Expressionsprofilierung. Bei RNA-Seq wird zunächst die Gesamt-RNA aus Zellen oder Gewebe extrahiert und aufgereinigt. Abhängig vom Experiment wird entweder die mRNA über ihre Poly(A)-Schwänze angereichert oder ribosomale RNA gezielt entfernt, um störende Sequenzen zu minimieren. Anschließend erfolgt die cDNA-Synthese, bei der die RNA mithilfe von Oligo(dT)- oder Random-Hexamer-Primern in komplementäre DNA umgeschrieben wird, wobei optional die Strangorientierung erhalten bleibt. Die resultierende cDNA wird fragmentiert und mit spezifischen Sequenzier-Adaptoren versehen, die für die spätere Amplifikation und Erkennung durch den Sequenzierer notwendig sind. Durch eine nachfolgende PCR-Amplifikation wird die Bibliothek vervielfältigt, um ausreichend Material für die Sequenzierung zu erzeugen. Abschließend erfolgt eine Qualitätskontrolle, beispielsweise durch einen Bioanalyzer oder qPCR, um sicherzustellen, dass die Fragmente die gewünschte Größe und Qualität aufweisen. Diese vorbereitete Bibliothek kann dann für die Hochdurchsatz-Sequenzierung genutzt werden, um das Transkriptom umfassend zu analysieren. Um eine ausreichend hohe Genauigkeit zu erreichen wurden die Analysen mit einer großen Sequenziertiefe durchgeführt. Die Kosten für die Analysen korrelieren mit der gewählten Menge an „Reads“ pro Transkript.

3) Weitere Kosten ergaben sich aus Reagenzien für die Molekularbiologie, wie Enzyme, Kits zur Aufreinigung und Oligonukleotide

## **3) Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeit**

Bienen leisten einen unermesslichen Beitrag zur Lebensmittelproduktion, der landwirtschaftlichen Produktivität und dem ökologischen Gleichgewicht durch ihre Rolle als hocheffiziente Bestäuber. Ihr wirtschaftlicher Beitrag übersteigt 400 Milliarden US\$ jährlich und macht sie zum 3. Wichtigsten

landwirtschaftlichen Nutztier. Mit der Einschleppung und globalen Verbreitung der parasitischen Varroa-Milbe sind weltweit Bienenvölker in Gefahr: Unbehandelt kollabieren Bienenvölker innerhalb von 2 Jahren – zwischenzeitlich ist jedes Volk mit Varroa Milben infiziert. Die wenigen zugelassenen Mittel zur Varroa-Kontrolle sind veraltet, unverlässlich, wenig effizient und der Einsatz arbeitsintensiv. Entsprechend müssen Bienen intensiver geschützt werden. Das Projekt EAsyLife liefert dazu wichtige Beiträge

#### **4) Verwertung der Ergebnisse: Maßnahmen zur wirtschaftlichen Nutzung des Wirkstoffs**

Die Entdeckung der akariziden Wirkung von Lithium-Salzen stellt einen Quantensprung in der Varroa-Kontrolle dar und löst einen Großteil der Probleme mit den derzeit verfügbaren Methoden und Wirkstoffen. Sowohl Käfigversuche als auch Untersuchungen an Wirtschaftsvölkern unter imkerlichen Bedingungen zeigen eine überzeugende Wirksamkeit, die bei geeigneter Konzentration und Formulierung 98% übersteigt. Damit gelingt in einer einzelnen Behandlung eine fast vollständige Entmilbung des Volkes. Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Verfütterung von 4000ml Zuckerwasser mit Lithium-Citrat in einem Konzentrationsbereich zwischen 25mM und 50mM optimale Ergebnisse liefert. Durch Sperrung der Königin kann die Brut vor Entwicklungsschäden geschützt werden. Rückstandsanalytik zeigt keine Lithiumspuren in Bienenprodukten wie Pollen und Wachs. Die Mengen von Lithium in Honigen aus behandelten Völkern lassen sich von unbehandelten Völkern nicht unterscheiden.

