

# RNAi en virusbestrijding bij bijen

**Door de wereldwijde publiciteit rond bijensterfte is er grote interesse voor nieuwe technologieën voor bijen-gezondheidsmanagement. Eén daarvan is de bestrijding van virusinfecties met RNAi, waarmee bijengezondheid in de voorhoede van de medische innovatie terecht komt. We schreven hierover eerder al een 'snipper' (april 2011, p. 21). Hier wordt uitgelegd hoe deze technologie werkt en wat we ervan kunnen verwachten.**

## Wat is RNAi en hoe werkt het?

RNAi (RNA-interferentie) is een oeroud mechanisme in hogere levensvormen voor het verwerken van ongewenst RNA. Ongewenst is in eerste plaats afgedankt (=messenger)RNA, dat is overgebleven van eigen genexpressie, maar ook: vijandig RNA, zoals dat van virussen. Het mechanisme bestaat uit een vernietigingscomplex dat door RNAi heel precies wordt geïnformeerd welk RNA verdeeld moet worden; met een soort 'opsporingsberichten' zoals

van de politie. Als de basen (bouwstenen) volgorde van het 'doelwit'-RNA identiek is aan die van het RNAi-opsporingsbericht dan wordt het vernietigd. Zoniet, dan wordt het met rust gelaten. Aangezien we de basenvolgorde van de meeste bijenvirussen nu kennen, is het vrij eenvoudig om synthetische RNAi-opsporingsberichten te maken om een bepaald doelwit-RNA tot 'zwijgen' te brengen. Voor deze ontdekking is in 2006 terecht de Nobelprijs toegekend, want het aantal toepassingen is enorm: van genterapie en kankerbehandeling tot ziektebestrijding. Simpel nietwaar?

## Mogelijkheden en beperkingen

Om de mogelijkheden van RNAi voor virusbestrijding op waarde te kunnen schatten, moeten we eerst de talenten van onze tegenstander onderkennen. Virussen zijn veruit de beste moleculaire biologen van de wereld en hebben eeuwen de tijd gehad om zich aan te passen aan RNAi en andere moleculaire afweersystemen. Er is weinig wat wij kunnen bedenken dat zij niet al lang hebben gezien (zie ook Bijhouden oktober 2011, p. 6-7).

## Afweer saboteren

De RNAi-codes (basenvolgorde) om RNA's te traceren zijn kort en erg specifiek. Dat moet ook wel, want soms wil een cel slechts één versie van een gen stilleggen. Echter, voor virusbestrijding is dit een nadeel. Een virus is een soort maffia; alle bendeleden zijn duidelijk aan elkaar verwant, maar niet identiek. Met RNAi kun je specifieke leden uitschakelen, maar de bende verschuift gewoon zijn genetische basis een beetje en blijft voortbestaan. Kortom, een virus is een bewegend doel, dat ons altijd een stap voor is. De trefzekerheid kan men verhogen met een 'schot hagel' van verschillende RNAi's, gericht op meerdere delen van het virus RNA, in de hoop dat één ervan doel treft. Verder werkt RNAi voornamelijk in de open celvloeistof (cytoplasma), waarin het afgedankte mRNA wordt geloosd. Maar het virus vermenigvuldigt zich in verborgen hoekjes van de cel en beschermt zijn RNA achter een productielijn van eiwitten tot-

dat het veilig verpakt is in een virusdeeltje. Bovendien kunnen virussen het RNAi-systeem ondergraven door er hun eigen RNAi-informatie in te stoppen, gericht op de afweergenen van de gastheer. Verder saboteren sommige virussen het vernietigingscomplex met eiwitten of door antivirale RNAi-opsporingsberichten te onderscheppen.

