

Aus dem Institut für
Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V.

**Weitere Aufklärung molekularer Details
zur Pathogen-Wirt-Beziehung im Verlauf
der Pathogenese einer Infektion von Bienenlarven mit
*Paenibacillus larvae***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Henriette Knispel
Tierärztin aus Neustrelitz

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4121

Aus dem Institut für
Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V.

**Weitere Aufklärung molekularer Details zur Pathogen-Wirt-Beziehung im
Verlauf der Pathogenese einer Infektion von Bienenlarven mit
*Paenibacillus larvae***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Henriette Knispel
Tierärztin aus Neustrelitz

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4121

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Elke Genersch
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Marcus Fulde

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Apis, paenibacillus larvae, american foul brood, virulence factors, oxygenases, chitin, immunofluorescence, pathogenesis

Tag der Promotion: 25.09.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-010-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2019 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

| | |
|---|------------|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abkürzungsverzeichnis..... | IV |
| Abbildungsverzeichnis..... | VII |
| Tabellenverzeichnis..... | IX |
| | |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| | |
| 1.1. Die Amerikanische Faulbrut | 1 |
| 1.2. Der Wirt - die Honigbiene..... | 4 |
| 1.3. Das Immunsystem der Honigbienenlarve | 5 |
| 1.3.1 Mechanische Barrieren im Larvendarm..... | 5 |
| 1.3.2 Lokale und systemische Immunantwort | 6 |
| 1.4. Der Erreger - <i>Paenibacillus larvae</i> | 11 |
| 1.4.1 Klassifizierung von <i>P. larvae</i> | 11 |
| 1.4.2 <i>P. larvae</i> Genotypen | 11 |
| 1.5. Bestätigte Virulenzfaktoren | 14 |
| 1.5.1 <i>P. larvae</i> chitinbindendes Protein 49 (<i>PICBP49</i>)..... | 14 |
| 1.5.2 <i>P. larvae</i> binäre Toxine..... | 15 |
| 1.5.3 <i>P. larvae</i> S-layer Protein (<i>SplA</i>)..... | 16 |
| 1.6. Ziel der Arbeit..... | 18 |
| | |
| 2. Material und Methoden | 19 |
| | |
| 2.1. Materialien | 19 |
| 2.1.1 Chemikalien & Reagenzien | 19 |
| 2.1.2 Geräte..... | 21 |
| 2.1.3 Verbrauchsmittel..... | 23 |
| 2.1.4 Enzyme und Kits..... | 24 |
| 2.1.5 Anzuchtmedien | 25 |
| 2.1.6 Puffer und Gele | 26 |
| 2.1.7 Oligonukleotide..... | 26 |
| 2.1.8 Software | 31 |
| 2.1.9 Bakterienstämme..... | 32 |
| 2.2. Verwendete <i>P. larvae</i> Stämme..... | 33 |
| 2.2.1 Anzucht von <i>P. larvae</i> | 33 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.2.2 | Herstellung von Sporensuspension und Konzentrationsbestimmung | 33 |
| 2.2.3 | Herstellung elektrokompetenter <i>P. larvae</i> Zellen..... | 34 |
| 2.3. | Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> | 34 |
| 2.3.1 | Anzucht von <i>Escherichia coli</i> | 34 |
| 2.3.2 | Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 34 |
| 2.3.3 | Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 35 |
| 2.4. | Klonierung - Herstellung von Mutanten | 35 |
| 2.4.1 | Knockout Konstruktion..... | 35 |
| 2.4.2 | Klonierung von <i>cbp49</i> in den <i>E. coli</i> Expressionsvektor pRSETB..... | 36 |
| 2.4.3 | Klonierung von <i>spIA</i> in den Expressionsvektor pAD43-25- <i>ery</i> | 38 |
| 2.5. | Proteinexpression und Charakterisierung | 40 |
| 2.5.1 | Detektion des heterolog exprimierten SpIA-His ₆ in <i>P. larvae</i> ERIC I | 40 |
| 2.5.2 | Expression und Aufreinigung von recPICBP49 aus <i>E. coli</i> | 40 |
| 2.5.3 | SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 41 |
| 2.5.4 | Chitinabbau-Assay | 42 |
| 2.5.5 | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight (MALDI-TOF) | 42 |
| 2.5.6 | High Performance Liquid Chromatography (HPLC) | 43 |
| 2.6. | Larveninfektionsversuch | 43 |
| 2.7. | Genexpressionsanalyse..... | 45 |
| 2.7.1 | Versuchsaufbau der Genexpressionsanalyse | 45 |
| 2.7.2 | RNA-Isolierung | 48 |
| 2.7.3 | RNA-Qualitätskontrolle | 49 |
| 2.7.4 | RNA-Seq: Herstellung einer cDNA-Bibliothek und RNA Sequenzierung | 50 |
| 2.7.5 | RNA-Seq: Genexpressionsanalyse | 50 |
| 2.7.6 | Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)..... | 52 |
| 2.8. | Platteninhibitionsassays..... | 53 |
| 3. | Ergebnisse | 54 |
| 3.1. | Weitere Untersuchung zur Relevanz von PICBP49 | 54 |
| 3.1.1 | Identifizierung eines präferierten Substrats | 54 |
| 3.1.2 | Kinetik von recPICBP49 | 57 |
| 3.2. | Weitere Untersuchung zur Relevanz von SpIA..... | 59 |
| 3.2.1 | Heterologe Expression von <i>spIA</i> in <i>P. larvae</i> Genotyp ERIC I | 59 |
| 3.2.2 | Larveninfektionsversuche mit der Mutante ATCC9545+ <i>spIA</i> | 61 |
| 3.3. | Untersuchung der Immunantwort..... | 62 |
| 3.3.1 | Qualitätskontrolle der RNA-Seq-Daten..... | 63 |

| | |
|--|-------------|
| 3.3.2 Analyse der Genexpressionsmuster..... | 66 |
| 3.3.3 Verifizierung der Genexpressionsmuster | 71 |
| 3.3.4 Platteninhibitionsassay | 76 |
| 4. Diskussion | 77 |
| 4.1. Rolle von zwei gezeigten Virulenzfaktoren | 77 |
| 4.1.1 Das chitinbindende und -abbauende Protein <i>PICBP49</i> | 77 |
| 4.1.2 Das ERIC II-spezifische S-layer Protein <i>SplA</i> | 81 |
| 4.2. Die larvale Immunantwort auf eine Infektion mit <i>P. larvae</i> | 83 |
| 4.2.1 Untersuchung immunrelevanter Gene in <i>A. mellifera</i> während einer Infektion mit <i>P. larvae</i> | 83 |
| 4.2.2 Immunantwort in individuellen Larven | 90 |
| 4.2.3 Pathogenese-strategien der <i>P. larvae</i> Genotypen ERIC I und ERIC II | 93 |
| 4.2.4 Immunantwort von <i>A. mellifera</i> und die Überwindungsstrategie von <i>P. larvae</i> ... | 95 |
| 5. Zusammenfassung | 98 |
| 6. Summary | 100 |
| 7. Literaturverzeichnis | 102 |
| 8. Anhang | XI |
| 8.1. Zusätzliche Abbildungen | XI |
| 8.2. Zusätzliche Tabellen..... | XIII |
| Publikationen | XXI |
| Danksagung | XXII |
| Finanzierungsquellen | XXIV |
| Selbstständigkeitserklärung | XXV |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| 2D | Zweidimensional |
| Abb. | Abbildung |
| A-Domäne | Aktive Domäne |
| AFB | Amerikanische Faulbrut |
| amp | Ampicillin |
| ANOVA | Varianzanalyse (analysis of variance) |
| APS | Ammonium Peroxodisulfat |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| B-Domäne | Bindedomäne |
| BHI | Hirn-Herz-Bouillon (brain heart infusion) |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin (bovine serum albumine) |
| bzw. | Beziehungsweise |
| cAMP | Zyklisches Adenosinmonophosphat |
| cDNA | komplementäre DNA (complementary DNA) |
| cfu | Koloniebildende Einheit (colony forming unit) |
| CSA | Columbia Schafblut Agar |
| DAP | Diaminopimelinsäure |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-Phenylindol |
| DEG | differenziell exprimiertes Gen |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DIC | Differenzialinterferenzkontrast |
| DNA | Desoxyribonukelinsäure |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ERIC | Enterobacterial Repetitiv Intergenic Consensus |
| ery | Erythromycin |
| EtOH | Ethanol |
| FISH | Fluoreszenz in situ Hybridisierung |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FLI | Friedrich-Löffler Institut |
| g | Erdbeschleunigung und Gramm |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| GGBP | gramnegativ binding protein |
| His ₆ | 6 x Histidinrest |
| iDiv | Deutsches Zentrum für integrative Biodiversitätsforschung, Halle-Jena-Leipzig |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| kV | Kilovolt |