Damit ist aus der ursprünglichen Entdeckung ein Behandlungskonzept entwickelt worden, das für Imker und Bienen eine deutliche Verbesserung der Varroa Kontrolle darstellt. Während die Erforschung notwendiger Fragen zur Optimierung des Verfahrens einen Kernpunkt der Fördermaßnahme durch das BMEL darstellt, sind auch wirtschaftliche Aspekte wesentlich. Um Lithium basierte Wirkstoffe für die Imkerei in Europa zur Verfügung stellen zu können, müssen diese als veterinärmedizinische Produkte durch die EMA zugelassen werden. Der Zulassungsprozess ist ein aufwendiger und kostenintensiver Vorgang, der ebenfalls im Rahmen dieses Projektes angegangen wurde. Die unterschiedlichen Aktivitäten, mit denen die Zulassungsangelegenheiten initiiert und die notwendige Finanzierung ermöglicht werden soll sind im Folgenden gelistet.

#### Gründung der Varolis GmbH

Um die Entwicklung, Zulassung, die Markteinführung und Vermarktung eines neuen Medikaments zur Varroa Kontrolle zu bewirken, müssen eine Reihe von Maßnahmen ergriffen werden: In präklinischen Versuchen werden die Bedingungen ermittelt, unter denen sich die Vorgaben der Zulassungsbehörden erreicht lassen. Für die Zulassung müssen Sicherheit, Qualität und Wirksamkeit

des Produkts nachgewiesen werden, die Daten in einem Dossier kompiliert und eingereicht werden. Dafür laufen Kosten auf, die nur mittels Investoren oder Förderinstrumenten aufgebracht werden können. Um für eine Förderung oder die Beteiligung von Investoren die notwendigen Voraussetzungen zu schaffen wurde eine Firma gegründet, mit der Expertise, Lizenzen zur Patentnutzung und den Zugriff auf die Daten in einer Entität vereinigt. Dazu wurden erfolgreich Lizenzverhandlungen mit siTOOLS Biotech GmbH sowie mit Dr. Stefan Hannus und der Universität Hohenheim geführt. Die Varolis GmbH wurde am 09.03.2023 von Dr. Stefan Hannus, Dr. Frank Becker, Dr. Dirk Buehler und Prof. Dr. Uwe Jacob in München gegründet. Die Handelsregisternummer ist (München) HRB283681 und der Internetauftritt kann unter [www.varolis-apimed.de](http://www.varolis-apimed.de) aufgerufen werden.

#### Bewerbung auf Förderung im Rahmen des EIC Challenge

Unter dem Förderaufruf des EIC Accelerator Challenge: „Novel technologies for resilient agriculture“ wurde in einem 4 stufigen Verfahren Fördermittel für die Zulassung von Lithium Citrat als Wirkstoff zur Varroa bekämpfung zu erhalten. Das 4-stufige Verfahren umfasst einen kurzen Video-Beitrag, in dem die Geschäftsidee und die Kernkompetenzen des Entwicklungsteams vorgestellt wurden. In einem Vorantrag wurden wissenschaftliche und wirtschaftliche Kenndaten abgefragt, mit dem die technische Reife des Projekts „ELIMITE“ (Verschmelzung der Begriffe Eliminate – Li (thium) – Mite) sowie die Belastbarkeit der bisherigen Entwicklung überprüft wurden. Nach positiver Beurteilung wurde zur Einreichung des Vollartrags aufgefordert, in dem das gesamte Geschäftsmodell mit Konkurrenzanalyse, Marktpotential, Finanzplanung und Risiko-Analyse abgefragt wurde. Auch der Vollartrag wurde positiv beurteilt und öffnete den Weg zu einem finalen Interview, in dem einerseits das Geschäftsmodell in einem Pitch vorgestellt und in einer Frage-Runde verteidigt wurde. Hier scheiterte der Antrag an einem Gutachter, der Bienenschutz für unwesentlich und die verfügbaren Methoden für ausreichend erachtete. Eine Wiedervorlage des Projekts war nicht erfolgreich. Gleichzeitig qualifiziert die positive Begutachtung des Vollartrags das Projekt und kann bei der Investorensuche präsentiert werden.