## Undercover achter de linies

Nu laat de gastheer zich dit niet zomaar overkomen. Het genoom (erfelijk materiaal) van de meeste virussen bestaat uit RNA. Voor vermenigvuldiging moet het virus eerst een 'negatief' van zijn RNA maken, dat vervolgens wordt gebruikt om 'positieve' afdrucken te maken: ongeveer zoals bij klassieke fotografie. De gastheer zelf echter produceert RNA meer zoals een printer: enkel 'positief' RNA, een directe afdruk van het DNA-genoom. Alle RNA waarvan een complementair negatief en positief aan elkaar vastzit, is dus hoogstwaarschijnlijk een virus dat zich aan het vermenigvuldigen is. De gastheer valt zulk dubbelstrengs RNA aan en de kleingehakte stukjes gaan in het RNAi-systeem, om nog meer virus-RNA op te sporen. Soms verleidt de gastheer een inactief virus expres tot vermenigvuldigen, om het RNAi-systeem op gang te brengen met zulke verknipte stukjes virus RNA. Andere gastheren hebben delen van het vermenigvuldigingssysteem van het virus naar hun eigen genoom gekaapt om een onwillig virus tot repliceren te kunnen forceren. Tenslotte kunnen de RNAi-opsporingsberichten vooruit gestuurd worden naar buurcellen, ter voorbereiding op een mogelijke aanval. De gastheer kan zelfs terrein opofferen door geïnfecteerde cellen doelgericht te laten afsterven, om te voorkomen dat het virus zich verder verspreidt.

## RNAi-behandeling van bijenvirussen

### De RNAi-laboratoriumexperimenten

De eerste proeven met RNAi-behandeling tegen bijenvirussen waren op kleine schaal; in gesloten bevruchtungskastjes met leggende koningin voor het testen van RNAi tegen Israëlisch acuut-verlamingsvirus (IAPV) in volwassen bijen (Maori e.a., 2009) res-



pectievelijk in raten voor de behandeling van Chinees zakbroedvirus (CSBV) in larven van *Apis ceranae* (Liu e.a., 2010). Enkele dagen lang kregen de bijen een grote overmaat RNAi gevoerd, vóórdat het virus werd toegediend, en daarna nog enkele dagen. Deze bijen werden vergeleken met bijen die noch RNAi noch virus kregen; enkel virus kregen; enkel RNAi kregen, of virus en een placebo-RNAi (tegen een niet-bestaand doelwit-RNA). 'Bijensterfte' en 'virusniveau' waren de belangrijkste te beoordelen grootheden, want daartegen is het RNAi-medicijn ontwikkeld.

Beide experimenten leverden vergelijkbare conclusies op:

1. Behandeling met RNAi verlaagde na 4 dagen de hoeveelheid virus met 80-99% en de sterfte door virusinfectie (na aftrek van normale sterfte) met 66-90%.
2. Het placebo-RNAi had geen effect op virushoeveelheid of sterfte. RNAi werkt dus alleen als het specifiek is voor het doelwit.
3. Enkel RNAi had geen effect op normale sterfte. RNAi is dus niet giftig.
4. Sommige RNAi-constructen werken beter dan andere. Het ontwerp van een RNAi-construct is dus belangrijk.

#### *De RNAi veldproeven*

De moeilijkste stap bij productontwikkeling is die van lab naar praktijk. Allerlei onvoorspelbare factoren die de behandeling zelf of de waarnemingen beïnvloeden gaan nu meespelen.

Op drie plaatsen in de VS, Florida, Pennsylvania en California, deden Hunter e.a. (2010) grote veldproeven met RNAi-behandeling tegen IAPV. Ook nu weer kreeg het RNAi een stevige voorsprong op de virusinfectie, met voortgezette behandeling naderhand. De proeven hadden een soortgelijke opzet als voorheen: enkel virus; enkel RNAi; RNAi en virus allebei; noch RNAi noch virus. Een uitstekend verslag van de veldproeven in California, geschreven door een deelnemende beroepsimker, is te vinden op [www.scientificbeekeeping.com](http://www.scientificbeekeeping.com). Maar, in plaats van de bijensterfte direct te meten, keek men voornamelijk naar de indirecte effecten zoals volksontwikkeling, haaldrift en honingopbrengst: eigenschappen die sterk beïnvloed worden door externe factoren. En in plaats van de omvang van de IAPV-infectie in de volken, bekeek men de hoeveelheid RNAi-afbraakproducten (logischerwijs hoger in de RNAi-behandelde

volken dan in de controlevolken). Daarom is dit onderzoek minder doorslaggevend dan het had kunnen zijn. Toch kunnen we enige conclusies trekken:

1. Noch RNAi noch het virus had enig effect op de hoeveelheid gesloten broed.
2. Globaal gezien had het virus een negatief effect op de omvang van het volwassen volk en (dus) op haaldrift en honingopbrengst. Met RNAi-behandeling vooraf kon dat grotendeels worden voorkomen.
3. De drie proeven pakten heel verschillend uit, met de sterkste effecten in California (inclusief instorten van volken door IAPV) terwijl in Pennsylvania geen enkel effect van IAPV of RNAi-behandeling werd gevonden.

Vooraf dit laatste is van belang, omdat het suggereert dat het rendement van RNAi-behandeling afhangt van externe factoren, zowel als van de virusstatus van het volk.

#### **De toekomst voor RNAi**

Natuurlijk zijn dit zeer veelbelovende resultaten. Eindelijk is er een product tegen virussen dat doeltreffend en specifiek is, zonder negatieve bijwerkingen voor bijen en dat notabene toegediend kan worden met voer! Bij zulke zonnige berichten mag je eigenlijk niet mopperen. Toch moeten we erop wijzen dat deze proeven waren opgezet om RNAi de grootste kans van slagen te geven. De bijen werden lang voor de virusinfectie volgepompt met RNAi, waardoor de cellen een overgrote wapenvoorraad gereed hadden om het virus te overrompelen terwijl het de darm passeerde. Voor alle zekerheid kregen de bijen na infectie nog een fikse dosis RNAi erbovenop. Eerlijk gezegd had het virus geen schijn van kans.

Daarmee is de preventieve werking weliswaar aangetoond, maar het genezend effect nog niet. Dat komt pas als RNAi een hardnekkige, diep verborgen chronische infectie of een laaiende epidemie kan onderdrukken, wat een realistischer virusbehandelings-scenario is.

Er is nog veel werk nodig voor er sprake is van een betrouwbaar routinemiddel voor virusbestrijding bij bijen. Op basis van de huidige kennis betreffende RNAi, is dit ongeveer wat we mogen verwachten:

1. Op moleculair en celniveau werkt deze technologie terdege en precies. Moeilijker is de RNAi betrouwbaar in de cellen te krijgen waar het zijn werk moet doen. Dat RNAi via voer effectief aan bijen kan

- worden toegediend is een groot voordeel.
2. De technologie is zeer flexibel en op allerlei virusziektes toepasbaar: het voornaamste verschil is de RNAi-codering, die eenvoudig is te ontwerpen. Dit maakt het ook vrij makkelijk om eventuele resistentievorming bij te benen.
3. Een rendement van 99% is voor RNAi-begrippen uitmuntende doeltreffendheid, maar voor een virus betekent dat enkel een vermindering van miljarden naar miljoenen virusdeeltjes per bijtje. Dat is genoeg om de symptomen te onderdrukken, maar biedt zeker geen complete genezing, zoals bij antibiotica of pesticiden. We moeten RNAi dan ook voornamelijk beschouwen als een hulpmiddel bij tijdelijke (virus-)overlast en niet als een afdoend geneesmiddel. Uiteindelijk zullen de virussen toch blijven bestaan, zoals ze dat al eeuwen hebben gedaan.

*De auteur werkt bij het Department of Ecology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 750 07, Sweden, [joachim.rodriguez.de.miranda@slu.se](mailto:joachim.rodriguez.de.miranda@slu.se).*

#### **Literatuur**

Zie [www.bijenhouders.nl](http://www.bijenhouders.nl) > tijdschriften > aanvullende informatie > maart 2012