| | |
|--------------------|---|
| I | Liter |
| LB | Luria Bertani |
| LC | Letale Konzentration |
| lfc | log ₂ fold change |
| LMG | Stamm der belgischen Stammsammlung |
| LT | Letale Zeit |
| M | Molar |
| MALDI-TOF | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight |
| MCS | Polylinker (multiple cloning site) |
| mg | Milligramm |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| ML | Midgut lumen |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| mRNA | Messenger RNA |
| MTX | moskitozidales Toxin |
| MYPGP | Mueller-Hinton broth, Hefeextrakt (yeast extract), Kaliumphosphat (potassium phosphate), Glucose, Pyruvat |
| NCBI | National Centre for Biotechnology Information |
| nM | Nanomolar |
| NRPS | Nicht-ribosomale Peptid Synthetase |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | Offenes Leseraster (open reading frame) |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| PAMP | pathogen-associated molecular pattern |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PGN | peptidoglycan |
| PGRP | peptidoglycan recognition protein |
| p.i. | Nach Infektion (post infectionem) |
| PKS | Polyketid Synthetase |
| <i>P. larvae</i> | <i>Paenibacillus larvae</i> |
| <i>PICBP49</i> | <i>Paenibacillus larvae</i> chitinbindendes Protein 49 |
| <i>plx</i> | <i>Paenibacillus larvae</i> Toxin |
| qPCR | quantitative Echtzeit-PCR (Quantitative Real-Time PCR) |
| rec <i>PICBP49</i> | rekombinantes <i>PICBP49</i> aus <i>E. coli</i> (recombinant <i>PICBP49</i>) |
| rlog | regularisierter Logarithmus |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNA-Seq | RNS Sequenzierung |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase-PCR |
| s | Sekunden |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate) |

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| SEM | Standardfehler |
| SLH | S-Layer Homologie Domäne |
| <i>sp/A</i> | S-Layer Protein <i>P. larvae A</i> |
| SSH | Suppression Subtractive Hybridisation |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | Tris gepufferte Salzlösung |
| Tris | Tris (hydroxymethyl)-aminomethan |
| u. a. | unter anderem |
| z. B. | zum Beispiel |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Infektionsverlauf der AFB. | 2 |
| Abb. 2: Aktivierung des Imd- und Toll-Signalwegs über verschiedene Peptidoglykane (PGN). | 8 |
| Abb. 3: Sporen- und Koloniemorphologie der <i>P. larvae</i> Genotypen ERIC I-IV. | 12 |
| Abb. 4: Virulenz der verschiedenen <i>P. larvae</i> Genotypen. | 13 |
| Abb. 5: Pathogenesestrategien von <i>P. larvae</i> Genotyp ERIC I und ERIC II. | 17 |
| Abb. 6: Schematische Vektorkarte von pRSETB+ <i>cbp49</i> | 37 |
| Abb. 7: Schematische Vektorkarte von pAD43-25+ <i>spIA</i> -His ₆ - <i>ery</i> | 39 |
| Abb. 8: Übersicht Larveninfektionsversuch. | 45 |
| Abb. 9: Monitoring der Larvenmortalität, Analyse des Transkriptoms und der Immungen- expression. | 47 |
| Abb. 10: Reverse Transkriptase (RT)-PCR zur Überprüfung des Infektionsstatus der verwendeten Larven-RNA. | 50 |
| Abb. 11: Erfolgreiche Aufnahme des Vektors pRSETB+ <i>cbp49</i> in <i>E. coli</i> Stellar Competent Cells. | 55 |
| Abb. 12: Identifizierung eines bevorzugten Substrats von <i>recPICBP49</i> | 56 |
| Abb. 13: Bestimmung des optimalen pHs und der optimalen Inkubationszeit von <i>recPICBP49</i> mit β -Chitin anhand des oxidierten Hexamers. | 57 |
| Abb. 14: Produktprofil von <i>recPICBP49</i> nach zweistündiger Inkubation mit β -Chitin bei pH 7. | 58 |
| Abb. 15: Überprüfung der Aufnahme des Plamids pAD43-25+ <i>spIA</i> -His ₆ - <i>ery</i> | 59 |
| Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Detektion des heterolog exprimierten <i>SpIA</i> -His ₆ in <i>P. larvae</i> ERIC I (ATCC9545). | 60 |
| Abb. 17: Bestimmung der Gesamt- und kumulativen Mortalität in der mit ATCC9545 und der ATCC9545+ <i>spIA</i> infizierten Gruppe. | 62 |
| Abb. 18: Verteilung der Genexpressionsdaten aller sequenzierten Poolproben. | 63 |
| Abb. 19: Überprüfung der Beschaffenheit der durchgeführten biologischen Replikate. | 64 |
| Abb. 20: Expressionslevel der Haushalts- und Referenzgene über alle Poolproben. | 66 |
| Abb. 21: Bestimmung differenziell exprimierter Gene (DEGs). | 67 |
| Abb. 22: Vergleich der Veränderung der Expression ausgewählter Gene, unter Berücksichtigung der Zugehörigkeit zu bereits beschriebenen immunrelevanten Signalwegen. | 70 |
| Abb. 23: Verifizierung der bioinformatischen Ergebnisse der RNA-Seq-Daten mittels qPCR. | 72 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 24: Untersuchung der Genexpression ausgewählter immunrelevanter Gene in RNA individueller Larven infiziert mit der Mutante ERIC I+ <i>sp/A</i> bzw. dem Knockout ERIC II Δ <i>sp/A</i> | 75 |
| Abb. 25: Platteninhibitionsassay mit Hymenoptaecin gegen verschiedene Bakterien. | 76 |
| Abb. 26: Übersicht hochregulierter Gene des Toll- und Imd-Signalwegs. | 85 |
| Zusätzliche Abb. A1: Erfolgreiche Klonierung von <i>sp/A</i> -His ₆ in den Vektor pAD43-25- <i>ery</i> | XI |
| Zusätzliche Abb. A2: Änderung der Expression ausgewählter Gene aus der qPCR und der RNA-Seq-Analyse. | XI |
| Zusätzliche Abb. A3: MS-Orbitrap Spektrum und Sequenzanalyse der unteren Bande des <i>recP/CBP49</i> | XII |
| Zusätzliche Abb. A4: SDS-PAGE Analyse von Äkta-Fractionen nach Aufreinigung von <i>P. larvae</i> Überständen über Chitin Resin (NEB) mittels Affinitäts- chromatographie. | XII |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|------|
| Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien | 19 |
| Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Geräte | 21 |
| Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmittel | 23 |
| Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Enzyme | 24 |
| Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Kits | 25 |
| Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Medien | 25 |
| Tab. 7: In dieser Arbeit verwendete Puffer | 26 |
| Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Gele | 26 |
| Tab. 9: <i>P. larvae</i> Primer | 27 |
| Tab. 10: <i>A. mellifera</i> Primer | 30 |
| Tab. 11: In dieser Arbeit verwendete Software | 31 |
| Tab. 12: In dieser Arbeit verwendete <i>P. larvae</i> Stämme | 32 |
| Tab. 13: Selektive Anzucht verwendeter manipulierter Stämme | 32 |
| Tab. 14: Weitere verwendete Bakterienstämme | 32 |
| Tab. 15: Protokoll der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) | 53 |
| Tab. 16: Vergleichende Übersicht der Ergebnisse aus der RNA-Seq und der qPCR | 73 |
| Zusätzliche Tab. Z1: Zugeordnete Fragmentanzahlen der RNA-Seq Poolproben | XIII |
| Zusätzliche Tab. Z2: Anzahl differentiell exprimierter Gene (DEGs) in den experimentellen Gruppen | XIII |
| Zusätzliche Tab. Z3: <i>DESeq2</i> -Werte von Genen mit Zuordnung zu Signalwegen | XIV |