#### Bewerbung und Teilnahme am EIT Seedbed BootCamp

Eine zweite Initiative zur Förderung von ELIMITE ergab sich aus der Bewerbung auf und die Teilnahme am EIT SEEDBED BootCamp. Mit dem Projektnamen LIMITEX (Verschmelzung aus Li- Mite – und X für extinct) der auch als Produktname für den Lithium-Citrat basierten Wirkstoff gewählt wurde, konnte eine Förderung gesichert werden, die zwar keine Finanzmittel zur Verfügung stellt aber Unterstützung im Bereich der Lebensmittel- und Agrartechnologien vermittelt. Im BootCamp

wurden dann aus einer Vielzahl von Bewerbern unter anderem das Projekt LIMITEX gewählt um im EIT SEEDBED weiter für das Lebensmittel – und Agrarsegment gecoacht zu werden

#### Förderung im Rahmen des EIT Seedbed Programs

Mit Unterstützung von Experten des EIT Programms wurden die Netzwerke zu potentiellen strategischen Partnern und Venture Kapital Unternehmen ausgebaut. Eine weitere Aktivität bezieht sich auf die Etablierung von Kontakten zu Stiftungen, sowie Business Angel Networks mit Fokus auf Food-Rech, sowie Veterinärmedizin. Zudem verschafft die Teilnahme an dem Programm Zugang zu Veranstaltungen auf dem das Projekt und das Produkt LIMITEX vorgestellt werden kann. Aus diesen Aktivitäten haben sich bereits mehrere Kontakte zu VCs und strategischen Partnern ergeben (HTGF, Südzucker, Baywa, FloraCV, Occident etc.)

#### Erstellung eines „Investoren Pitches“

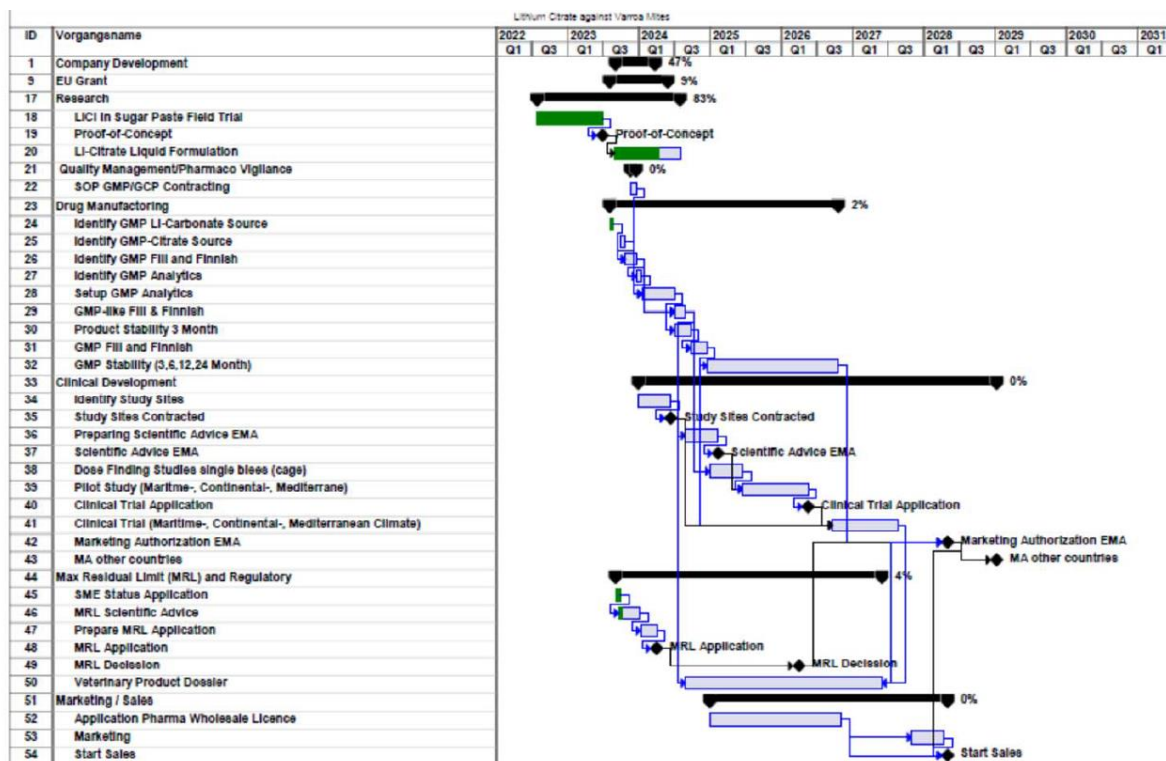
