

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Referenzsystem für ein vitales Bienenvolk

„FIT BEE“

Modul 4, Teilprojekt 8

Zuwendungsempfänger:

BioSolutions Halle GmbH
Weinbergweg 22
06120 Halle

Förderkennzeichen:

281 710 0810

Laufzeit:

01.04.2011 bis 31.08.2015

Monat der Erstellung: **02/2016**

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Bundesanstalt für Ernährung BLE als Projektträger des BMEL im Rahmen der Innovationsförderung unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

I. Kurze Darstellung zu

I.1 Aufgabenstellung

Ziel des Verbundansatzes war das gesunde, vitale Bienenvolk („FIT BEE“). Alle Module zielten im Rahmen eines integrierten Netzwerkes darauf ab, die komplexen Wechselwirkungen zwischen Einzelbienen, Bienenvolk, Bienenkrankheiten und Umweltparametern besser zu verstehen, daraus die Bedingungen für ein gesundes Bienenvolk zu definieren und diese durch gezielte Maßnahmen zu verbessern.

- 1. Beurteilung von Parametern zur Beschreibung der Vitalität von Bienenvölkern (Definition des Referenzmodells „vitaler Bienenvolk“).** Dabei wurden auf verschiedenen Ebenen (Einzelbiene, Bienenvolk, Bienenstand) diejenigen Parameter definiert und quantifiziert, die für die Gesundheit des Bienenvolkes maßgebend sind (Abb. 1).
- 2. Erforschung multifaktorieller Einflüsse auf die Vitalität von Einzelbienen und auf das Bienenvolk.** In unterschiedlichen Versuchsansätzen wurden die Einflüsse von Krankheiten, Pflanzenschutzmitteln und Ernährungsqualität allein und in Kombination untersucht und dabei ein Versuchsmodell etabliert sowie Diagnosewerkzeuge für die entsprechenden Schadensschwellen entwickelt (Abb. 1).
- 3. Erforschung von Bienenkrankheiten.** Hier sollten Lösungen erarbeitet werden für die zwei derzeit wichtigsten Bienenkrankheiten im Zusammenhang mit Bienenverlusten in Deutschland: Die Varroa-Milbe und die Nosemose. Für beide wurden neue Bekämpfungs- bzw. Vorbeugungsverfahren entwickelt. Die Untersuchung der Transmission von Pathogenen von Volk zu Volk soll die Entwicklung neuer imkerlicher Maßnahmen zur Brechung der Infektionskette ermöglichen (Abb. 1).
- 4. Untersuchungen zur Bedeutung von landwirtschaftlichen Produktionsverfahren.** Hierbei sollten mit dem Schwerpunkt Raps die chronischen und subletalen Einflüsse von Pollenernährung und Pflanzenschutzmitteln untersucht und Verfahren erarbeitet werden, um (a) eine ausreichende Pollenversorgung sicher zu stellen und (b) den Eintrag von Pflanzenschutzmitteln ins Bienenvolk zu reduzieren (Abb. 1).

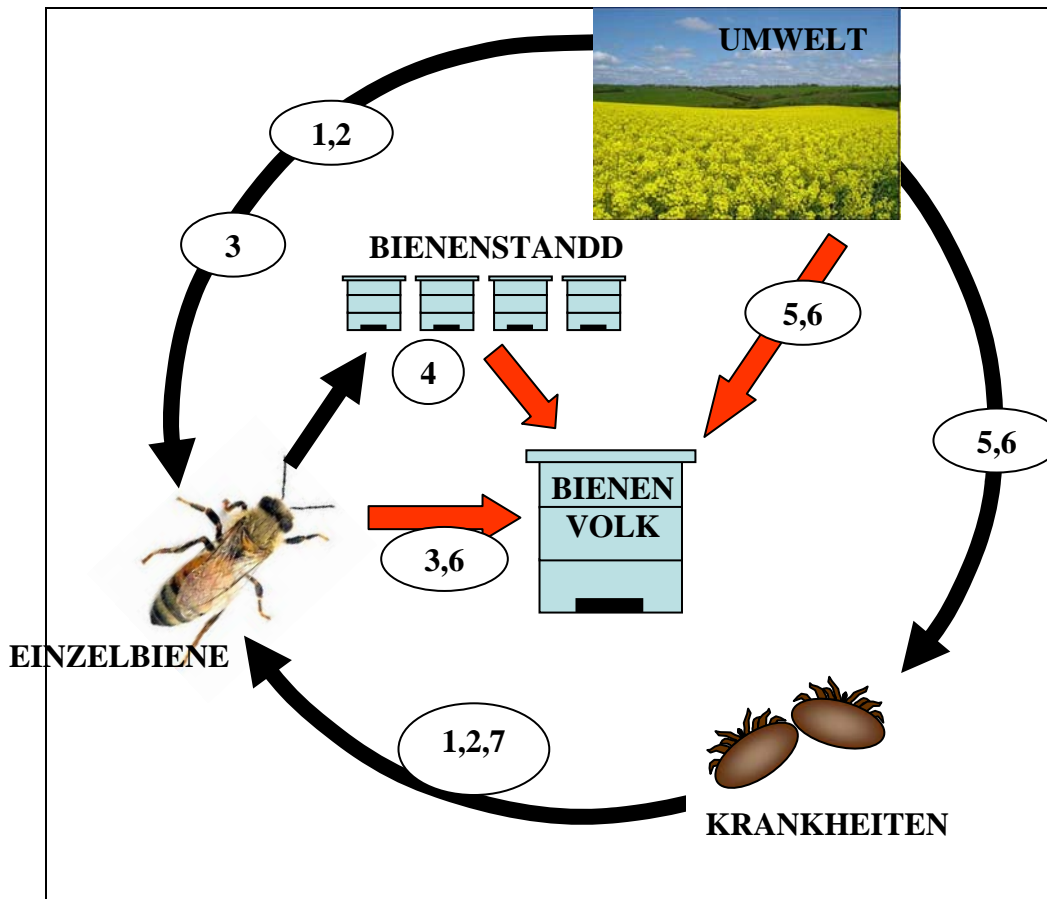


Abb. 1: Einfluss und Vernetzung verschiedener Faktoren auf die Gesundheit des Bienenvolkes. Umwelt, Bienenstand und die Gesundheit der Einzelbienen haben einen direkten Einfluss auf die Vitalität des Bienenvolkes (rote Pfeile). Die Nummern beziehen sich auf die insgesamt 7 „FIT BEE“ Module.

Der Beitrag von BSH war auf Modul 4 fokussiert mit dem Ziel, virenbedingte Bienenerkrankungen mittels moderner molekularbiologischer Methoden schnell zu diagnostizieren, die standortbezogene Ausbreitung von Bienenkrankheiten zwischen Bienenvölkern zu verstehen und am Ende durch die Entwicklung geeigneter imkerlicher Maßnahmen nachhaltig zu vermeiden

1.2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Grundvoraussetzung für die Beantragung und Durchführung des Verbundprojektes FITBEE ist die Tatsache, dass die Bienenhaltung selbst zur Ausbreitung und Virulenz von Pathogenen beiträgt. Standorte mit hoher Attraktivität für Wanderimker weisen oftmals extrem hohe Bienenvolkdichten auf, mit idealen Voraussetzungen für die Übertragung von Krankheiten. Der „Colony Collapse Disorder“ in den USA wird zum Beispiel auf die extrem hohen Koloniedichten für die Mandelblüten-Bestäubung in Kalifornien zurückgeführt. Die Transmission von Volk zu Volk wird dabei besonders durch verfliegende Arbeiterinnen und Drohnen gefördert. Gerade die Drohnen, obwohl bekannt für Verflug, sind bezüglich der

Krankheitsübertragung und einer möglichen Funktion als Vektoren von Infektionen fast nicht untersucht. Zudem lassen die subletalen Effekte von Pflanzenschutzmitteln auf das Verhalten von Bienen hier eine Interaktion von Pflanzenschutzmitteln, Verflug und Transmission von Pathogenen vermuten. Die kranken oder geschädigten Tiere könnten durch ein reduziertes Heimfindevermögen verstärkt Pathogene übertragen: ein Mechanismus, der in der Evolution von Wirt-Parasit-Systemen sehr häufig beobachtet wird. Die Quantifizierung dieser Mechanismen, die die Transmission von Krankheiten verursachen und die Diagnose von Pathogenen standen daher im Focus der Teilprojekte an denen die Firma BioSolutions beteiligt war.

Das Teilprojekt 8, Modul 4 der Firma BioSolutions Halle GmbH wurde im Rahmen des Verbundprojektes „Referenzsystem für ein vitales Bienenvolk“ (Fit Bee) mit Mitteln der Innovationsförderung der BLE durchgeführt. Für die im Rahmen des Projektvorhabens durchzuführenden Arbeiten standen im Unternehmen mikro- und molekularbiologische Laboratorien der Sicherheitsstufe L2 zur Verfügung. Die Laboratorien der BioSolutions Halle GmbH verfügen über ein Qualitätsmanagementsystem, welches an die ISO 9001 sowie die Regeln für „Gute Laborpraxis“ (GLP) angelehnt ist.

Für das Projektvorhaben konnten folgende Geräte und Einrichtungen genutzt werden:

- mikrobiologisches Labor (Sicherheitsstufe L2)
- molekularbiologisches Labor (Sicherheitsstufe L2)
- Sterilwerkbank
- molekularbiologische Geräte (PCR, Real Time PCR, Thermoshaker, Geldokumentationssystem)

Die Forschungs- und Entwicklungsarbeiten wurden über die gesamte Projektlaufzeit in enger Zusammenarbeit mit den Projektpartnern an der MLU durchgeführt. Die BioSolutions Halle GmbH lieferte dabei vor allem molekularbiologisches Know-How für die Entwicklungsarbeiten beider Projektpartner für Nukleinsäure-basierte Analyseverfahren von Viren und Honigbienen.

Wissenschaftliche Voraussetzungen, unter denen das Teilprojekt durchgeführt wurde, waren Veröffentlichungen zur RESTseq Technologie sowie die Quantifizierung von neuen gefundenen Honigbienen-Viren mittels PCR basierten Diagnoseverfahren.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Zunächst war ein Projektzeitraum von 36 Monaten vom 01.04.2011 bis 31.03.2014 vorgesehen. Dem Verbundprojekt wurde jedoch eine Verlängerung genehmigt, so dass das Projekt insgesamt vom 1.4. 2011 bis zum 31.08.2015 durchgeführt werden konnte.