1. Einleitung

1.1. Die Amerikanische Faulbrut

Die Westliche Honigbiene (*Apis mellifera*) nimmt durch ihre breite Bestäubungstätigkeit in natürlichen als auch landwirtschaftlich genutzten Ökosystemen eine bedeutende Rolle ein (Aizen *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2007; Steffan-Dewenter *et al.*, 2002). Eine effiziente Bestäubung der Pflanzen, sowie die Gesundheit und Leistungsfähigkeit der Honigbiene, sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt (Aizen *et al.*, 2008; Grozinger & Robinson, 2015; Klein *et al.*, 2007; Morse & Calderon, 2000; Oldroyd, 2007; Potts *et al.*, 2016). Honigbienen sind wie alle Organismen Pathogenen, wie Bakterien, Pilzen, Viren, Protozoen und Parasiten ausgesetzt, welche zu Erkrankungen und letztlich zum Tod führen können. Eine der verheerendsten Erkrankungen der Honigbiene ist die weltweit vorkommende Amerikanische Faulbrut (AFB), welche durch das grampositive, sporenbildende Bakterium *Paenibacillus larvae* verursacht wird (Genersch *et al.*, 2006). Die AFB ist eine hochansteckende bakterielle Erkrankung der Bienenbrut (Hitchcock J.D. *et al.*, 1979; Wilson, 1971), die über sporenhaltiges Futter auf die Bienenlarven übertragen wird (Abb. 1 A). Die infektiöse Form des Erregers *P. larvae* sind die Sporen (Hornitzky, 1998; Tarr, 1937). Lediglich junge Larven im Alter von 12-48 h nach Eischlupf sind für eine Infektion mit *P. larvae* anfällig (Hitchcock J.D. *et al.*, 1979; Wilson, 1971; Woodrow, 1942; Woodrow & Holst, 1942). Nach Auskeimung der Sporen kommt es im Mitteldarm zu einer massiven Vermehrung der vegetativen Bakterien (Abb. 1 B). In dieser Phase findet keine sichtbare Schädigung des Darmgewebes der Larve statt. *P. larvae* lebt zunächst kommensal im Darm der Honigbienenlarve und ernährt sich vom Futter der Larve (Genersch, 2010; Julian & Bulla, 1971; Neuendorf *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2008). Ist der Darm gänzlich mit Bakterien gefüllt, erfolgt der Wechsel zur invasiven Lebensphase. *P. larvae* zerstört das Darmwandepithel und wandert über die parazelluläre Route ins Hämocoel ein (Yue *et al.*, 2008). Zeitgleich mit dem Durchbruch der Darmwand stirbt die Honigbienenlarve. Die Larvenüberreste werden vollständig zersetzt, lediglich eine charakteristische fadenziehende Masse bleibt zurück (Abb. 1 C). *P. larvae* befindet sich nun in der saprophytische Lebensphase. Die fadenziehende Masse trocknet im weiteren Verlauf an der Wand der Brutzelle zu einem festanhaltenden Schorf ('Faulbrutschorf') ein, welcher aus Millionen von Sporen besteht (Bailey & Ball, 1991; Gregorc & Bowen, 1998; Lindström, 2008; Sturtevant, 1932).

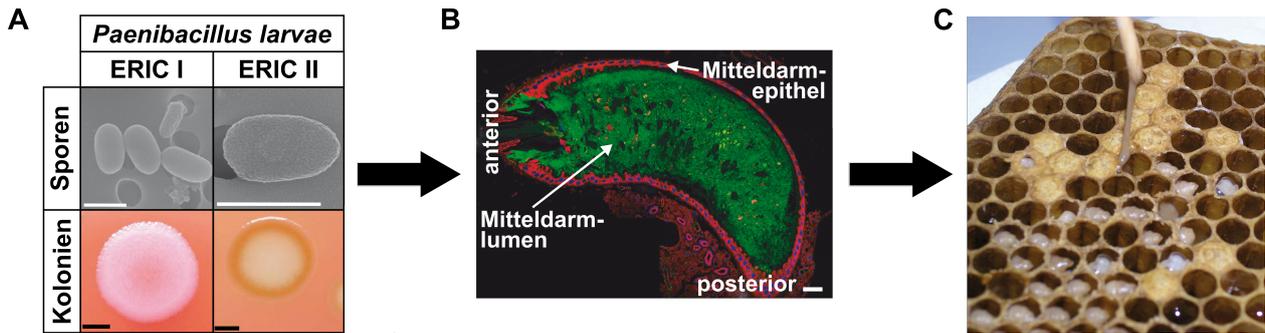


Abb. 1: Infektionsverlauf der AFB. (A+B) *P. larvae* Sporen werden über das Futter von bis zu 36 h alten Larven aufgenommen und keimen im Darm der Larve zu vegetativen Bakterien aus. Es kommt zur massiven Vermehrung der Bakterien im Larvendarm. Im weiteren Verlauf durchbricht *P. larvae* das Darmepithel, dringt über die parazelluläre Route in das Hämocoel der Larve ein und zersetzt das Larvengewebe zu einer charakteristischen fadenziehenden Masse (C). Diese Masse besteht aus Millionen von *P. larvae* Sporen. Durch die Beseitigung der klebrigen fadenziehenden Masse kontaminieren sich Ammenbienen mit Sporen und kommt es zur weiteren Verbreitung der Sporen im Volk.