Ein wesentlicher Faktor zur erfolgreichen Verpartnerung des Projektes mit Partnern zur Finanzierung der Marktzulassung und -Einführung ist die Zusammenstellung einer aussagekräftigen Präsentation anhand der das Geschäftsmodell für Investoren nachvollziehbar vorgestellt werden kann. In einem ersten Teil stellen wir die Wichtigkeit der Honigbiene für die landwirtschaftliche Produktivität, die Gefährdung durch die parasitische Varroa Milbe sowie die aktuellen Maßnahmen zur Varroa-Kontrolle vor. In einem zweiten Teil wird das Produkt präsentiert und die charakteristischen Kenndaten sowie die Alleinstellungsmerkmale erklärt. Da eine Abschätzung der Marktgröße über veröffentlichte Geschäftszahlen von Konkurrenzprodukten nicht möglich ist, wurde der verfügbare Markt über die Anzahl und die Entwicklung der globalen Bienenvölker erhoben. Entsprechend der aktuellen Zahlen der Food and Agriculture Organization of the United Nations (FOA.org) wurden 100 Millionen betreuter Bienenvölker ermittelt und unter der Annahme von Ausgaben von €20.- für Varroa-Kontrolle pro Volk und Jahr ein Marktvolumen von € 2 Billionen berechnet. Weitere Annahmen führten dann zu Zeit-aufgeösten Umsatzzahlen für LIMITEX nach der Marktzulassung und -Einführung. Weitere Informationen beziehen sich auf die Strategien, ein wachsendes Marktsegment für LIMITEX zu erwirken. Hier werden strategische Partnerschaften zu Imker-Vereinigungen, Fach-Händlern aber auch Meinungsführern im Bereich Bienenzucht etabliert. Bereits heute hat das Projekt LIMITEX mit Dr. Humberto Bonchristiani einen international anerkannten Experten als Unterstützer. Dr. Bonchristiani ist Betreiber des weltweit größten YouTube Kanals (insidethehive.tv). Weitere Informationen zu den Zulassungsvoraussetzungen, dem aktuellen Stand der Forschung, dem aktuellen Projekt Team sowie den Unterstützern und Beratern komplettieren die Präsentation.