Geplant war die Entwicklung einer Probenaufarbeitungsmethode zur Gewinnung der Nukleinsäuren aus den ABPV - befallenen Bienen mit einem entsprechenden molekularbiologischen Nachweisverfahren für ABPV. Dies erfolgte in drei Meilensteinen:

- | | |
|-----------------------------------|---|
| M 1:
(nach 12 Monaten) | Methode zur Probenaufarbeitung und Nukleinsäureextraktion von ABPV aus Bienen |
| M 2:
(nach 24 Monaten) | Molekularbiologisches Schnelltestverfahren zum Nachweis von ABPV aus Bienen |
| M 3:
(nach 32 Monaten) | Validierung eines praxisnahen Verfahrens für den Schnellnachweis von ABPV in Bienen |

Im Berichtszeitraum vom 01.4.2011 – 31.12.2011 wurde eine Multiplex PCR entwickelt, in der gleichzeitig alle Viren quantitativ erfasst werden können. Bei dem Assay wurden die Primer so designed, dass sie in der PCR Amplikons mit jeweils Art- bzw. Virus spezifischen Größen produzieren. Somit kann in einer Gelelektrophorese direkt die Art oder der Virus anhand der spezifischen Größe der Bande bestimmt werden. Die Assays wurden zur Verwendung der automatischen Elektrophorese Qiaxcel (Qiagen) konzipiert, daher sind alle Amplikons kleiner als 400bp.

Für alle Pathogene wurde eine Positivkontrolle erstellt (PCR-Produkt im Plasmid kloniert) Für DWV, BQCV, SBV und *Nosema* spp. konnte die Multiplexreaktion optimiert werden.

Im Berichtszeitraum vom 01.1.2012 – 31.12.2012 wurde das Verfahren für zusätzliche Pathogene erweitert. Zusätzlich zu den 2 *Nosema*-Pathogenen wurden 6 Viren erfolgreich getestet und in drei Multiplex-Reaktionen eingeteilt. Damit konnten gute Ergebnisse erzielt werden, die, was die Sensitivität und Robustheit angeht, vergleichbar mit anderen Methoden ist.

Im Berichtszeitraum 01.01.2013 – 31.12.2013 wurden zahlreiche weitere Veränderungen von Primersequenzen empirisch getestet, um Unspezifitäten, geringe Effizienzen oder Probleme der Produktgröße (Kompatibilität/Unterscheidbarkeit zu anderen Produkten) zu klären. Dies betraf *Nosema apis* und *Nosema ceranae* (4 forward Primer), SBPV (1 Primer), BQCV (2 Primer), LSV (4 Primer), VDV und DWV (2 Primer), ABPV (1 Primer). Zusätzlich erachteten wir nach den Erfahrungen der Massenscreenings (u.a. mit MLPA) die Einbindung von internen Kontrollen für sinnvoll. Daher haben wir weiter Primer entwickelt, die unabhängige Loci in demselben Virustarget amplifizieren. Damit sollten bei einer positiven Probe beide Loci detektiert und so eine größere Sicherheit der Detektion erzielt werden. Für die

Komplexe VDV-DWV, ABPV-IAPV-KBV sowie für Nosema spp. wurden statt mehrerer Zusatzprimer jeweils nur 1 allgemein funktionierender Primer entwickelt.

Im Berichtszeitraum 01.01.2014 – 31.12.2014 gab es eine Unterbrechung der Arbeiten bei BSH, da der Bearbeiter zum 01.04.2014 die Firma verlassen hatte und erst zum November 2014 eine neue Mitarbeiterin zur Bearbeitung des Themas abgestellt werden konnte.

Es wurden alle vorhandenen Viren-Targets kloniert und liegen als Positivkontrollen vor. Für alle vorhandenen Konstrukte wurden bereits umfangreiche Tests zur Charakterisierung durchgeführt. Dies beinhaltete Verdünnungsreihen zur Determinierung der Sensitivität sowie Gradienten-PCRs zur Feststellung der Reaktionsoptima. Zusätzlich zu bereits durchgeführten Multiplex-Tests wurden alle neuen und veränderten Primer in neuen Multiplex-Tests auf gegenseitige Kompatibilität überprüft. Basierend auf diesen empirischen Erfahrungen wurden die Targets in drei Multiplex-Gruppen eingeteilt um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden,

Im Berichtszeitraum 01.03.2015 – 31.08.2015 wurden durch BioSolutions keine zusätzlichen FITBee-Fördermittel in Anspruch genommen. BioSolutions hat sich jedoch mit eigenen Mitteln weiterhin am Projekt beteiligt. Da DNA-Hybridisierungstechniken zur Gendiagnose methodisch ein auslaufendes Verfahren sind und zunehmend Kompletengenomanalysen im Bereich der Gendiagnostik eingesetzt werden, wurde im letzten Jahr in Kooperation mit der AG Moritz (MLU) an einem Kit für die 2013 entwickelte RESTseq Methode gearbeitet. Es handelt sich um ein neues Verfahren, das umfangreiche genomische Analysen auch auf Next Generation Sequencing Benchtop-Geräten ermöglicht (RESTseq Stolle & Moritz 2013). Wir arbeiten dabei mit stark reduzierten Genbanken, die wir vor der Sequenzierung aus den Kompletengenomen extrahieren. Während Großgeräte alles sequenzieren und dann die Daten durch geeignete Algorithmen reduzieren, reduziert unser Verfahren das Genom vor der Sequenzierung und konzentriert sich auf vorher ausgewählte Genombereiche. Diese Analysen können daher auch auf den kleineren Benchtop-Plattformen durchgeführt werden. Die Ergebnisse auf den personal genom Maschinen liegen innerhalb weniger Tage vor, während man bei der Einsendung der Proben an großen Genomzentren Monate auf Ergebnisse warten muss. Im FITBEE Projekt wurde die Methode zunächst in Pilotexperimenten eingesetzt. Sie ist besonders zur detaillierten Pathogendiagnostik und zur genomischen Charakterisierung der Bienenvölker geeignet. Es ist damit möglich, die Transmission über stockfremde Bienen in nur einem Genomchip darzustellen. Die Methode ist allerdings nicht auf Bienengesundheit beschränkt und reicht weit darüber hinaus. Sie lässt sich von der genetischen Diagnostik im klinischen Labor und der Forensik über die Genomik in der Tier- und Pflanzenzucht bis hin zur Populationsgenomik und der Biodiversitätsforschung einsetzen und ist somit gut geeignet für:

- 1) Hochauflösende Genomkartierung
 - 2) Bestimmung genetischer Ursachen und Prädispositionen für Erbkrankheiten
 - 3) DNA-Analytik in der Forensik und Verwandtschaftsanalyse
 - 4) Zuchtwertbestimmungen in der Tier und Pflanzenzucht
 - 5) Evolutions- und Selektionsprozesse in der Natur (z.B. als Antwort auf den Klimawandel)
- Das Verfahren wurde im Jahr 2014 mit dem Innovationspreis der Stadt Halle ausgezeichnet. Ein Antrag zur Gründung einer Startup Firma zur kommerziellen Nutzung des Verfahrens ist derzeit bei der Innovationsbank des Landes Sachsen-Anhalt in der Prüfung. Wir halten dies für das wichtigste Ergebnis aus dem FITBEE Projekt. Die Ergebnisse reichen damit weit über die ursprünglichen Planungen hinaus und zeigen, wie aus einem Vorhaben, das zunächst ausschließlich für die Bienengesundheit konzipiert war, sich ein sehr breites Anwendungsfeld eröffnet.

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand

I.4.1 Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die zur Durchführung des Vorhabens benutzt wurden

Verfahren:

- PCR-Nachweisverfahren
- RealTime-PCR-Nachweisverfahren
- Next Generation Genomanalyse (Ion Torrent Personal Genome Machine)

Darüber hinaus wurden nach derzeitigem Kenntnisstand der Verfasser keine weiteren Schutzrechte oder Verfahren verwendet.

I.4.2 Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Literatur

- Andolfatto P, Davison D, Erezyilmaz D, Hu TT, Mast J, et al. (2011) Multiplexed shotgun genotyping for rapid and efficient genetic mapping. *Genome Research* 21: 610–617 doi:10.1101/gr.115402.110.610.
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, et al. (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PloS one* 3: e3376 doi:10.1371/journal.pone.0003376.
- Baxter SW, Davey JW, Johnston JS, Shelton AM, Heckel DG, et al. (2011) Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. *PloS one* 6: e19315 doi:10.1371/journal.pone.0019315.
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, et al. (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 12: 499–510. doi: 10.1038/nrg3012
- Elshire R, Glaubitz J, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, et al. (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one* 6: e19379 doi:10.1371/journal.pone.0019379.

- Hohenlohe PA, Bassham S, Etter PD, Stiffler N, Johnson EA, et al. (2010) Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. *PLoS genetics* 6: e1000862 doi:10.1371/journal.pgen.1000862.Literaturangaben??
- Hunt GJ, Page REJ (1995) Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics* 139: 1371–1382.
- Lattorff HMG, Moritz RFA (2008) Recombination Rate and AT-content Show Opposite Correlations in Mammalian and Other Animal Genomes. *Evolutionary Biology* 35: 146–149 doi:10.1007/s11692-008-9019-6.
- Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, et al. (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature Biotechnology* 30: 434–439 doi:10.1038/nbt.2198.
- Luca F, Hudson RR, Witonsky DB, Di Rienzo A (2011) A reduced representation approach to population genetic analyses and applications to human evolution. *Genome Research* 21: 1087–1098 doi:10.1101/gr.119792.110.21.
- Ma X-F, Jensen E, Alexandrov N, Troukhan M, Zhang L, et al. (2012) High resolution genetic mapping by genome sequencing reveals genome duplication and tetraploid genetic structure of the diploid *Miscanthus sinensis*. *PLoS one* 7: e33821 doi:10.1371/journal.pone.0033821.
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE (2012) Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS one* 7: e37135 doi:10.1371/journal.pone.0037135.
- Stolle E, Moritz RFA (2013): RESTseq – Efficient Benchtop Population Genomics with RESTriCTION Fragment SEQUencing. DOI: 10.1371/journal.pone.0063960
- Tassell CPV, Smith TPL, Matukumalli LK, Taylor JF, Schnabel RD, et al. (2008) SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. *Nature Methods* 5: 247–252 doi:10.1038/NMETH.1185.
- van Orsouw NJ, Hogers RCJ, Janssen A, Yalcin F, Snoeijers S, et al. (2007) Complexity reduction of polymorphic sequences (CRoPS): a novel approach for large-scale polymorphism discovery in complex genomes. *PLoS one* 2: e1172 doi:10.1371/journal.pone.0001172.
- Wang S, Meyer E, McKay JK, Matz MV (2012) 2b-RAD: a simple and flexible method for genome-wide genotyping. *Nature Methods* 9: 808–810 doi:10.1038/nmeth.2023.

Informations- Dokumentationssysteme

- National Center for Biotechnology Information (NCBI)

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Während des gesamten Projektzeitraums wurde sehr eng mit den AGs Moritz und Paxton (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie) zusammengearbeitet.

II. Eingehende Darstellung

II. 1 der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Ziel des Verbundansatzes war das gesunde, vitale Bienenvolk („FIT BEE“). Alle Module zielten im Rahmen eines integrierten Netzwerkes darauf ab, die komplexen Wechselwirkungen zwischen Einzelbienen, Bienenvolk, Bienenkrankheiten und Umweltparametern besser zu verstehen, daraus die Bedingungen für ein gesundes Bienenvolk zu definieren und diese durch gezielte Maßnahmen zu verbessern.