A. Elektronenmikroskopische Aufnahme der Sporen (obere Reihe) der *P. larvae* Genotypen ERIC I und ERIC II (Balken 1 μ m). Koloniemorphologie (untere Reihe) der *P. larvae* Genotypen ERIC I und ERIC II auf CSA (Balken 1 mm) (modifiziert nach Genersch *et al.*, 2006).

B. *Fluorescence in situ hybridization* (FISH)-Analyse eines Längsschnitts einer Larve an Tag vier nach Infektion mit *P. larvae* (Balken 80 μ m) (modifiziert nach Yue *et al.*, 2008). Eingesetzt wurden spezifische Sonden für die 16S rRNA von *P. larvae* (grün) sowie für die 18S rRNA (rot) von eukaryotischen Zellen. Die Zellkerne eukaryotischer Zellen sind blau dargestellt.

C. Klinische Diagnose der AFB mit Hilfe der Streichholzprobe. An AFB gestorbene Larven werden zu einer klebrigen fadenziehenden Masse zersetzt, welche mittels Streichholzprobe dargestellt werden kann und so die klinische Diagnose der AFB bestätigt (Genersch, 2007).

Durch die Beseitigung des Faulbrutschorfes durch die Ammenbienen und den anschließenden Kontakt zu Artgenossen verbreiteten sich die Sporen rasant innerhalb des Bienenvolkes. Aber auch zwischen den Völkern geschieht die Übertragung der Sporen von *P. larvae* leicht (Fries & Camazine, 2001). Durch imkerliches Management der Völker (Austausch von Materialien, hohe Anzahl von Völkern an einem Standort) oder das natürliche Verhalten der Bienen (Brutpflege, Verflug, Räuberei) sind einmal eingebrachte Sporen schnell verbreitet (Fries & Camazine, 2001). Ist ein Volk erkrankt, kommt es durch den fortschreitenden Verlust der Brut zur Schwächung und bei nicht Behandlung letztlich zum Kollaps des Volkes. Aber auch außerhalb des Bienenvolkes sind die Sporen in der Umwelt außerordentlich widerstandsfähig und auch nach Jahrzehnten noch infektiös (Hasemann, 1961). Da Sanierungsverfahren (Kunstschwarmverfahren) meist nicht zur Tilgung der Seuche führen, ist momentan die Verbrennung kontaminierter Völker und aller Materialien die einzige effektive Bekämpfungsmethode (Ohe, 2003; Pernal *et al.*, 2008).

In den meisten europäischen Ländern ist der Einsatz von Antibiotika zur Bekämpfung von Bienenkrankheiten gesetzlich verboten (Honigverordnung; VO (EG) 470/2009; VO (EU) 37/2010). In den Ländern, in denen der Antibiotikaeinsatz zugelassen ist, wird üblicherweise Oxytetracyclin oder Sulfathiazol als Präventions- und Behandlungsmaßnahme eingesetzt. Diese Vorgehensweise führt lediglich zum Verschleiern der Symptome und nicht zur Tilgung der Seuche. Die Sporen überdauern eine antibiotische Behandlung und nach Absetzen der Medikamente bricht die AFB erneut aus (Genersch, 2010). Die mögliche Folge einer solchen Behandlung ist die Weiterverbreitung von Resistenzen in *P. larvae* (Evans, 2003; Lodesani & Costa, 2005; Miyagi *et al.*, 2000; Mussen, 2000; Piccini & Zunino, 2001). Darüber hinaus sind Antibiotikarückstände ein Risiko für den Verbraucher und beeinträchtigen die Qualität des Lebensmittels Honig (Lodesani & Costa, 2005; Martel *et al.*, 2006). Darüber hinaus kann es durch den Einsatz von Antibiotika zu Störungen der larvalen Entwicklung und der Lebensdauer adulter Bienen kommen (Peng *et al.*, 1992).

Aufgrund der hohen Ansteckungsgefahr und Letalität gehört die AFB in Deutschland zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen und ist in der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) aufgeführt. Durch diese Einstufung muss bereits der Verdacht dem zuständigen Amtstierarzt angezeigt werden. Die Bekämpfung der AFB ist im Tiergesundheitsgesetz (TiersGesG) und der Bienenseuchenverordnung (BienSeuV) in der jeweils geltenden Fassung geregelt. Mit der Leitlinie zur Bekämpfung der Amerikanischen Faulbrut vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Januar 2013) wurden die in den Bundesländern sehr unterschiedlich geregelte Bekämpfung der AFB bundesweit weiter vereinheitlicht (Genersch, 2012). Diese Leitlinie stellt jedoch lediglich eine Empfehlung dar und hat noch keinen Einfluss auf die unterschiedlichen landesrechtlichen Regelungen. Wie wichtig eine bundeseinheitliche Bekämpfung ist, zeigt die zwischen 2008-2012 kontinuierlich angestiegene Zahl offiziell gemeldeter AFB-Ausbrüche. Wurden im Jahr 2008 noch 154 offiziell gemeldete AFB-Ausbrüche verzeichnet, waren es im Jahr 2012 bereits 265 AFB-Ausbrüche deutschlandweit (TSN-Tiergesundheitsjahresberichte 2008-2012, FLI Wusterhausen). *P. larvae* ist ein äußerst erfolgreiches und verheerendes Pathogen und es ist von großem Interesse weitere molekulare Details der Pathogen-Wirt-Beziehung aufzuklären.

1.2. Der Wirt - die Honigbiene

Neben der Bestäubung von Wildpflanzen nimmt die Honigbiene eine zentrale Rolle bei der Bestäubung landwirtschaftlich extensiv genutzter Flächen ein. Weltweit hat die Fläche von Bestäubungsabhängigen Pflanzen massiv zugenommen und der Bedarf an Bestäubung wächst (Aizen *et al.*, 2008). Aufgrund der vielseitigen, günstigen und einfachen Handhabung gehört die Honigbiene zu einem der wichtigsten Nutztiere (Morse & Calderon, 2000). Obwohl die Bestäubung durch die Honigbiene nicht essentiell für die menschliche Ernährung ist, trägt diese erheblich zur Vielseitigkeit und Ausgewogenheit bei (Klein *et al.*, 2007; Morse & Calderon, 2000; Steffan-Dewenter *et al.*, 2005). Trotz steigender Nachfrage wird in den USA und Europa von sinkenden Völkerzahlen innerhalb der letzten Jahrzehnte berichtet (Aizen & Harder, 2009; Potts *et al.*, 2010). Neben der Bedeutung für die Landwirtschaft, ist die facettenreiche Honigbiene auch für die Wissenschaft von großem Interesse. Die Organisation im Volk, das Verhalten, die Neurobiologie, die Genetik sowie die Immunologie der Honigbiene waren bereits Gegenstand in vielen Studien. Im Gegensatz zu anderen Insekten-Modellen können in der Honigbiene natürlich vorkommende Krankheiten durch Infektionen mit Pathogenen untersucht werden. Dies ist ein großer Vorteil zu anderen Insekten wie beispielsweise der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, welche künstlich mit Bakterien infiziert werden (z.B. per Injektion), diese aber in der Natur keine Auslöser von Krankheiten sind. Die Honigbiene eröffnet die Möglichkeit Krankheiten und deren Verbreitung sowie die Immunantwort realitätsnah und im Labormaßstab genauer zu untersuchen. Die Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktion zwischen der Honigbienenlarve und dem Bakterium *P. larvae* ist also auf ökonomischer und wissenschaftlicher Ebene von großem Interesse.