Zwischenzeitlich wurden weiter Präsentationen zusammengestellt, die das Projekt mit unterschiedlichen Schwerpunkten vorstellen.

### Erstellung eines Business Plans

Ein Business Plan ist ein dynamisches Dokument, das mit jeder Veränderung des Unternehmens umgeschrieben wird. In dieser ersten Version beschreibt der Plan den Weg des Projektes vom aktuellen Stand bis hin zum Markteintritt und prognostiziert Kosten und Umsätze über die ersten Jahre nach Markteinführung. Der Business Plan beschreibt zunächst die aktuelle Problemstellung, die derzeit gängigen Lösungsansätze und deren Unzulänglichkeiten, den Lösungsansatz mittels LIMITEX und dessen Alleinstellungsmerkmale. Anschließend werden die Schritte hin zu einer Marktautorisierung skizziert und die verbundenen Kosten abgeschätzt. Im Finanzplan wird dargelegt welche Kosten und welche Gewinnaussichten für das Unternehmen berechnet wurden. Neben den Kosten für die behördliche Zulassung sind auch Betriebs- und Herstellungskosten, die Kosten für die Distributoren-Netzwerke und die Gehälter der Beschäftigten einbezogen. Für die Gewinne sind Marktvolumen und Verkaufspreis zu bestimmen. Hier wurde einerseits auf die Anzahl der Bienenvölker abgehoben und mit einem über die Zeit wachsenden Marktsegment für LIMITEX. Die Verkaufskosten wurden auf der Basis von bestehenden Kosten und Rückmeldungen aus der Imkerschaft bestimmt. Entsprechend unserer Marktanalysen kalkulieren wir auf Basis einer konservativ abgeschätzten Marktpenetration von nur 0,5% im ersten, von 3% im zweiten und bis zu 10% im 3. Jahr nach Markteinführung. So gelingt bereits im zweiten Jahr nach der Zulassung das Erreichen der Gewinnzone. Mit € 20.- pro Einheit ist LIMITEX pro Dosis teurer als herkömmliche Mittel, doch ist nur eine Behandlung notwendig, zusätzliche Ausrüstung ist unnötig, und die Konsequenzen einer ineffizienten Varroa-Bekämpfung mit nachfolgenden Verlusten von Völkern machen LIMITEX gesamtheitlich zu einer kostengünstigeren Alternative zu bestehenden Behandlungskonzepten. Von € 20 Verkaufskosten müssen die Herstellungskosten (Cost of Goods, CoGs) abgerechnet werden, sowie Kosten für Lizenzen, Distributoren und Gemeinkosten. Die CoGs sind mit unter 10% besonders hervorzuheben. Zwischenzeitlich wurden bereits erste Gespräche mit Herstellern für LIMITX gesprochen. Da es sich bei Lithium Citrat um einen extrem günstigen Rohstoff handelt, können Tabletten oder Pulver für weniger als 18 Eurocent hergestellt werden. Nach Abzug aller Kosten verbleibt ein Profit von knapp 60% was € 12.- pro Einheit entspricht. Ein letzter Abschnitt des Business Plans befasst sich mit der Patentlage, der FTO (Freedom to Operate) sowie dem Team aus Gründern, Angestellten und Beratern. Mit der Fertigstellung des Business Plans können Investoren mit den notwendigen Informationen versorgt werden um eine erste Entscheidung zur Beteiligung am Projekt zu treffen.

## Erstellung eines Entwicklungsplans



**Abbildung 8:** Entwicklungsplan für LIMITEX

Ein weiteres Dokument das für die Zulassung von LIMITEX benötigt wird ist ein Entwicklungsplan. Hierbei werden alle Schritte (MRL, Qualität, Sicherheit, Wirksamkeit) in ein Zeitschema eingeordnet und die Abhängigkeiten der unterschiedlichen Aufgabenstellungen aufgezeigt. Grundlage dieses Dokuments ist die Einholung aller notwendiger Informationen zu den einzelnen Aufgaben. Zum Abgleich des Entwicklungsplans mit den Anforderungen der Behörde stehen Guidelines mit konkreten Maßgaben zur Verfügung (EMA/CVMP/EWP/459883/2008-Rev.1).

## Zusammenfassung der Behandlungsdaten

Mit der Zusammenfassung aller bislang erhobenen Daten aus den eigenen Projekten und publizierten Daten anderer Labors wurde ein präklinisches Paket zusammengestellt, an dem die Wirksamkeit von verschiedenen Lithium-Salzen (LiCl und LiCit.) in verschiedenen Formulierungen (Flüssigfutter und Futterteig), Konzentrationen (25mM und 50mM), Mengen und Abgabe-Routinen verglichen werden kann. Käfig-Versuche wurden gesondert zusammengefasst. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden dafür die Expositionen der einzelnen Biene berechnet. Dazu wurde die Größe des Volkes, die Menge und Konzentration des verwendeten Lithium Salzes und die Abnahmemenge in die Kalkulation einbezogen. Aus der so berechneten Exposition geht hervor, dass über einen weiten Expositions-Bereich, unabhängig von der Art der Formulierung eine sehr hohe Wirksamkeit erreicht werden kann. Der Bereich umfasst Expositionen zwischen 4 µmol und 12 µmol

Lithium pro Biene. Gleichzeitig geht aus der Darstellung hervor, dass in einigen Behandlungsversuchen die Wirksamkeiten in parallel behandelten Kolonien stark divergieren. Die Nachbetrachtung der Versuche ergab, dass die niedrigen Wirksamkeiten vor allem in Völkern beobachtet wurden, die mit einer niedrigen Varroa-Last in den Versuch gestartet waren. Bei niedrigen Varroazahlen schlägt sich die natürliche und unvermeidbare Re-Invasion von Milben statistisch stärker nieder und verfälscht so die Wirksamkeit der Behandlung. Daraus ergibt sich die Erkenntnis in nachfolgenden Wirksamkeitsstudien auf Völker zu setzen, die eine ausreichend hohe Milbenlast haben. Dies deckt sich mit der EU-Guideline, in der die Milbenlast für klinische Studien definiert wird. Gleichzeitig können diese Beobachtung in die Planung der geplanten Dosis-Eskalierungsstudie (LIDOFEX) einbezogen werden