1. **Beurteilung von Parametern zur Beschreibung der Vitalität von Bienenvölkern (Definition des Referenzmodells „vitales Bienenvolk“).** Dabei wurden auf verschiedenen Ebenen (Einzelbiene, Bienenvolk, Bienenstand) diejenigen Parameter definiert und quantifiziert, die für die Gesundheit des Bienenvolkes maßgebend sind (Abb. 1).
2. **Erforschung multifaktorieller Einflüsse auf die Vitalität von Einzelbienen und auf das Bienenvolk.** In unterschiedlichen Versuchsansätzen wurden die Einflüsse von Krankheiten, Pflanzenschutzmitteln und Ernährungsqualität allein und in Kombination untersucht und dabei ein Versuchsmodell etabliert sowie Diagnosewerkzeuge für die entsprechenden Schadensschwellen entwickelt (Abb. 1).
3. **Erforschung von Bienenkrankheiten.** Hier wurden Lösungen erarbeitet für die zwei derzeit wichtigsten Bienenkrankheiten im Zusammenhang mit Bienenverlusten in Deutschland: Die Varroa-Milbe und die Nosemose. Für beide wurden neue Bekämpfungs- bzw. Vorbeugungsverfahren entwickelt. Die Untersuchung der Transmission von Pathogenen von Volk zu Volk wird die Entwicklung neuer imkerlicher Maßnahmen zur Brechung der Infektionskette ermöglichen (Abb. 1).
4. **Untersuchungen zur Bedeutung von landwirtschaftlichen Produktionsverfahren.** Hierbei wurden mit dem Schwerpunkt Raps die chronischen und subletalen Einflüsse von Pollenernährung und Pflanzenschutzmitteln untersucht und Verfahren erarbeitet, um (a) eine ausreichende Pollenversorgung sicher zu stellen und (b) den Eintrag von Pflanzenschutzmitteln ins Bienenvolk zu reduzieren (Abb. 1).

Der Beitrag von BSH hatte das Ziel, virenbedingte Bienenerkrankungen mittels moderner molekularbiologischer Methoden schnell zu diagnostizieren, die standortbezogene Ausbreitung von Bienenkrankheiten zwischen Bienenvölkern zu verstehen und am Ende durch die Entwicklung geeigneter imkerlicher Maßnahmen nachhaltig zu vermeiden

Das Ziel dieses Projektteils war es, einen Schnelltest zu entwickeln, um Honigbienenpathogene nachzuweisen. Es wurde ein Assay konzipiert, der auf der Standardtechnik PCR basiert. PCR ist eine robuste, relativ einfache, schnelle und kostengünstige Methode. Für eine höhere Effizienz an Zeit, Arbeit und Kosten werden in einem Assay mehrere Pathogene gleichzeitig in einer Multiplex-Reaktion nachgewiesen.

Hierzu wurde zunächst die Probenaufarbeitungsmethode zur Gewinnung der Nukleinsäuren etabliert. Ein Focus lag bei der Detektion von Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) für das noch keine Diagnose mit einem entsprechenden molekularbiologischen Nachweisverfahren vorlag. Dies erfolgte in drei Meilensteinen

M 1: (nach 12 Monaten)	Methode zur Probenaufarbeitung und Nukleinsäure Extraktion von ABPV aus Bienen
M 2: (nach 24 Monaten)	Molekularbiologisches Schnelltestverfahren zum Nachweis von ABPV aus Bienen
M 3: (nach 32 Monaten)	Validierung eines praxisnahen Verfahrens für den Schnellnachweis von ABPV in Bienen

Im Berichtszeitraum vom 01.04.2011 – 31.12.2011 wurde zudem ein Multiplex PCR Verfahren entwickelt, in dem gleichzeitig alle Viren quantitativ erfasst werden können.

Folgende Viren-Pathogene sollen nachgewiesen werden:

1 DWV	Deformed Wing Virus
2 VDV1	<i>Varroa destructor</i> Virus 1
3 BQCV	Black Queen Cell Virus
4 SBV	Sacbrood Virus
5 CBPV	Chronic Bee Paralysis Virus
6 ABPV	Acute Bee Paralysis Virus
7 KBV	Kashmir Bee Virus
8 IAPV	Israel Acute Bee Paralysis Virus
9 SBPV	Slow Bee Paralysis Virus
10 VaMLV	<i>Varroa destructor</i> Makula-like Virus
11 IV	Iridovirus

Zusätzlich wurden noch die Darmparasiten *Nosema apis* und *N. ceranae* in das Screening mit aufgenommen, da sie im Verdacht standen besonders für Völkerverluste verantwortlich zu sein. Bei dem PCR-Assay wurden die DNA-Primer so konzipiert, dass sie in der PCR Amplikons mit jeweils Art- bzw. Virus spezifischen Größen produzieren. Somit kann in einer Gelelektrophorese direkt die Art oder der Virus anhand der spezifischen Größe des DNA-

Fragments bestimmt werden. Die Assays wurden zur Verwendung der automatischen Kapillar-Gelelektrophorese Qiaxcel (Qiagen) konzipiert, daher sind alle Amplikons kleiner als 400bp. Für alle Pathogene wurde eine Positivkontrolle erstellt (PCR-Produkt im Plasmid in *E. coli* kloniert). Für DWV, BQCV, SBV und *Nosema* spp. konnte die Multiplexreaktion optimiert werden.

Im Berichtszeitraum vom 01.1.2012 – 31.12.2012 wurde das Verfahren für zusätzliche Pathogene erweitert und das Verfahren weiter optimiert. Aufgrund von Schwierigkeiten bezüglich Spezifität und Sensitivität wurden weitere Anpassungen der Methodik vorgenommen, wobei das prinzipielle Konzept beibehalten wurde. Dadurch wurde die Zuverlässigkeit und Sensitivität des qualitativen Nachweises deutlich verbessert. Mit getaggen reverse Primern wurde eine kurze und Virus- bzw. Viruskomplex-spezifische cDNA --Synthese durchgeführt. In die Reaktion wurden relativ kurze forward Primer beigefügt sowie eine hotStart Taq Polymerase, die bei der Temperatur der cDNA-Synthese noch inaktiv ist. Somit konnte von der cDNA-Synthese direkt in eine erste PCR mit einigen Zyklen übergegangen werden, in der unverbrauchte reverse cDNA Primer als reverse PCR Primer dienen. Die so doppelsträngig und bereits leicht amplifiziert vorliegenden DNA-targets werden als Template für eine zweite, spezifische PCR verwendet. Hierzu werden sehr lange, Virus-(target)-spezifische Primer als forward, und ein einziger, langer reverse Primer (tag) als reverse Primer verwendet um die Annealing-Temperaturen hoch zu halten. Das vermeidet eine erfolgreiche Bindung der zuvor verwendeten kurzen forward Primer. Eine solche nested PCR erwies sich als deutlich effizienter und robuster als der zuvor favorisierte Ansatz, die cDNA als PCR template zu verwenden.

Einige weitere Änderungen betreffen die spezifischen Primer, die aufgrund von Multiplex-Inkompatibilitäten neu designed werden mussten. Zusätzlich zu den 2 *Nosema*-Pathogenen, wurden sechs Viren erfolgreich getestet und in drei Multiplex-Reaktionen eingeteilt. Damit konnten gute Ergebnisse erzielt werden, die, was die Sensitivität und Robustheit anbelangt, vergleichbar mit anderen Methoden war. Desweiteren zeigte sich gegenüber herkömmlichen Methoden bzw. Konkurrenzprodukten (MLPA) eine deutlich Zeit- und Kostenersparnis von mehr als 50%.

Im Berichtszeitraum 01.01.2013 – 31.12.2013 wurden zahlreiche weitere Veränderungen von Primersequenzen empirisch getestet, um Unspezifitäten, geringe Effizienzen oder Probleme der Produktgröße (Kompatibilität/Unterscheidbarkeit zu anderen Produkten) zu klären. Dies betraf *Nosema apis* und *Nosema ceranae* (4 forward Primer), SBPV (1 Primer), BQCV (2 Primer), LSV (4 Primer), VDV und DWV (2 Primer), ABPV (1 Primer). Zusätzlich erachteten wir nach den Erfahrungen der Massenscreenings (u.a. mit MLPA) die Einbindung von internen Kontrollen für sinnvoll. Daher haben wir weitere Primer entwickelt, die unabhängige

Loci in demselben Virustarget amplifizieren. Damit sollten bei einer positiven Probe beide Loci detektiert und so eine größere Sicherheit der Detektion erzielt werden. Für die Komplexe VDV-DWV, ABPV-IAPV-KBV sowie für Nosema spp. wurden statt mehrerer Zusatzprimer jeweils nur 1 allgemein funktionierender Primer entwickelt.

Unserer ursprünglichen Methodik sowie sämtlichen alternativen Methoden (z.B. MLPA, De Smet et al. 2012 BeeDoctor, a Versatile MLPA-Based Diagnostic Tool for Screening Bee Viruses. PLoS ONE 7(10): e47953. doi:10.1371/journal.pone.0047953) ist gemeinsam, dass die typischerweise vorliegenden starken Unterschiede in der Abundanz der unterschiedlichen Transkripte (Kontrollgen-Transkripte, Virusgenom-Kopien) eine effiziente Detektion behindern. Meist ist die Anzahl der Kontrollgen-Transkripte deutlich höher als die von möglichen Viren, wodurch deren Signal das der Viren überdeckt. Auch können einzelne Viren durch ihre extrem hohe Kopienzahl die Detektion von anderen Viren behindern. Um dies auszugleichen, haben wir eine Anpassung unseres Assays vorgenommen. Die in der ersten PCR verwendeten Primer werden nun in nur sehr kleinen Mengen eingesetzt. Wir haben empirisch eine Verdünnung der Primerlösung von etwa 700-1000 fach (gegenüber einer üblichen 10-fachen Verdünnung) als ideal ermitteln können.

Diese geringe Menge führt zwar zu einer Erschöpfung der Primermoleküle nach wenigen PCR Zyklen, dies jedoch in Abhängigkeit von der Anzahl der Target-Transkripte. Wenige Kopien werden so über mehr Zyklen weiter amplifiziert als solche Targets, bei denen der Primer durch eine hohe Kopienanzahl früher aufgebraucht wird.

Durch aktuelle Publikationen wurden weitere Honigbienen-viren bekannt (Runckel et al. PLoS ONE 6(6): e20656, LSV – Lake Sinai Virus, BSRV – Big Sioux River Virus, ALPV – Aphid Lethal Paralysis Virus), von denen LSV und ALPV bereits in Europa gefunden wurden, wie aus einer im Frühjahr 2013 veröffentlichten Studie hervorgeht (Granberg et al. 2013, PLoS ONE 8(2): e57459. doi:10.1371/journal.pone.0057459). Da diese Viren durchaus relevant sein können, entschieden wir uns für einen Versuch, diese Viren in den Assay zu integrieren. Die Virus-Sequenzen sind publiziert, so dass entsprechende Primer abgeleitet werden konnten. LSV konnte mit MLPA in einer Probe verdachtsmäßig gefunden werden, jedoch waren Primertests bislang meist negativ. Ein zweiter LSV Locus konnte einmal erfolgreich amplifiziert, diese Genomregion jedoch noch nicht erfolgreich kloniert werden. Daher konnte die Sensitivität und Spezifität dieses und der anderen Primer noch nicht gemessen werden. ALPV wurde bislang nicht aufgefunden bzw. amplifiziert, obwohl es aus MLPA screens Verdachtsfälle gibt.