In einem Bienenvolk erfolgt die Unterteilung der Individuen in verschiedene Kasten. Das Kastensystem setzt sich zusammen aus einer eierlegenden Königin, mehreren zehntausend nicht-reproduzierenden Arbeiterinnen und ungefähr eintausend Drohnen. Als eusoziale Insekten betreiben Honigbienen eine gemeinsame Brutpflege und die reproduzierbare Teilung der Arbeit bei der sich mindestens zwei Generationen in der Kaste der Arbeiterinnen überlappen (Wilson, 1975). Die Entwicklung der einzelnen Biene erfolgt vom Ei über ein Larven- und Puppenstadium bis hin zum Imago. Der Schlupf aus dem Ei erfolgt nach drei Tagen und für weitere drei Tage erfolgt die Fütterung mit Gelée Royale. Anschließend erfolgt eine Änderung der Fütterung je nach Zugehörigkeit zur Kaste. Königinnen-Larven erhalten weiterhin Gelée Royale, im Gegensatz dazu erhalten Arbeiterinnen-Larven mit Zuckerlösung verdünntes Gelée Royale. Je nach Kaste schlüpft nach 16 Tagen eine Königin, nach 21 Tagen eine Arbeiterin oder nach 24 Tagen ein Drohn aus einer verdeckelten Brutwabe (Britannica, 1998).

Die hohe Anzahl von Individuen in einem Bienenvolk lässt vermuten, dass Krankheiten sich rasant verbreiten und hohen Schaden anrichten. Die Honigbiene hat jedoch verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt, um sich vor Krankheiten zu schützen.

1.3. Das Immunsystem der Honigbienenlarve

1.3.1 Mechanische Barrieren im Larvendarm

P. larvae lebt zunächst nicht-invasiv als Kommensale im Darm der Honigbienenlarve. Die vegetativen Bakterien vermehren sich massiv im Darmlumen (Yue *et al.*, 2008). Nachdem das von der Larve aufgenommene Futter nicht mehr ausreicht, um die Masse der Bakterien zu ernähren, muss larvales Gewebe als weitere Nährstoffquelle erschlossen werden. Bevor ein Durchbruch ins Hämocoel der Larve erfolgen kann, müssen verschiedene mechanische Barrieren überwunden werden. Die erste Barriere auf die *P. larvae* trifft, ist die peritrophe Membran, eine chitinreiche Schutzschicht des Darmepithels, gefolgt vom Darmepithel und der Basalmembran (Yue *et al.*, 2008).

Die peritrophe Membran (PM) ist eine zellfreie, semipermeable Auskleidung des Mitteldarmlumens, welche schützend zwischen Lumen und Darmepithel liegt. Die Aufgaben der PM als mechanische Barriere sind neben der Kompartimentierung, Schutz vor Abrieb durch grobe Futterpartikel sowie vor schädlichen Substanzen und eindringenden Pathogenen (Barbehenn, 2001; Hegedus *et al.*, 2009; Terra, 2001). Unterschieden werden vom gesamten Mitteldarmepithel gebildete Typ I PMs oder von spezialisierten Zellen des vorderen Mitteldarms oder der Cardia des Mitteldarms gebildete Typ II PMs (Peters, 1992; Waterhouse, 1957). Die PM von Hymenopteren wurden bereits als Typ I (Hegedus *et al.*, 2009; Terra, 2001) beschrieben. Jedoch gab es auch gegensätzliche Berichte, welche die Sezernierung der PM nur in bestimmten Regionen des Mitteldarms schilderten (Jimenez & Gilliam, 1990). Über die PM in Honigbienen ist erst wenig bekannt und eine genaue Charakterisierung steht noch aus. Im Allgemeinen besteht die PM aus Chitin sowie aus integrierten Proteinen und Glykoproteinen (Lehane, 1997; Richards & Richards, 1977; Terra, 2001). Der Hauptbestandteil der PM ist Chitin, welches aus β -(1,4) verknüpften *N*-Acetyl-D-Glukosaminen (GlcNac) besteht. Das in der PM enthaltene Chitin ist in Fibrillen angeordnet, welche netzartig durch chitinbindende Proteine verbunden sind. Die im Netz entstandenen Zwischenräume sind mit Glykanen aufgefüllt, wodurch ein molekulares Sieb mit verschiedenster Porengröße entsteht (Hegedus *et al.*, 2009). Für die erfolgreiche Invasion eines Pathogens muss zunächst die PM überwunden werden. Dies geschieht meist mit vom Pathogen sezernierten Enzymen wie z.B. Chitinasen. Ein Angriff auf das in der PM enthaltene Chitin konnte bereits bei *Plasmodium*, dem Erreger der Malaria, gezeigt werden

(Langer & Vinetz, 2001). Die von der *Plasmodium* Ookinete produzierte Chitinase ermöglicht den Abbau der PM und die Invasion des Moskito-Mitteldarms. Auch für *P. larvae* konnte bereits gezeigt werden, dass die PM im Verlauf einer Infektion abgebaut wird und der Virulenzfaktor PICBP49 für diesen Abbau essentiell ist (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c).

Im weiteren Verlauf muss *P. larvae* das Mitteldarmepithel sowie die Basalmembran überwinden. Das Mitteldarmepithel der Insekten besteht allgemein aus einer einzelligen Epithelzellschicht. An der apikalen dem Lumen zugewandten Seite ist das Mitteldarmepithel mit Mikrovilli besetzt, um die Oberfläche für die Nährstoffaufnahme zu vergrößern und Verdauungsenzyme zu sekretieren (Whitten *et al.*, 2006). Die einzelnen Zellen des Mitteldarmepithels sind über undurchlässige und haftende Zellkontakte (*occluding / adhering junctions*) verbunden. Für eine erfolgreiche Invasion müssen Pathogene diese mechanische Barriere überwinden in dem sie die Epithelzellen abtöten, durchdringen oder sich zwischen den Zellen hindurchwinden. Anschließend muss die Basalmembran eine zellfreie flexible Schicht aus Laminin, Kollagen IV sowie Nidogen und Perlecan überwunden werden (Ashurst, 1982). Mit Hilfe genotypspezifischer Virulenzfaktoren greift *P. larvae* das Mitteldarmepithel an (siehe auch Abb. 5). *P. larvae* Genotyp ERIC I attackiert das Mitteldarmepithel aus der Entfernung mit den Toxinen Plx1/2 (Fünfhaus *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu heftet *P. larvae* ERIC II sich mit Hilfe des S-layer Proteins SplA direkt an das Darmepithel an (Poppinga *et al.*, 2012). Der genaue molekulare Mechanismus wie *P. larvae* das Mitteldarmepithel und die Basalmembran überwindet ist noch unklar. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass *P. larvae* über die parazelluläre Route in das Hämocoel eindringt (Yue *et al.*, 2008).