#### Abfassung einer Synopse für eine Dosis-Eskalierungsstudie (LIDOFEX) unter klinischen Bedingungen

Zur Vorbereitung eines weiteren Lithium Expositionstest sollten alle Kenntnisse aus den vorhergehenden Versuchen einbezogen werden. Für den Versuch konnten zwei Prüfzentren gewonnen werden (Hohenheim, Veitshöchheim), die mit insgesamt 32 Versuchsvölkern die Wirksamkeit von Lithium-Citrat in Zuckersirup Dosis-abhängig untersuchen können. Ziel der Studie war einerseits eine Dosis mit optimaler Wirksamkeit bei minimaler Toxizität auf Bienen und Larven festzulegen. Zusätzlich sollte die Studie unter Bedingungen durchgeführt werden, die auch behördlicher Begutachtung standhält. Voraussetzung dafür ist die Erstellung einer Synopse, in der die Studie, die Ausleseparameter und die Randbedingungen definiert und niedergeschrieben werden. Ebenso werden Prüfprotokolle festgelegt, die bei der Studie zum Einsatz kommen. Im Rahmen der EASY LIFE Fördermaßnahme wurden sowohl Synopse als auch Prüfprotokolle in Zusammenarbeit mit den Prüfzentren festgelegt. Dazu wurden die Kriterien zur Auswahl der Versuchsvölker festgelegt (Größe, Milbenlast), die Menge und Konzentration von Lithium-Citrat in den verschiedenen Versuchsgruppen festgelegt (4000 ml Zuckerwasser, 1kg Zucker/1000 ml H<sub>2</sub>O). Für die Herstellung von Lithium Citrat wurde auf Lithium Carbonat und Citrat Monohydrat zurückgegriffen, da nur Lithium Carbonat in API Qualität erhältlich ist. Bei der Lösung von Lithium Carbonat und Citrat geht das Carbonat als CO<sub>2</sub> in die Gasphase. Die gewählten Konzentrationen waren 50mM, 37 mM, 25 mM und 12,5 mM bezogen auf die gelösten Lithium Ionen. Ausleseparameter sind Milbenfalls, Brutschäden, Totenfall von Bienen vor dem Flugloch, Beobachtung der Bienen am Flugloch. Als Proben wurden Bienen und Honig aus verschiedenen Bereichen des Bienenstocks vorgesehen. Die Synopse und die Prüfprotokolle können von den Versuchsleitern bzw. von den Versuchs-durchführenden Imkern unterschrieben werden. Die Durchführung der Versuche wurde für den Zeitraum August – Oktober 2024 vorgesehen und liegt

somit außerhalb des Bericht-Zeitraums. Die Ergebnisse aus dem Versuch aber kommt wesentliche Bedeutung bei der Entwicklung von LIMITEX und der Investorensuche zu.

### Zusammenfassung

Aus den Untersuchungen der Larven von Drosophila zur Wirkung von Lithium sind die Ergebnisse zu phänotypischen Veränderungen wichtig für das Verständnis. Die Larvalentwicklung wird über alle 3 Stadien in Hinsicht auf Entwicklungsgeschwindigkeit und das Wachstum gestört. Die Metamorphose im Puppenstadium ist aber unbeeinträchtigt. Dabei werden nicht alle Larven trotz identischem Alter und gleicher Exposition gleich stark betroffen. In Zusammenhang mit Daten aus der Expressionsanalyse lassen sich die Auswirkung auf Cuticula-regulierende Gene mit Wachstum, Häutung, Stoffwechsel und Reifung korrelieren. Die ungleiche Stärke der Auswirkung wurde experimentell weiter hinterfragt und zeigte, dass durch gezielte Züchtung mit adulten Fliegen, die das Larval- und Puppenstadium schnell durchlaufen, eine Subpopulation mit verbesserter Resilienz gegen Lithium angereichert werden konnte. Die Daten zeigen, dass eine Züchtung von resilienten Bienen möglich sein könnte. Eine Resistenz der Milben gegen Lithium ist damit nicht gezeigt, da die toxische Wirkung auf Milben nicht deren Larvalstadium betrifft. Weitere Erkenntnisse erwarten wir aus Experimenten mit phänotypisch betroffenen „Petit“-Larven von Drosophila. Hier soll versucht werden die Drosophila Gene zu identifizieren, die das Wachstum inhibieren um dann in Bienen die Deregulation homologer Gene nachzuweisen.