Nach erneuter Literaturrecherche sowie Konsultation von weiteren Experten wurden zwei Viren aus dem Assay ausgeschlossen. Für diese konnten keine positiven Proben gefunden werden (auch nicht über Publikationen anderer), an denen der Assay testbar wäre. Der

Iridovirus (IV) sowie der Varroa Makulalike Virus (VaMLV) wurden international seit der Erstpublikation nicht mehr in Honigbienen detektiert. Es ist wahrscheinlich, dass es sich dabei um Fehlbestimmungen durch die Erstpublikation handelt, zumindest was den Wirtsstatus der Honigbienen anbelangt (pers. Mitteilung J. Evans, USA). Daher ist eine Integration in den Assay nicht notwendig bzw. sinnvoll.

Insgesamt wurden zahlreiche weitere Veränderungen von Primersequenzen empirisch getestet, um Unspezifitäten, geringe Effizienzen oder Probleme der Produktgröße (Kompatibilität/Unterscheidbarkeit zu anderen Produkten) zu klären. Dies betraf *Nosema apis* und *Nosema ceranae* (4 forward Primer), SBPV (1 Primer), BQCV (2 Primer), LSV (4 Primer), VDV und DWV (2 Primer), ABPV (1 Primer). Zusätzlich erachteten wir nach den Erfahrungen der Massenscreenings (u.a. mit MLPA) die Einbindung von internen Kontrollen für sinnvoll. Daher haben wir weiter Primer entwickelt, die unabhängige Loci in demselben Virustarget amplifizieren. Damit sollten bei einer positiven Probe beide Loci detektiert und so eine größere Sicherheit der Detektion erzielt werden. Für die Komplexe VDV-DWV, ABPV-IAPV-KBV sowie für *Nosema* spp. wurden statt mehrerer Zusatzprimer jeweils nur 1 allgemein funktionierender Primer entwickelt.

Die Targets (Viren, Kontrollgene, *Nosema*) sind in Tab. 1 aufgelistet und in Abb.1 dargestellt.

index	size (bp)	expected	virus	Primer
a	90		LSV	LSVx90
1	97	95	LSV	LSVx95
2	99	95	Nosema spp.	Nos95(R1)
3	101	100	DWV	DWVx100
4	108	104	Nosema spp.	NaNc104
5	116	116	CBPV	CBPVshort
b	124		LSV	LSV124
6	132	130	VDV	VDVF2
7	137	140	BQCV	BQCV140
8	149	149	DWV	DWVx149
c	157		KBV	KBV2
9	163	165	DWV	DWVF2
10	165	165	DWV-complex	DWVcmplx
11	170	174	SBV	SV-F c
12	176	178	Nosema apis	NapisF4-R2
13	186	186	Nosema apis	NapisF4-R1
14	199	199	Nosema ceranae	NcerF4-R1
15	200	200	Nosema spp.	Nos200
16	219	228	ABPV	ABPV-F
d	223		KBV	KBV-BD
d	228		ABPV	ABPV-BD
d	230		ABPV-complex	ABPV-F230
d	234		IAPV	IAPV-BD
d	238		ALPV	ALPV238
17	240	240	SBPV	SBPVns
18	251	228	ABPV	ABPV-F
19	270	268	RPS18	RPS18short
e	284		IAPV	IAPV-F
20	317	320	VaD	VaD320
21	354	354	Act	Act1
22	368	373	RPL13a	rpl13a
23	384	375+384	SBPV	SBPV-F
24	407	406	Nosema spp.	Nos406-410
f	440		LSV	LSV410
f	446		CBPV	CBPV446
f	475		ALPV	ALPV475
26	468	466	CBPV	CBPV-OP466
25	469	472	ABPV-complex	ABPVcmplx

Tab. 1: Übersicht über die Targets des Virus Detektions-Assays. Integrierte (vorhanden als Plasmidkonstrukt und getestet – außer LSV [1]) Targets sind mit Nummern versehen, noch zu integrierende Targets bzw. Alternativen sind mit Buchstaben versehen. Spalten 2 und 3 stellen die erwartete Produktgröße bzw. die beobachtete Produktgröße dar.

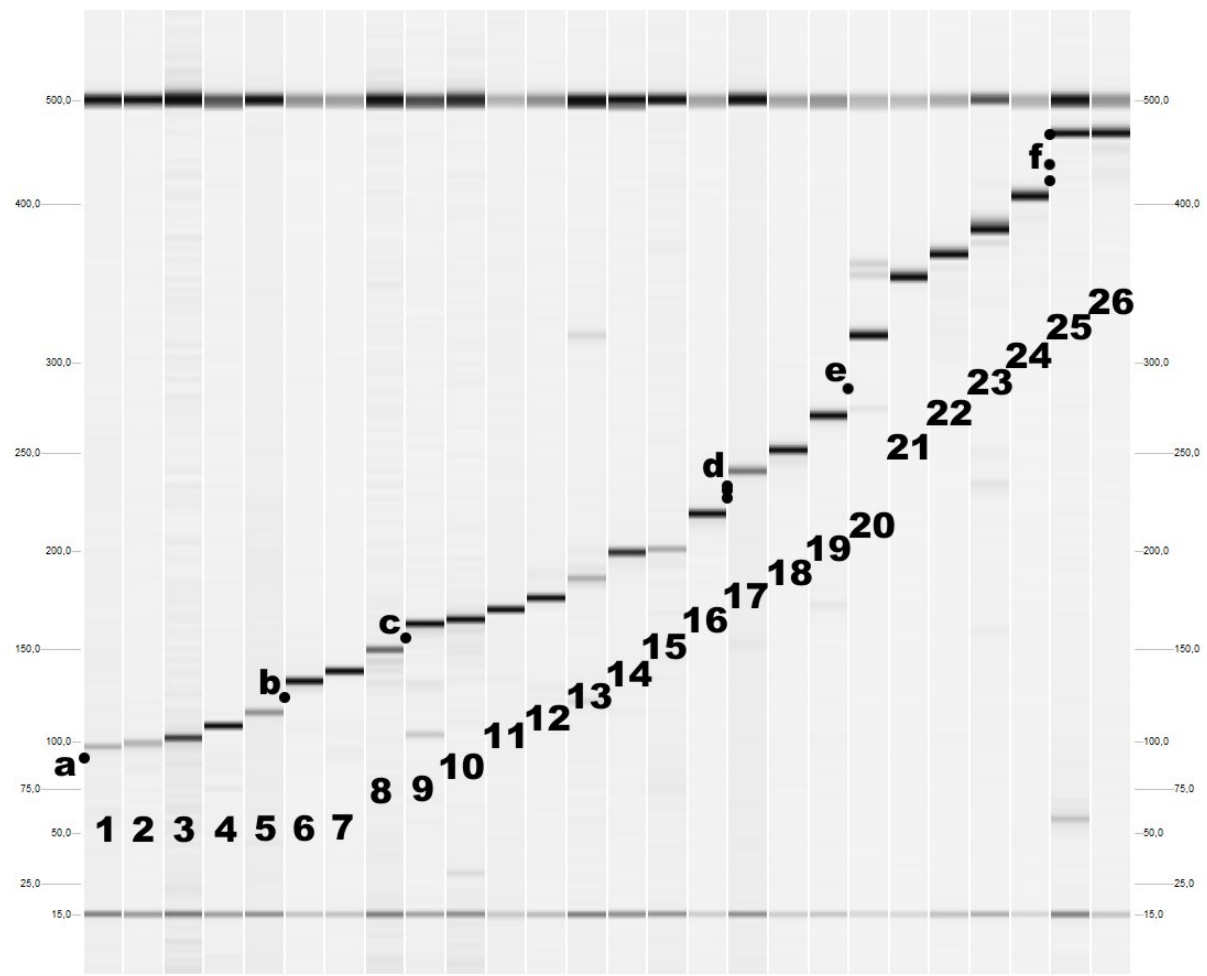


Abb.1: Virus Detektions-Assay – Übersicht über alle Targets (Nummern, vgl. Tab.1) sowie geplante/noch fehlende/ noch nicht getestete Produkte (Buchstaben, vgl. Tab. 1).

Alle vorhandenen Viren-Targets wurden kloniert und können als Positivkontrollen verwendet werden. SBPV ist als PCR Produkt vorhanden, die Klonierung war noch nicht erfolgreich, ist aber absehbar und soll in der Verlängerung nachgereicht werden. Einige Kompatibilitäts-Tests konnten dennoch bereits durchgeführt werden.

Für alle vorhandenen Konstrukte wurden umfangreiche Tests zur Charakterisierung durchgeführt. Diese beinhalteten Verdünnungsreihen zur Determinierung der Sensitivität (siehe Abb.2) sowie Gradienten-PCRs zur Feststellung der Reaktionsoptima. Zudem, zusätzlich zu bereits durchgeführten Multiplextests, mussten alle neuen und veränderten Primer in neuen Multiplex-Tests auf gegenseitige Kompatibilität überprüft werden. Dies wurde ebenfalls mit Hilfe von Temperaturgradienten durchgeführt (siehe Abb.3). Basierend auf diesen empirischen Erfahrungen wurden die Targets in bislang 3 Multiplex-Gruppen eingeteilt um falschnegative Ergebnisse zu vermeiden, wie sie beispielhaft in Abb. 3 dargestellt sind. Hier zeigt sich eine Inkompatibilität von DWVx100 mit (potentiell) DWV und

NapisF3, wobei DWV unabhängig von einer Multiplex Reaktion nur bis 67 Grad arbeitet. Daher ist davon auszugehen, dass die Inkompatibilität durch NapisF3 verursacht wird, weshalb dieser (oder DWVx100) in eine andere Multiplex Gruppe verschoben wird. Diese Aufteilung der Targets sollte den Assay robust und ausreichend zuverlässig machen.

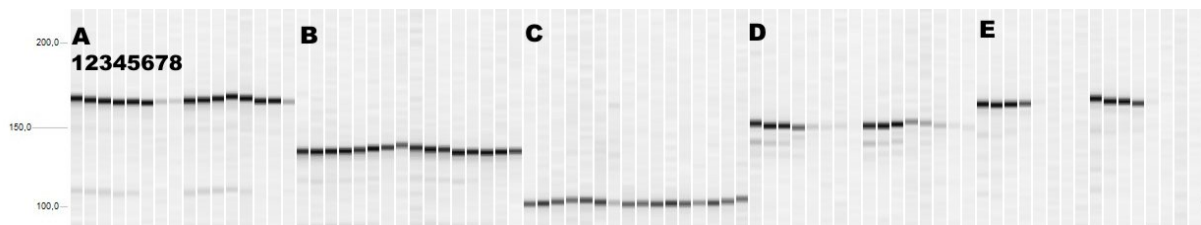


Abb.2: Beispiel für die Prüfung der Sensitivität von Primern. A- DWV, B-VDV, C-DWVx100, D- DWVx149, E-DWVcmplx (Primer mit entsprechendem Plasmid) wurde in 8 Verdünnungen getestet (Standard PCR Programm, 37 Zyklen). Jede Reaktion wurde doppelt durchgeführt (nebeneinander dargestellt). 1-8: Menge eingesetzter Plasmid-DNA (Gewicht und entsprechende Zahl der Kopien): 1: 1ng (>200m Kopien), 2: 10pg (>2m), 3: 1pg (200k), 4: 100fg (20k), 5: 10fg (2000), 6: 2fg (400), 7: 0.5fg (100), 8: 0.25fg (50).