1.3.2 Lokale und systemische Immunantwort

Das Immunsystem der Honigbienen besteht, wie bei allen Invertebraten, ausschließlich aus der angeborenen Immunantwort. Die angeborene Immunantwort setzt sich aus der lokalen und der systemischen Immunantwort zusammen. Die systemische Immunantwort wird ausgelöst sobald einer der Immunsignalwege im Fettkörper, dem Speicher- und Syntheseorgan der Insekten, aktiviert wird und vom Fettkörper sekretierte Effektoren werden in die gesamte Körperhöhle abgegeben. Im Gegensatz dazu wird die lokale Immunantwort bei der Erkennung von Pathogenen durch die Zellen des Mitteldarmepithels umgesetzt. Nach Erkennung von Pathogenen kommt es zur Auslösung entsprechender Immunsignalwege und anschließend zur lokalen Ausschüttung von Effektoren. Pathogene im Mitteldarm können sowohl eine lokale als auch eine systemische Immunantwort auslösen (Broderick *et al.*, 2009; Lemaitre & Hoffmann, 2007). Das Mitteldarmepithel übernimmt also neben der

Nährstoffaufnahme und der Funktion als mechanische Barriere, auch wichtige immunologische Aufgaben.

Die angeborene Immunantwort von Insekten wird durch die Erkennung von eindringenden Pathogenen über *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) mittels spezifischer Rezeptoren ausgelöst. Je nach infizierendem Pathogen (Bakterien, Pilze, Viren, Parasiten) werden verschiedene Immunsignalwege aktiviert. Grampositive Bakterien und Pilze führen zur Aktivierung des Toll-Signalwegs, dagegen wird von gramnegativen Bakterien, *Bacilli* und *Paenibacilli* der Imd-Signalweg initiiert (Buchon *et al.*, 2014; Hillyer, 2016; Schleifer & Kandler, 1972; Shida *et al.*, 1997). Die Erkennung von eindringenden Pathogenen erfolgt über *peptidoglycan recognition proteins* (PGRP) und *Gram-negative binding proteins* (GNBP). Die Unterscheidung von grampositiven bzw. gramnegativen Bakterien erfolgt anhand spezifischer Peptidoglykane (PGN) in der Zellwand der eindringenden Bakterien (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Die PGNs in den Zellwänden der Bakterien sind quervernetzt über Peptide mit *meso*-Diaminopimelinsäurerest (*meso*-DAP-Typ) oder über Peptide mit Lysin-Diaminopimelinsäurerest (Lys-DAP-Typ) (Schleifer & Kandler, 1972). Die PGNs von gramnegativen Bakterien sowie Mitgliedern der grampositiven Genera *Bacilli* und *Paenibacilli* sind vom *meso*-DAP-Typ (Shida *et al.*, 1997), im Gegensatz dazu sind die PGNs von grampositiven Bakterien und Pilzen vom Lys-DAP-Typ. Die PGNs vom *meso*-DAP-Typ in den Zellwänden von gramnegativen Bakterien und einigen Mitgliedern der Genera *Bacilli* und *Paenibacilli* werden von den Erkennungsmolekülen PGRP-LC gebunden und der Imd-Signalweg ausgelöst (Abb. 2 A) (Neyen & Lemaitre, 2016). PGNs vom Lys-DAP-Typ dagegen werden von den vom Wirt sekretierten Erkennungsmolekülen PGRP-SA und GNBP1 gebunden. Es kommt zu einer proteolytischen Kaskade in der Spätzle aktiviert und der Toll-Signalweg ausgelöst wird (Abb. 2 B) (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Royet & Dziarski, 2007). Die Signalkaskaden des Toll- und des Imd-Signalwegs sind zu meist in *Drosophila* untersucht. Für die Honigbiene ist jedoch bekannt, dass alle notwendigen Komponenten der Signalwege im Genom vorhanden sind (Elsik *et al.*, 2014; Evans, 2006; Weinstock *et al.*, 2006).

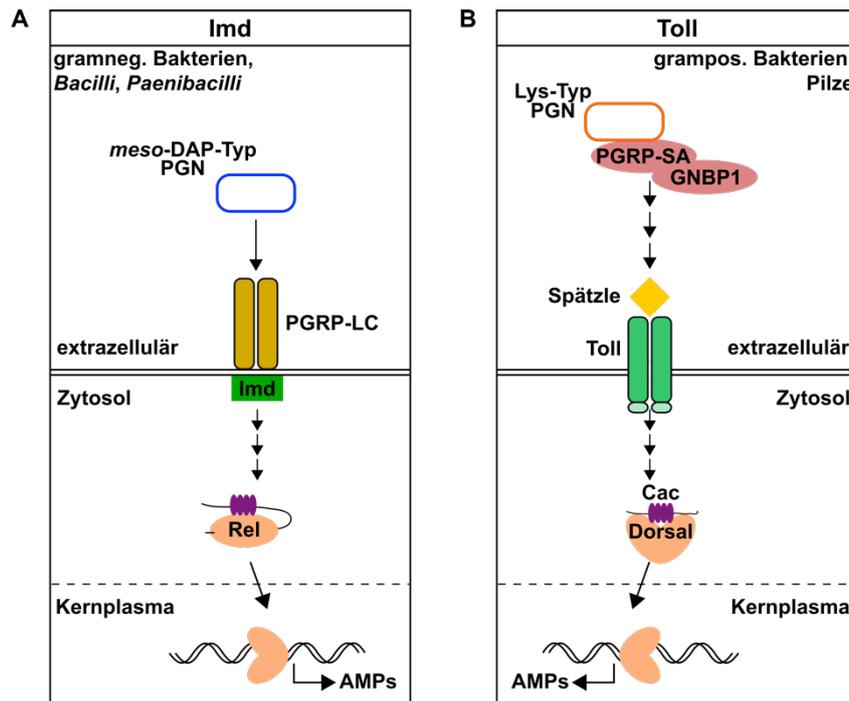


Abb. 2: Aktivierung des Imd- und Toll-Signalwegs über verschiedene Peptidoglykane (PGN). (A) PGN in der Zellwand von gramnegativen Bakterien, *Bacilli* und *Paenibacilli* sind vom *meso*-DAP-Typ. Die Bindung des *meso*-DAP-Typ PGNs erfolgt in Insekten über das membrangebundene Erkennungsmolekül PGRP-LC, welches den Imd-Signalweg aktiviert und schließlich zur Translokation des Transkriptionsfaktors Relish (Rel) in den Kern führt. Relish bindet an NFκB-Bindungsselemente und es kommt zur Transkription eines spezifischen Sets von Genen. Zu diesen Genen gehören antimikrobielle Peptide (AMPs), welche als Effektoren der Immunantwort bereits bekannt sind. (B) In der Zellwand grampositiver Bakterien und Pilze dagegen finden sich PGNs des Lys-Typ. Die Bindung von Lys-Typ PGN an die Erkennungsmoleküle PGRP-SA und GNBP1 initiiert eine proteolytische Kaskade, welche zur Aktivierung von Spätzle führt. Es kommt zur Phosphorylierung von Cactus (Cac), woraufhin es zur Translokation von Dorsal in den Kern kommt. Dorsal bindet an NFκB-Bindungsselemente und es kommt zur Transkription eines spezifischen Gensets. Zu diesen Genen gehören unter anderem AMPs. (modifiziert von Lemaitre & Hoffman, 2007)