Direkte Verwertbarkeit ergibt sich aus den Aktivitäten für eine wirtschaftliche Nutzung durch die Gründung der Firma Varolis sowie der Bereitstellung wichtiger Dokumente wie Business Plan, Präsentationen, Internetauftritt und Dossiers zu Lithium und dem aktuellen Stand der Forschung. Ebenso war die Vorbereitung auf EIC Förderung und das EIT Seed-Programm wichtig für die Kontaktaufnahme zu potentiellen Investoren.

### **5) Projekt-relevante Ergebnisse anderer Einrichtungen**

Die folgenden Publikationen wurden im Projektzeitraum veröffentlicht und bestätigen die Wirkung von Lithium Salzen als Wirkstoff zur Bekämpfung von Varroa Milben aber auch einer anderen parasitischen Milbenart. Es wurden unterschiedliche Salze in unterschiedlichen Mengen, Konzentrationen, Formulierungen und Applikationsmethoden erprobt und Wirksamkeit, Verträglichkeit und Rückstände erprobt.

- Kolics B, Kolics É, Mátyás K, Taller J, Specziár A. Comparison of Alternative Application Methods for Anti-Varroa Lithium Chloride Treatments. Insects. 2022 Jul 15;13(7):633. doi: 10.3390/insects13070633. PMID: 35886809; PMCID: PMC9318583.

- Jovanovic NM, Glavinic U, Ristanic M, Vejnovic B, Stevanovic J, Cosic M, Stanimirovic Z. Contact varroacidal efficacy of lithium citrate and its influence on viral loads, immune parameters and oxidative stress of honey bees in a field experiment. *Front Physiol.* 2022 Sep 12;13:1000944. doi: 10.3389/fphys.2022.1000944. PMID: 36171978; PMCID: PMC9510912.
- Kolics B, Mátyás K, Solti I, Bacsí Z, Kovács S, Specziár A, Taller J, Kolics É. Efficacy of In Vitro Lithium Chloride Treatments on *Dermacentor reticulatus*. *Insects.* 2023 Jan 20;14(2):110. doi: 10.3390/insects14020110. PMID: 36835679; PMCID: PMC9960498.
- Erdem B, Arslan OC, Sevin S, Gozen AG, Agosto-Rivera JL, Giray T, Alemdar H. Effects of lithium on locomotor activity and circadian rhythm of honey bees. *Sci Rep.* 2023 Nov 13;13(1):19861. doi: 10.1038/s41598-023-46777-7. PMID: 37963948; PMCID: PMC10646147.
- Kolics É, Sajtos Z, Mátyás K, Szepesi K, Solti I, Németh G, Taller J, Baranyai E, Specziár A, Kolics B. Changes in Lithium Levels in Bees and Their Products Following Anti-Varroa Treatment. *Insects.* 2021 Jun 25;12(7):579. doi: 10.3390/insects12070579. PMID: 34202123; PMCID: PMC8304643.
- Kolics B, Kolics É, Solti I, Bacsí Z, Taller J, Specziár A, Mátyás K. Lithium Chloride Shows Effectiveness against the Poultry Red Mite (*Dermanyssus gallinae*). *Insects.* 2022 Nov 1;13(11):1005. doi: 10.3390/insects13111005. PMID: 36354829; PMCID: PMC9694377.

## 6) erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Es sind keine eigenen Veröffentlichungen erfolgt oder geplant. Die Veröffentlichungen des Projektpartners sind aus dessen Sachbericht zu entnehmen.