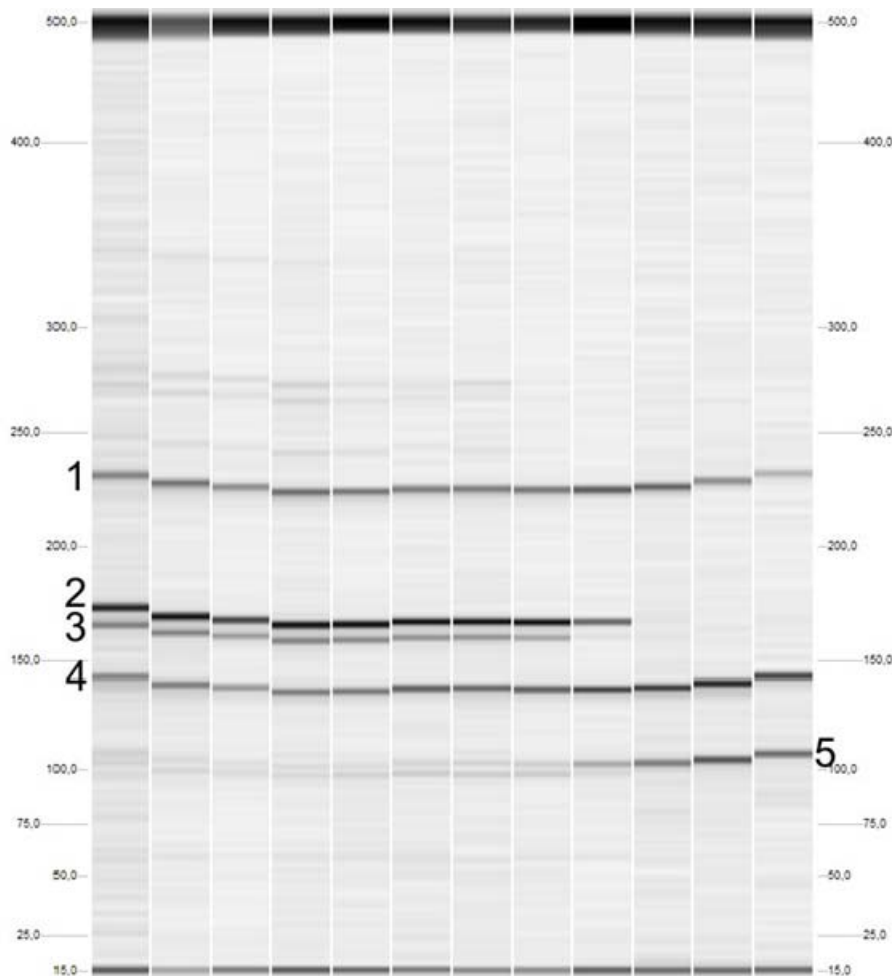


Abb.3: Multiplex Temperatur Gradient, Die PCR Reaktion enthielt 1ng Plasmid (mit entsprechendem Primer) von ABPV (ABPV), DWV (DWV), Nosema apis (Napis F3), VDV (VDV) und DWVx (DWVx100). Die Spuren 1-12 stellen die Annealingtemperaturen zwischen 53 und 71°C dar: 53 / 53.4 / 54.7 / 56.6 / 58.8 / 60.9 / 63.1 / 65.2 / 67.3 / 69.3 / 70.6 / 71 °C.

Bedingt durch die Verzögerungen in der Anfangsphase des Projektes (2012, Veränderungen des Protokolls, 2013 Verbesserungen am Primerdesign, Primertests/Charakterisierungen, Optimierung der ersten PCR durch verdünnte Primer) waren wichtige Teile des experimentellen Aufbaus verzögert fertiggestellt worden, wodurch noch nicht alle umfassenden Tests abgeschlossen werden konnten (z. B umfassende Vergleichstests, weitere systematische Parametererfassung für neue Primer und Target-Kombinationen, „Feldstudien“ mit hohen Zahlen von biologischen Proben in unterschiedlichen Laboren). Zum Ende des Berichtszeitraums fehlten lediglich wenige Viren, zu denen noch keine positiven Proben als Ausgangsmaterial gefunden werden konnten (IAPV, KBV), zu denen nur unsichere Proben vorliegen (mit anderen Methoden identifiziert) oder zu denen eine Bestätigung bzw. Erarbeitung einer Positivkontrolle (Klonierung) noch ausstand (ALPV, SBPV, LSV).

Im Berichtszeitraum 01.01.2014 – 31.12.2014 wurden alle vorhandenen Viren-Targets als Positivkontrollen kloniert. Für alle vorhandenen Konstrukte wurden bereits umfangreiche Tests zur Charakterisierung durchgeführt. Dies beinhaltete Verdünnungsreihen zur Determinierung der Sensitivität sowie Gradienten-PCRs zur Feststellung der Reaktionsoptima. Zusätzlich zu bereits durchgeführten Multiplex-Tests wurden alle neuen und veränderten Primer in neuen Multiplex-Tests auf gegenseitige Kompatibilität überprüft. Basierend auf diesen empirischen Erfahrungen wurden die Targets in drei Multiplex-Gruppen eingeteilt um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden.

Letzte Optimierungen im Zusammenspiel mit den Primern während der Multiplex-PCR wurden erfolgreich abgeschlossen (PCR-Additive, Integration der oben genannten noch fehlenden Targets). Wichtig waren hierbei die Integration der oben genannten noch fehlenden Targets, sowie die verbesserte Effizienz der Reaktion durch die Zugabe von 500µM Spermidin als PCR Additiv (Abb. 4).

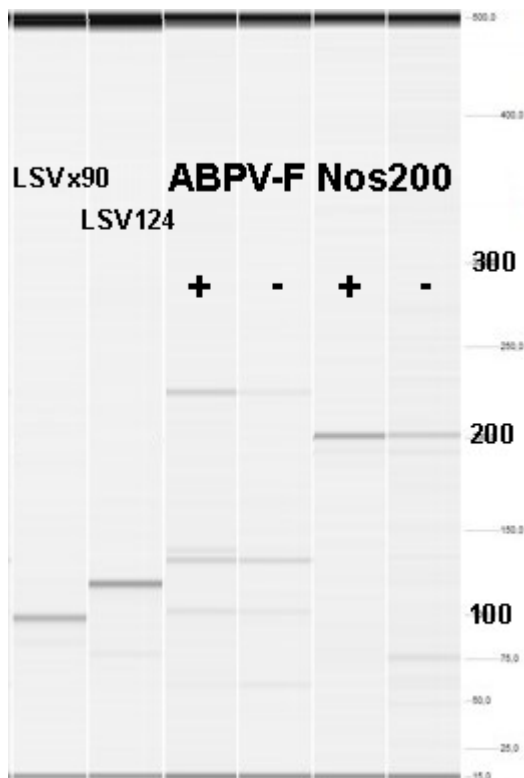


Abb.4. Beispiele einer Amplifikation von LSV mit den Primern LSVx90 und LSV124 (Spalte 1 und 2). Spalte 3-6 zeigt den positiven Einfluss von 500 μ M Spermidin (+) gegenüber Reaktionen ohne Spermidin (-) anhand von 2 Targets (ABPV-F und Nos200).

Es wurden umfangreiche systematische Tests mit den Primerkombinationen durchgeführt, wodurch nun mehr Erfahrungswerte darüber vorliegen, wie zuverlässig und präzise der Test in biologischen Proben funktioniert. Viele dieser Erfahrungswerte konnten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Moritz (MLU) gewonnen werden, der u.a. der Test im Rahmen der Fortführung des Projektes über das ursprüngliche Projektende (31.03.2014) hinaus zur Verfügung gestellt wurde. Insgesamt sind die Ergebnisse gut und der Assay robust. Wir können davon ausgehen, dass eine deutliche Zeit- und Kostenersparnis (50%) gegenüber herkömmlichen und neuen Methoden bzw. Konkurrenzprodukten (MLPA) erzielt werden kann. Die Ergebnisse des Tests werden z. Zt. für eine Publikation vorbereitet und es ist vorgesehen, diese für die Entwicklung eines Kits oder als Serviceleistung zur Verfügung zu stellen.

Im Berichtszeitraum 01.03.2015 – 31.12.2015 wurden durch BioSolutions keine zusätzlichen FITBee-Fördermittel in Anspruch genommen, BioSolutions hat sich jedoch mit Eigenmitteln weiterhin am Projekt beteiligt. Da DNA-Hybridisierungstechniken zur Gendiagnose methodisch ein auslaufendes Verfahren sind und zunehmend metagenomische Komplettanalysen im Bereich der Gendiagnostik eingesetzt werden, wurde im letzten Jahr in Kooperation mit der AG Moritz (MLU) an einem Kit für die 2013 entwickelte RESTseq

Methode gearbeitet. Es handelt sich um ein neues Verfahren, das umfangreiche genomische Analysen auch auf Next Generation Sequencing Benchtop-Geräten ermöglicht (RESTseq Stolle & Moritz 2013).

Genetische Analyse basierend auf DNA Sequenzierung ist ein sich schnell entwickelndes Feld. Neue Technologien erlauben die Entschlüsselung des gesamten Erbgutes in einigen Stunden. Allerdings sind die Investitionskosten für sogenannte Next Generation Sequencing Plattformen sehr kostspielig. Dies führt dazu, dass meist große Zentrallabors solche Geräte betreiben, um sie zahlreichen Nutzern zugänglich zu machen. Inzwischen geht die Entwicklung dahin, in Großlabors zahlreiche solcher Plattformen zusammenzuführen, denn nur dann lassen sich am Markt wirtschaftlich die Genomanalysen realisieren. Das beste Beispiel ist hierfür das Beijing Genome Institute, das derzeit weltweit eine marktführende Rolle übernommen hat und unschlagbare Konditionen für Genom-Sequenzierungen anbieten kann. Trotz der beachtlichen Transportkosten kann BGI günstiger als jedes andere Zentrallabor in Europa oder den USA seinen Service anbieten.