Nachdem die PAMPs eindringender Pathogene erkannt wurden und entsprechende Signalkaskaden ausgelöst worden sind, kommt es zur Translokation von Mitgliedern der NFκB-Familie (Dif, Dorsal, Relish) in den Kern. Diese Transkriptionsfaktoren führen zur Transkription spezifischer Gene wie zum Beispiel der Antimikrobiellen Peptide (AMPs) (Abb. 2). In der Honigbiene sind verschiedene AMPs bekannt, welche der lokalen und systemischen Abwehr gegen eindringende Mikroben dienen: Abaecin, Apidaecin, Apisimin, Defensin 1, Defensin 2 und Hymenoptaecin. Die AMPs Royalisin (= Defensin 1), Jellein und Apisimin werden im Gelée Royale gefunden sowie Mellitin im Bienengift (Bilikova *et al.*, 2002; Casteels *et al.*, 1993; Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Casteels-Josson *et al.*, 1994; Evans & Armstrong, 2006; Evans *et al.*, 2006; Fujiwara *et al.*, 1990; Jefferson *et*

al., 2013; Klaudiny *et al.*, 2005). Bei mikrobieller Infektion erfolgt meist die gemeinsame Expression mehrerer AMPs. Eine Potenzierung der Wirkung einiger AMPs bei gemeinsamer Expression konnte bereits gezeigt werden (Rahnamaeian *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016). Es ist naheliegend, dass die gemeinsame Expression verschiedener AMPs notwendig ist, um eine optimale Abwehr gegen Pathogene zu gewährleisten (Rahnamaeian *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016).

Die lokale Immunantwort in den Zellen des Mitteldarmepithels wird hauptsächlich über den Imd-Signalweg reguliert. Eine Beteiligung des Toll-Signalwegs wie bei der systemischen Immunantwort konnte bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden. Um eine schnelle Expression der AMPs bei eindringenden Pathogenen zu gewährleisten und überschießende Reaktionen gegenüber der kommensalen Darmflora zu vermeiden, ist eine engmaschige Regulierung der lokalen Immunantwort notwendig. Der Imd-Signalweg zeigt auch beim Fehlen einer Infektion eine kontinuierliche Aktivierung. Diese wird vermutlich durch das Mikrobiom ausgelöst (Buchon *et al.*, 2014; Charroux & Royet, 2010). Der Transkriptionsfaktor Relish (NFκB Familie) wird der Aktivierung entsprechend kontinuierlich in den Kern transloziert. Dieses Signal reicht dennoch nicht aus, um eine kontinuierliche Transkription der AMPs zu verursachen, da der Transkriptionsfaktor Caudal dies blockiert. Darüber hinaus induziert Relish einen negativen Feedback-Mechanismus, welcher zur Transkription der PGN-Rezeptoren PGRP-LC und PGRP-SC führt. PGN wird so gespalten und die Aktivierung des Imd-Signalwegs eingedämmt (Buchon *et al.*, 2014; Charroux & Royet, 2010). Kommt es im Mitteldarm zur massiven Vermehrung von Pathogenen, wird der negative Feedback-Mechanismus überwunden. Durch große Mengen von PGNs kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des Imd-Signalwegs und der Auslösung der lokalen Immunantwort (Bosco-Drayon *et al.*, 2012; Charroux & Royet, 2010).

Neben der lokalen Immunantwort können Pathogene im Mitteldarm auch die systemische Immunantwort auslösen. Die molekularen Details sind noch unklar, aber es werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Möglich wäre, dass kleine PGN Fragmente ins Hämocoel vordringen und dort eine systemische Immunantwort auslösen (Gendrin *et al.*, 2009; Zaidman-Remy *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurden Stickoxide (NO) als mögliche Signalmoleküle diskutiert. Nach bakterieller Infektion werden NO in das Hämocoel sekretiert und aktivieren vermutlich Hämatocyten (Bogdan, 2001; Foley & O'Farrell, 2003; Nappi *et al.*, 2000).

Pathogene, die in das Hämocoel eingedrungen sind, aktivieren die systemische Immunantwort. Die Sekretion von AMPs im Fettkörper wird durch die Bindung von PGNs an entsprechende PGRPs ausgelöst. Darüber hinaus gehören in der Hämolymphe zirkulierende Hämatocyten zur systemischen Immunantwort. Diese binden eindringende Pathogene und machen diese durch Einkapselung oder Phagozytose unwirksam (Hillyer, 2016).

Bei einer Infektion von Honigbienenlarven mit *P. larvae* wird vermutlich durch die massive Vermehrung der vegetativen Bakterien im Darmlumen eine lokale Immunantwort im Mitteldarmepithel ausgelöst. Nach Bindung der PGNs vom meso-DAP-Typ an PGRP-LC kommt es zur lokalen Produktion von AMPs über den Imd-Signalweg. Eine systemische Immunantwort zu diesem Zeitpunkt kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, jedoch ist bereits bekannt, dass der Durchbruch des Mitteldarmepithels zeitgleich mit dem Tod der Larve stattfindet (Yue *et al.*, 2008). Das Auslösen einer systemischen Immunantwort durch in das Hämocoel eindringende vegetative *P. larvae* ist naheliegend, jedoch ist der Wirt, die Honigbienenlarve, zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben.

Die systemische Immunantwort in Honigbienenlarven nach Infektion mit *P. larvae* war bereits Gegenstand verschiedener Studien (Chan *et al.*, 2009; Cornman *et al.*, 2013; Evans, 2004; Evans *et al.*, 2006; Evans & Lopez, 2004; Evans & Pettis, 2005; Krongdang *et al.*, 2018). Keine dieser Studien untersuchte die Immunantwort in ERIC I-infizierten Larven bzw. ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zu einer nicht-infizierten Kontrollgruppe. Der infizierende *P. larvae* Genotyp wurde nicht weiter beachtet. Chan und Kollegen (2009) untersuchten mittels Massenspektroskopie den Einfluss einer Infektion mit *P. larvae* auf das Proteom der Hämolymphe fünf Tage alter Larven. Neben einer starken Hochregulierung einiger metabolischer Enzyme und Chaperone, waren Gelée Royal Proteine und Proteine der Energiespeicherung herunterreguliert. Immunfaktoren wie die Prophenoloxidase, Lysozym und AMPs wie Hymenoptaecin konnten in gesteigerten Mengen nach Infektion mit *P. larvae* nachgewiesen werden. Einige weitere Studien beschäftigten sich mit der Regulierung immunrelevanter Gene, jedoch waren die Ergebnisse widersprüchlich. Das AMP Abaecin konnte je nach Studie zu verschiedenen Zeitpunkten als signifikant hochreguliert beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war die Expression von Defensin 1 zunächst nur gesteigert und unterschied sich nicht signifikant (Evans, 2004; Evans & Lopez, 2004). In einer nachfolgenden Studie im Jahr 2006 wurden abweichende Ergebnisse von Larven 24 h nach *P. larvae*-Infektion veröffentlicht. Hier wurde die Hochregulierung immunrelevanter Gene der intermediären Signalebene (z.B. *dorsal-1*, *dredd*, *basket*) und der Ebene der Effektoren (z.B. *defensin 2*, *lysozym-2*, *ppoact*) beschrieben. Im Gegensatz zu zuvor veröffentlichten Ergebnissen wurde in dieser Studie für die AMPs *abaecin* und *defensin 1* keine veränderte Regulierung beschrieben (Evans, 2006). Auch auf Ebene des Transkriptoms erfolgte die Untersuchung der Immunantwort bei einer Infektion mit *P. larvae*. Cornman und Kollegen (2013) verglichen *P. larvae* infizierte Larven nach 72 h mit einer nicht-infizierten Kontrolle. Die Analyse der RNA-Seq-Daten identifizierte 75 Gene mit signifikant erhöhter Expression und 6 signifikant herunterregulierte Gene. In der Gruppe der signifikant hochregulierten Gene fanden sich unter anderem die AMPs *hymenoptaecin*, *apidaecin* und *defensin 1*. Desweiteren waren Gene kodierend für extrazelluläre Matrixproteine, Proteasen/Proteaseinhibitoren und Mitglieder der Familie der Osirisgene