Den Vorteil des niedrigeren Preises bezahlt der Nutzer jedoch mit der sehr langen Wartezeit zwischen Einsendung der Proben und Erhalt der Genomdaten. Im günstigsten Falle beträgt dies zwei Monate (meist drei Monate). Während dies in der Forschung zu langen Leerlaufzeiten bei beteiligten Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen führt (und damit zu hohen Personalkosten), ist dies für medizinische Anwendungen schlicht nicht hinnehmbar. Hier ist es essentiell, schnelle Diagnostik durchführen zu können. Im zunehmendem Maße setzen sich daher kleinere Benchtop-Plattformen, sogenannte „Personal Genome Analyzer“ durch. Diese haben zwar einen geringeren Durchsatz, können aber die Daten innerhalb eines Werktags zur Verfügung stellen. Zudem haben diese Geräte wesentlich geringere Anschaffungskosten und werden inzwischen in Kliniken, Forschungseinrichtungen und Universitäten zu Genomanalysen eingesetzt. Sie werden besonders dann eingesetzt, wenn schnelle Ergebnisse notwendig sind. Diese preisgünstigen Benchtop-Plattformen mit geringerer Kapazität erlauben die Nutzung der Technik nun auch in kleinen Laboren, allerdings nur für eingeschränkte Anwendungen entsprechend den Kapazitätslimitierungen. Der Nachteil dieser Geräte liegt in der geringeren Sequenzierkapazität, die dadurch insbesondere für die de novo Sequenzierung von Kompletengenomen unrentabel sind. Die Geräte werden derzeit daher meist für die Sequenzierung einzelner ausgewählter Gene genutzt und nicht für genomische Analysen. Die genetische Information stellt im Gesamtgenom jedoch nur einen sehr geringen Anteil der gesamten DNA dar. Die Gene sind in nur ca. 1% des Genoms kodiert und das restliche Genom beinhaltet nichtkodierende DNA. Für die meisten Fragestellungen ist man jedoch lediglich an der Funktion der Gene und deren Anordnung im Genom interessiert und nicht an den nichtkodierenden Bereichen.

In der Regel sind daher 99% der kompletten Genominformation für die jeweilige Analyse irrelevant, werden aber mit großem Kostenaufwand sequenziert, um die relevante Information aus dem Datensatz im Nachgang über die Bioinformatik mit erheblichen Zusatzkosten zu extrahieren.

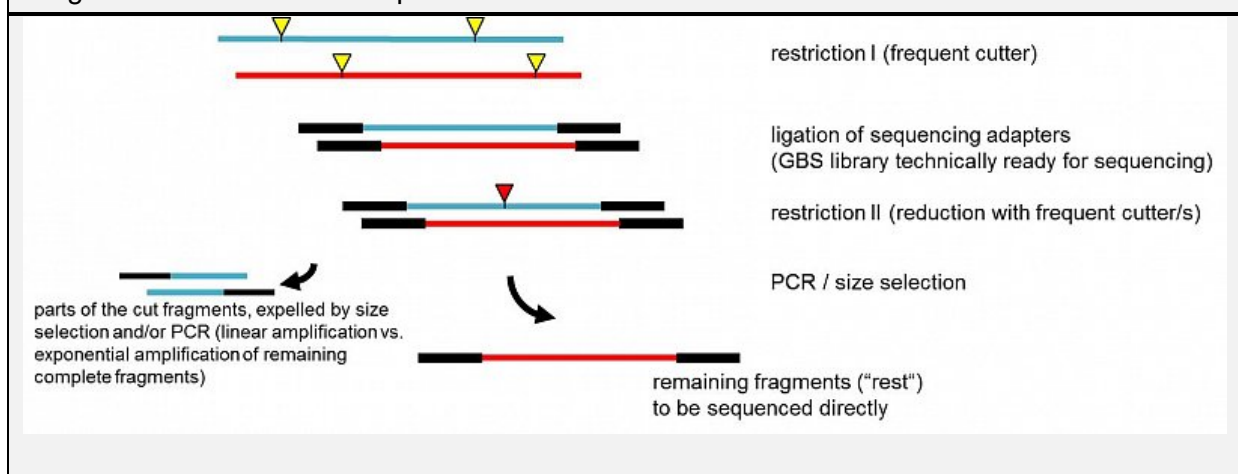
Stolle und Moritz (2013) entwickelten daher ein neues Verfahren, das umfangreiche genomische Analysen auch auf Benchtop-Geräten ermöglicht. Die Technik basiert dabei auf stark reduzierten Genbanken, die wir vor der Sequenzierung aus den Kompletengenomen extrahieren. Während Großgeräte also alles sequenzieren und dann die Daten durch geeignete Algorithmen reduzieren, reduziert unser Verfahren das Genom vor der Sequenzierung und konzentriert sich auf vorher ausgewählte Genombereiche. Diese Analysen können daher auch auf den kleineren Benchtop-Plattformen durchgeführt werden. Die Methode lässt sich von der genetischen Diagnostik im klinischen Labor und der Forensik, über die Genomik in der Tier- und Pflanzenzucht bis hin zur Populationsgenomik und der Biodiversitätsforschung einsetzen und ist somit gut geeignet für:

- 1) Hochauflösende Genomkartierung
- 2) Bestimmung genetischer Ursachen und Prädispositionen für Erbkrankheiten
- 3) DNA-Analytik in der Forensik und Verwandtschaftsanalyse
- 4) Zuchtwertbestimmungen in der Tier und Pflanzenzucht
- 5) Evolutions- und Selektionsprozesse in der Natur (z.B. als Antwort auf den Klimawandel)

Während die Sachkosten sich etwas ungünstiger darstellen (ca. 10% Mehrkosten pro Probe), ist der große Gewinn des Verfahrens die umgehende Verfügbarkeit der Daten, die die Mehrkosten bei weitem übersteigen. Alleine die Personalkosten für Wissenschaftler, die während der monatelangen Bearbeitungszeiten in den Zentrallabors weiterhin anfallen, übersteigen die Sachmittel bei weitem. Die äußerst flexible Skalierbarkeit des Verfahrens ermöglicht, dass die Methode für die jeweilige Zielstellung leicht angepasst werden kann. Life Technologies, ein global marktführender Hersteller von Genomsequenzierungsplattformen (seit Juli 2015 Thermo Fisher Scientific) erkannte die große Bedeutung des Verfahrens bereits, was sich unter anderem im Erreichen unserer Publikation des 2. Platzes im Ion Torrent Breakthrough Award 2013 widerspiegelt.

Prinzip des RESTseq Verfahrens

Man zerschneidet die gesamtgenomische DNA mit einem häufig schneidenden Restriktionsenzym (4 base cutter). An diese Restriktionsfragmente mit „sticky ends“ legiert man die für die Sequenzierplattform spezifischen Adapter. Die entstandenen DNA Fragmente werden dann durch ein zweites Restriktionsenzym erneut zerschnitten. Fragmente ohne diese Schnittstelle bleiben erhalten und können durch eine PCR gezielt amplifiziert werden. Durch eine nachfolgende Größenselektion (z.B. 400 Basenpaare) werden nun die Zielfragmente spezifisch ausgewählt und können sequenziert werden. Über die Wahl der Restriktionsenzyme kann man die Zielregionen vor der Analyse gezielt auswählen und insbesondere die Zahl der zu sequenzierenden Genomfragmente bestimmen. Bei Organismen mit bekanntem Genom kann man nun exakt die Lage der Fragmente bestimmen und spezifische Genorte im Datensatz bioinformatisch ansteuern.



Das Originalverfahren war durch ein komplexes Protokoll mit zahlreichen verschiedenen Präparationsschritten nicht besonders benutzerfreundlich. Wir haben daher das Verfahren nun soweit weiterentwickelt, dass wir ein Kit (1TubeSeq) zusammengestellt haben, bei dem der gesamte Präparationsvorgang in einem einzigen Reaktionsgefäß und in vier Pipettierschritten stattfindet. Das Kit umfasst die notwendigen Puffer, Enzyme und DNA-Adapter. Zusätzlich enthält es 32 DNA-Barcodes, die die gleichzeitige Analyse von multiplen Proben in einer einzigen Genbank erlauben. Neben Effizienzvorteilen ist der Prozess nun so vereinfacht, dass er für die Laborroutine tauglich ist und nicht nur von technischem Personal sondern auch mit sehr einfachen Pipettierautomaten ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden kann. Wir haben dies in unserem Labor inzwischen als Routinemethode etabliert und an verschiedenen Bienen-Genomen getestet (siehe Protokolltext).

Referenz: Stolle E, Moritz RFA (2013) RESTseq – Efficient Benchtop Population Genomics with RESTriction Fragment SEQuencing. PLoS ONE 8(5): e63960. doi:10.1371/journal.pone.0063960

RESTseq protocol v2.7

November 2015, Unpublished protocol. Keep confidential. Reference to original method: Stolle E, Moritz RFA 2013: RESTseq – Efficient Benchtop Population Genomics with RESTriction fragment SEQuencing. PLoS ONE 8(5): e63960.

PROTOCOL

1. Restriction I (Incubate 4 hours @ 65°C)

DNA	6 µl + 4 µl Mastermix
Water	1.8 µl
CutSmart Buffer	1.4 µl
RNaseH	0.5 µl
TaqI	0.3 µl (30 U)
Total volume	10 µl

2. Ligation (Incubate 25 min @ 20°C + 10 min @ 30°C + 5min @ 37°C + 30min @ 65°C)

Add to the tube

AdapterA	0.3 µl
Mastermix	0.4 µl
AdapterP1	0.15 µl
ATP (100mM)	0.15 µl

Mix by pipetting

3. pooling (Multiple samples must be pooled now!!)

4. Nick-Repair (Incubate 30min @ 37°C)

Add to the tube per 50 µl sample volume

dNTPs	0.5 µl
DNA-Pol I	0.5 µl (5U)

Mix by pipetting

5. AMPure XP purification

Adjust the amount of beads needs to be adjusted to the amount of sample (1.5 x Vol).

Incubate 5min (RT), put on magnetic rack (3min), remove supernatant, wash twice with EtOH (75%, fresh, add alcohol and then 5-10x turn the tube in the rack quickly by 180 degrees). Airdry 5min, pellets should darkbrown/moist. Remove EtOH, elute in 18 µl water or concentrate in SpeedVac.

6. Restriction II for complexity reduction

Use 10 µl of the sample, store the other 10 µl as a backup

DNA + water	9.3 µl
Cutsmart Buffer	1.1 µl
MseI (TTAA)	0.6 µl (30U)
Total volume	11 µl

Mix by pipetting, Incubate 4 hrs @ 37°C

7. PippinPrep size selection

Directly use the sample for the PippinPrep size selection, **Set-up:** 200bp reads, dye-free cassettes 2% internal marker L

1. Prepare cassette:

- Put cassette into machine*, remove tape
- Remove buffer traces from elution-chamber and replace with 40 µl Electrophoresis buffer
- Close lid and press "test" to check the cassette
- open lid again, setup program, "tight260" (234-286bp size selection) with internal marker

2. Prepare sample

REST2-reaction	11 µl
Water	19 µl
Marker L	10 µl

Mix thoroughly with pipet

3. load and run sample

- Remove 40 µl from the loading pocket and load sample
- Press start and stop program after 1 hr
- take out sample from elution chamber (45-50 µl)

8. PCR

Direct amplification of library
 NEBNext High Fidelity 2X PCR Mastermix
 PCR mix 25 µl
 PrimerA+PrimerP1 5 µl
 DNA 20 µl
 98°C 30s, 98°C 10s, 63.5°C 30s, 72°C 30s 20 cycles,

final 72°C 5min

Nanodrop: >15ng/µl, if less, another PCR at this step before you perform the second size selection.

9. second size selection

Library	29 µl
CutsmartBuffer	1.1 µl
Marker L	10 µl,

run identical PippinPrep protocol as before

10. final AMPure XP purification

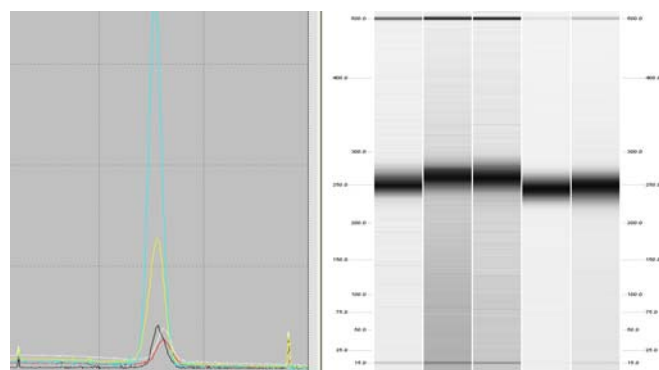
Add ca. 1.5x Vol. beads

Elute into 20 µl elution buffer for stable storage

11. library quality check

Qiaxcel (High Res. Cartridge) 10 µl library, OL700, alignment marker 15-500bp.

Verify correct size and amount of the library (Fig. 1)



Ideal shape of library

11. Library Quantification

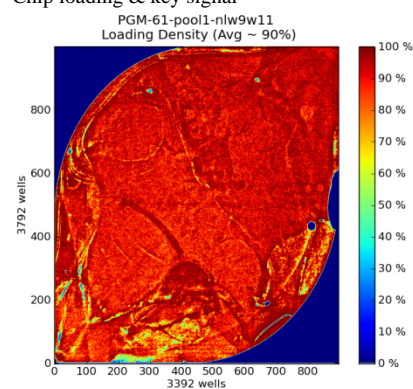
SybrGreen Approach (triplicate)

3.2x MasterMix	3x10 µl
Library	0.3 µl
PrimerA/PrimerP1	1.0 µl
Water	3.7 µl
SybrGreen 2x (Sensimix)	5 µl 16 µl

95°C 5min, 95°C 30s, 60°C 45s; 35cycles

Example of final results

Chip loading & key signal



COSTS

Pooled per individual;

2 individuals	€88/indiv.
12 individuals	€ 65/indiv.
24 individuals	€ 33/indiv.
36 individuals	€ 22/indiv.
48 individuals	€ 16.5/indiv.

ca. €80 per run

Das Verfahren wurde im Jahr 2014 mit dem Mitteldeutschen Innovationspreis der Stadt Halle ausgezeichnet. Ein Antrag zur Gründung einer Startup Firma zur kommerziellen Nutzung des Verfahrens ist derzeit bei der Innovationsbank des Landes Sachsen-Anhalt in der Prüfung. Wir halten dies für das wichtigste Ergebnis aus dem FITBEE Projekt. Die Ergebnisse reichen damit weit über die ursprünglichen Planungen hinaus und zeigen, wie aus einem Vorhaben, das zunächst ausschließlich für die Bienengesundheit konzipiert war, sich ein sehr breites Anwendungsfeld eröffnet.

Abweichungen von der ursprünglichen Projektplanung (Technologieentwicklung)

Es gab keine wesentlichen Abweichungen. Das Projekt wurde im Projektjahr 2015 mit dem Partner MLU über das geplante Vorhaben hinaus weiter entwickelt. Die RESTseq-Methode wurde mit dem Mitteldeutschen Innovationspreis der Stadt Halle/Saale ausgezeichnet und wird zu einer marktfähigen Innovation entwickelt.

II. 2 der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Für das Teilprojekt 8 „Entwicklung eines molekularbiologischen Schnelltests für Viruserkrankungen“ im Verbundprojekt FIT BEE, Modul 4 wurden insgesamt 134.734,04 € ausgegeben. Damit wurde der Kostenplan im Wesentlichen eingehalten, die Kosten lagen geringfügig unterhalb der geplanten Ausgaben. Den größten Anteil an den Kosten hatten die Ausgaben für Personal. Mit 120.029,69 € waren sie annähernd so hoch wie geplant. Mit diesem Geld wurde eine Stelle mit 20 Stunden wöchentlich für die Bearbeitung des Themas finanziert.

Die Verbrauchsmittelkosten waren für ein Entwicklungsprojekt im molekularbiologischen Bereich mit rund 12.000 € sehr niedrig angesetzt worden und wurden mit Nettoausgaben in Höhe von 13.769 € etwas überschritten. Es wurden z. B. Einwegverbrauchsmittel wie Pipettenspitzen oder Reaktionsgefäße finanziert, aber auch verschiedene Mikrokits, PCR-Platten oder Sequenzierungen.

Mit einer Förderquote von 60% erhielt BSH bis zum Projektende insgesamt 72.315,15 €, der Restbetrag in Höhe von 8.525,27 € wird mit dem Verwendungsnachweis abgefordert.

Alle Mittel wurden entsprechend dem Verwendungszweck verwendet. Zur Ermittlung der Personalkosten führten die Mitarbeiter Stundenzettel, wo die für das Projekt geleisteten Stunden notiert wurden.

Reisemittel wurden nur in sehr geringem Umfang für Besuche der Projekttreffen verbraucht. Einsparungen ergaben sich hier dadurch, dass Projektmitarbeiter verschiedentlich mit Projektpartnern im Auto zu Treffen fahren konnten.

II. 3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Alle Arbeiten in den ersten drei geförderten Projektjahren orientierten sich eng an der originalen Projektbeschreibung. Die Umsetzung des RESTseq-Verfahrens in ein marktfähiges Produkt kann auch für das Studium der Epidemiologie der Bienengesundheit genutzt werden, geht aber weit über die zunächst vorgesehene Fragestellung hinaus.

II.4 des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschrittenen Verwertungsplans

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich mit einem praxistauglichen Schnellnachweissystem für Honigbienenpathogenen ein hoher Nutzen für die Bienengesundheit ergibt. Wir erwarten hier einen kleinen spezifischen Markt. Die Marktchancen für die RESTseq Technik erachten wir als wesentlich besser. Laut einer Einschätzung der Sygnis Pharma AG (Heidelberg) liegt das Marktvolumen für das „Next Generation Sequencing“ (NGS) im Bereich der personalisierten Medizin derzeit bei ca. 1 Mrd \$. Man geht davon aus, dass die Wachstumsrate pro Jahr bei 22 % liegen wird. Auch John Patterson, R&D Vorstand Astra Zeneca „Im Jahr 2030 wird die personalisierte Medizin einen Marktanteil von 25% haben.“ Das bedeutet global ein Marktvolumen von geschätzten 250 Mrd. US\$! Im Bereich der Anwendungen am Humangenom kommen die Anwendungen im Bereich der Forensik hinzu. Auch wenn die Anwendungen am Humangenom den herausragenden Marktanteil darstellen, kommen die Anwendungsbereiche in anderen Bereichen ergänzend und damit marktstabilisierend hinzu. Im Bereich der Pflanzen und Tierzucht, der Pathogendiagnose in der Veterinärmedizin und der Grundlagenforschung in der Ökologie und Evolutionsbiologie kann das Verfahren vielfältig eingesetzt werden. Es gibt in Europa zahlreiche international operierende Serviceanbieter für Genomanalysen (z.B. Source Bioscience (UK), GATC Biotech (DE), Qiagen (NL), Eurofins (DE), und wir sehen hier einen besonders dynamisch wachsendes Marktpotential. Die breiten Service-Paletten der Firmen zeigen bereits jetzt eindrucklich, wie tiefgreifend Kompletngenomanalysen die Diagnostik, Analytik und die Qualitätskontrolle jeglicher biotischer Produkte verändern wird. Dies führt von der Überprüfung genetisch modifizierter Organismen in Nahrungsmitteln bis hin zur Verifizierung von biologischen Produkten. Ein Beispiel mag das Holzhandelssicherungsgesetz sein, das die Regelungen und Anforderungen an die Holzartenbestimmung und den Herkunftsnachweis formuliert. Der Markt ist schon jetzt erschlossen, die Schnelligkeit und der Preis der neuen Analysenmethode wird eine breite Nutzung ermöglichen. Da die Methode unabhängig von den verschiedenen Techniken des Next Generation Sequencing eingesetzt werden kann, wird sie mit den rasant wachsenden Leistungsfähigkeiten der Hardware einfach „mitwachsen“ können, da die technisch spezifischen DNA-Adaptoren jeweils im Protokoll entsprechend ausgetauscht werden

können. Wenn die Geräte von heute veraltet sind, wird die Technik dennoch weiterhin eingesetzt werden können.

II. 5 des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während des Vorhabens gab es etliche Publikationen, die neue Honigbienen-viren beschreiben: LSV - Lake Sinai Virus, BSRV – Big Sioux River Virus, ALPV – Aphid Lethal Paralysis Virus, von denen LSV und ALPV bereits in Europa gefunden wurden

(Runckel et al. PLoS ONE 6(6): e20656, Granberg et al. 2013, PLoS ONE 8(2): e57459).

Bezüglich multipler Pathogentests wurde die Arbeit von de Smet et al publiziert (De Smet et al. 2012. BeeDoctor, a Versatile MLPA-Based Diagnostic Tool for Screening Bee Viruses.

PLoS ONE 7(10): e47953. doi:10.1371/journal.pone.0047953), die auf der MLPA Technik basiert. Diese Methode erlaubt jedoch eher qualitative Ergebnisse und tested weniger Viren

als das hier entwickelte Verfahren. Da der von Glover et al (Glover et al. 2011. Detection of honey bee (*Apis mellifera*) viruses with an oligonucleotide microarray. *J Invertebrate Pathol* 107:216-219) entwickelte Microarray keine Marktakzeptanz gefunden hat und die Technik

durch metagenomische Sequenzanalysen überholt ist (Comman et al. 2012. Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies, PLoS ONE 7:e43562; Granberg et al (2015)

Metagenomic approaches to disclose disease-associated pathogens: detection of viral pathogens in honeybees. *Meth Mol Biol* 1247: 491-511) haben wir uns zum Ende des

Vorhabens der Weiterentwicklung des RESTseq-Verfahrens (Stolle E, Moritz RFA (2013) RESTseq – Efficient Benchtop Population Genomics with RESTriCTION Fragment SEQuencing. PLoS ONE 8(5): e63960. doi:10.1371/journal.pone.0063960) zugewandt.

II. 6 erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Aus den im Verbundprojekt erzielten Ergebnissen zur multiplen Virendiagnostik ist in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner MLU eine Publikation für die Zeitschrift „Apidologie“ in Vorbereitung. Das RESTseq-Verfahren wurde in PLoS One publiziert. Stolle E, Moritz RFA (2013) RESTseq – Efficient Benchtop Population Genomics with RESTriCTION Fragment SEQuencing. PLoS ONE 8(5): e63960. doi:10.1371/journal.pone.0063960

III. Erfolgskontrollbericht

III.1 Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen, z.B. des Förderprogramms

Seit über zwei Jahrzehnten ist in Deutschland ein dramatischer Rückgang bei der Anzahl der Bienenvölker zu beobachten mit zusätzlich periodisch auftretenden Totalverlusten von Bienenständen (DIB-Jahresbilanzen, DEBIMO-Jahresberichte). Es wurde vermutet, dass Umweltparameter wie Klima und Nahrungsverfügbarkeit sowie Bienenkrankheiten hierbei eine entscheidende Rolle spielen. Solche Parameter haben auf die Gesundheit und Vitalität von Honigbienen grundsätzlich einen größeren Einfluss als auf Nutztiere, die unter kontrollierten Bedingungen gehalten werden können.

Im Zentrum des Verbundansatzes stand das gesunde, vitale Bienenvolk („FIT BEE“). Alle Module zielten im Rahmen eines integrierten Netzwerkes darauf ab, die komplexen Wechselwirkungen zwischen Einzelbienen, Bienenvolk, Bienenkrankheiten und Umweltparametern besser zu verstehen, daraus die Bedingungen für ein gesundes Bienenvolk zu definieren und diese durch gezielte Maßnahmen zu verbessern.

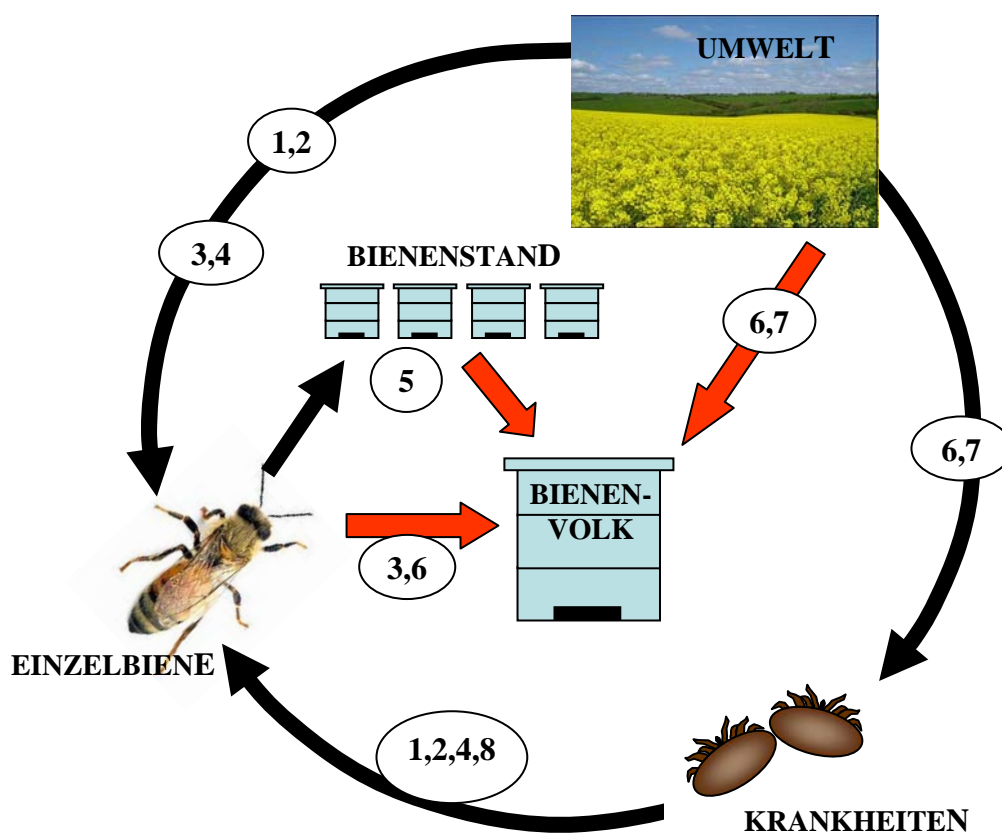


Abb. 1: Einfluss und Vernetzung verschiedener Faktoren auf die Gesundheit des Bienenvolkes. Umwelt, Bienenstand und die Gesundheit der Einzelbienen haben einen direkten Einfluss auf die Vitalität des Bienenvolkes (rote Pfeile). Die Nummern beziehen sich auf die im Text beschriebenen

Module zur Untersuchung und Reduzierung der entsprechenden Schadeffekte. Biosolutions war am Modulen 4 beteiligt.

Der Beitrag von Biosolutions konzentrierte sich auf Modul 4 des Gesamtprojektes, in dem es galt, neue diagnostische Verfahren für Bienenpathogene zu entwickeln, die es auch erlauben, die Transmission von Pathogenen zwischen Völkern zu erfassen. Es wurde zunächst eine PCR basierte Multiplex Diagnosemethode entwickelt, anschließend eine innovative Technik zur Genomsequenzierung.

III. 2 wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Es konnte ein PCR basierter Multiplex Test für alle bekannten Viren der Honigbiene sowie für *Nosema apis* und *N. cerana* entwickelt werden. Das Verfahren erlaubt eine qualitative Diagnose und führt zu einer erheblichen Kosten und Zeitersparnis (50%) im Vergleich zu alternativen Verfahren. Für alle vorhandenen Viren-Targets wurden Positivkontrollen kloniert und umfangreiche Tests zur Validierung des Verfahrens durchgeführt. Dies beinhaltete Verdünnungsreihen zur Determinierung der Sensitivität sowie Gradienten-PCRs zur Feststellung der Reaktionsoptima. Zusätzlich zu bereits durchgeführten Multiplex-Tests wurden alle Primer in verschiedensten Multiplex-Tests auf gegenseitige Kompatibilität überprüft. Basierend auf diesen empirischen Erfahrungen wurden die Targets in drei Multiplex-Gruppen eingeteilt, wodurch falsch-negative Ergebnisse vermieden werden konnten. Optimierungen im Zusammenspiel mit den Primern während der Multiplex-PCR wurden erfolgreich abgeschlossen (PCR-Additive, Integration der oben genannten noch fehlenden Targets). Wichtig war die verbesserte Effizienz der Reaktion durch die Zugabe von 500µM Spermidin als PCR Additiv. Das Testverfahren ist nun als Prototyp verfügbar und reif für Validierungstests im Alltagsbetrieb im Labor.

Es wurde ein neues Sequenzierungs-Verfahren entwickelt, das umfangreiche genomische Analysen auch auf Next Generation Sequencing Benchtop-Geräten ermöglicht (RESTseq Stolle & Moritz 2013). Das Verfahren wurde im Jahr 2014 mit dem Mitteldeutschen Innovationspreis der Stadt Halle ausgezeichnet.

Die Technik basiert dabei auf stark reduzierten Genbanken, die vor der Sequenzierung aus den Kompletengenomen extrahiert werden. Während Großgeräte alles sequenzieren und dann die Daten durch geeignete Algorithmen bioinformatisch reduzieren, reduziert unser Verfahren das Genom vor der Sequenzierung und konzentriert sich auf vorher ausgewählte Genombereiche. Diese Analysen können daher auch auf den kleineren Benchtop-Plattformen durchgeführt werden. Die Methode lässt sich von der genetischen Diagnostik im klinischen Labor und der Forensik, über die Genomik in der Tier- und Pflanzenzucht bis hin

zur Populationsgenomik und der Biodiversitätsforschung einsetzen und ist somit gut geeignet für:

- 1) Hochauflösende Genomkartierung
- 2) Bestimmung genetischer Ursachen und Prädispositionen für Erbkrankheiten
- 3) DNA-Analytik in der Forensik und Verwandtschaftsanalyse
- 4) Zuchtwertbestimmungen in der Tier und Pflanzenzucht
- 5) Evolutions- und Selektionsprozesse in der Natur (z.B. als Antwort auf den Klimawandel)

Ein Antrag zur Gründung einer Startup Firma zur kommerziellen Nutzung des Verfahrens ist derzeit bei der Innovationsbank des Landes Sachsen-Anhalt in der Prüfung. Wir halten dies für das wichtigste Ergebnis aus dem FITBEE Projekt. Die Ergebnisse reichen damit weit über die ursprünglichen Planungen hinaus und zeigen, wie sich aus einem Vorhaben, das zunächst ausschließlich für die Bienengesundheit konzipiert war, ein sehr breites Anwendungsfeld eröffnet.

III. 3 Fortschreibung des Verwertungsplans

Im Rahmen des Teilprojektes Virendiagnostik der BioSolutions Halle GmbH wurden keine Erfindungen gemacht und keine Schutzrechtsanmeldungen vorgenommen oder erteilt. Eine Anmeldung von etwaigen Schutzrechten aus den erzielten Projektergebnissen nach Projektabschluss bzw. nach Fertigstellung der noch nicht beendeten Entwicklungsarbeiten ist für das 1TUBEseq Kit geplant.

Bezüglich der wirtschaftlichen bzw. wissenschaftlich technischen Erfolgsaussichten nach Projektende beabsichtigt BioSolutions Halle GmbH gemeinsam mit der MLU (AG Moritz) die Entwicklung des 1TUBEseq Kits zur Marktreife. Ein entsprechender Antrag auf Förderung einer Ausgründung wird bei der Innovations-Bank Sachsen-Anhalt eingereicht (EGO-Gründungstransfer).

III. 4 Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben, waren zum einen die Entwicklung von DNA-Microarrays. Diese Methode wurde nach anfänglichen Schwierigkeiten an Prototypen nicht weiter verfolgt. Zudem eilte die technologische Entwicklung voran und ermöglicht es nun, komplettgenomische Analysen nicht nur in großen Genomzentren, sondern auch auf „Benchtop“-Geräten lokal in kleineren Labors durchzuführen. Schon jetzt ersetzen metagenomische Analysen DNA-Hybridisierungstechniken in vielen Bereichen und es ist abzusehen, dass für Microarray-Analysen kein zukunftsfähiger Markt besteht. Ebenso erreichte die Methode der „Loop-mediated isothermal amplification of DNA“ (LAMP) nach allen Optimierungsmöglichkeiten keine zufriedenstellende Nachweisgrenze für *Nosema* für

einen praxistauglichen Nachweistest. Es traten während der Entwicklungsarbeiten häufig Probleme mit falsch-positiven Ergebnissen auf, was vermutlich auf ein hohes Risiko an Kreuzkontaminationen bei diesem Nachweisverfahren zurückzuführen ist. Dies war ein Ausschlusskriterium für die Praxistauglichkeit.

III. 5 Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Innerhalb des Teilprojektes der BioSolutions Halle GmbH gab bzw. gibt es noch keine Präsentationsmöglichkeiten für potentielle Nutzer. Zudem ist wegen der engen Zusammenarbeit mit dem Projektpartner MLU eine Präsentation der Projektergebnisse nur in Zusammenarbeit mit den Partnern möglich.

III. 6 Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung

Der Kostenplan wurde vollständig eingehalten. Die Fortführung des Projekts bzw. die Weiterführung der Entwicklungsarbeiten des 1TUBEseq Kits wird unter Zuwendung der Investitionsbank Sachsen-Anhalt weiter erfolgen.

Die Zeitplanung wurde unter der Berücksichtigung der technischen Weiterentwicklungen in der Genomanalyse während der gesamten Projektlaufzeit weitestgehend eingehalten.