hochreguliert (Cornman *et al.*, 2013). Die verschiedenen Studien berichteten immer wieder unterschiedliche Regulationen für einzelne Gene. Die hochvariable Expression einzelner Gene in individuellen Larven könnte eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse sein. Darüber hinaus wurde in keiner der beschriebenen Studien der infizierende *P. larvae* Genotyp beachtet. Es ist bereits bekannt, dass die verschiedenen *P. larvae* Genotypen mit Hilfe unterschiedlicher Virulenzfaktoren und sich daraus ergebenden Pathogenesestrategien zum Tod der Larve führen (Kap. 1.5.) (Djukic *et al.*, 2014). Die Beeinflussung der larvalen Immunantwort durch den infizierenden *P. larvae* Genotyp ist also sehr wahrscheinlich und könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der veröffentlichten Studien sein.

1.4. Der Erreger - *Paenibacillus larvae*

1.4.1 Klassifizierung von *P. larvae*

Der Erreger der AFB ist das grampositive, sporenbildende, stäbchenförmige petrichial begeißelte Bakterium *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*) (Genersch *et al.*, 2006). Seit der ersten Isolierung des Erregers und der Bezeichnung als '*Bacillus larvae*' vor über 100 Jahren (White, 1906) kam es mehrfach zur Umbenennung. Ein eng verwandtes Bakterium namens *B. pulvificiens*, der Erreger der Bruterkrankung "*powdery scale disease*", wurde im Jahr 1950 beschrieben (Katznelson, 1950). Basierend auf einer rRNA-Gensequenzanalyse und phänotypischer Charakterisierung erfolgte die Einordnung beider Bakterien in die Familie der *Paenibacilli* als *P. larvae* und *P. pulvificiens* (Ash *et al.*, 1993). Eine polyphasische Neubewertung führte zur Einordnung beider Spezies als Unterarten (Subspezies) von *P. larvae*, welche als *P. larvae* subsp. *larvae* und *P. larvae* subsp. *pulvificiens* bezeichnet wurden (Heyndrickx *et al.*, 1996). Im Jahr 2006 erfolgte durch Genersch und Kollegen eine schlüssige Reklassifizierung beider Subspezies zusammen als eine Spezies *P. larvae* ohne weitere Unterteilung. Dies erfolgte durch klassische Methoden wie die Morphologieanalyse der Bakterienkolonien, elektronenmikroskopische Darstellung der Sporenmorphologie sowie molekularer Analysen wie der Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE), SDS-PAGE, und *repetitive-element PCR* (rep-PCR) (Genersch & Otten, 2003; Versalovic *et al.*, 1994) mit *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) Primern (Genersch *et al.*, 2006).

1.4.2 *P. larvae* Genotypen

Die eindeutige Subtypisierung von *P. larvae* erfolgte basierend auf Unterschieden des Phänotyps, in der Virulenz und mittels rep-PCR mit ERIC Primern. Die Einteilung in die vier

Genotypen, ERIC I-IV, erwies sich auch in weiteren Analysen wie dem *multilocus sequence typing* (MLST) (Morrissey *et al.*, 2015), der Matrix-assoziierten Laser-Desorption-Ionisation Flugzeitanalyse (MALDI TOF) (Schäfer *et al.*, 2014), der Sequenzierung des Genoms (Djukic *et al.*, 2014) sowie der *multiple locus variable number of tandem repeat analysis* (MLVA) (Descamps *et al.*, 2016) als konstant. Aus gegenwärtigen Ausbrüchen werden regelmäßig die *P. larvae* Genotypen ERIC I und ERIC II isoliert. Im Gegensatz dazu existieren die *P. larvae* Genotypen ERIC III und ERIC IV nur als historische Isolate in Kultursammlungen und wurden in den vergangenen Jahrzehnten nicht nachgewiesen (Alippi *et al.*, 2004; Antunez *et al.*, 2007; Descamps *et al.*, 2016; Genersch & Otten, 2003; Peters *et al.*, 2006; Schäfer *et al.*, 2014). Neben Unterschieden im Phänotyp, wie z.B. der Morphologie (Abb. 3) oder auch im Metabolismus, unterscheiden sich die Genotypen vor allem in der Virulenz (Ashiralieva & Genersch, 2006; Fünfhaus *et al.*, 2013; Genersch *et al.*, 2005; Genersch *et al.*, 2006; Neuendorf *et al.*, 2004; Poppinga *et al.*, 2012).

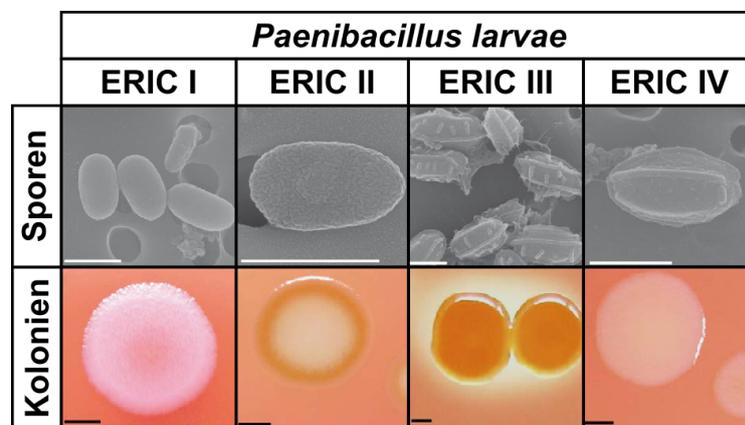


Abb. 3: Sporen- und Koloniemorphologie der *P. larvae* Genotypen ERIC I-IV. Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Sporen (obere Reihe) sind die Unterschiede in der Gestalt der Sporen zwischen den vier Genotypen deutlich zu erkennen. Balken = 1 µm. Auch die Morphologie der Kolonien auf CSA (untere Reihe) unterscheiden sich deutlich. Balken = 1 mm. (modifiziert von Genersch *et al.*, 2006, Design inspiriert von Poppinga, 2012)

In Larveninfektionsversuchen mit den *P. larvae* Genotypen ERIC II-IV konnte beobachtet werden, dass alle infizierten Larven innerhalb von nur sieben Tagen versterben. Dagegen sterben Larven bei einer Infektion mit *P. larvae* ERIC I über einen Zeitraum von zwölf Tagen. Auf Ebene der Larve sind die Genotypen ERIC II-IV hochvirulent, im Gegensatz dazu ist der Genotyp ERIC I niedrig virulent für die individuelle Larve (Abb. 4) (Genersch, 2010; Genersch *et al.*, 2005).

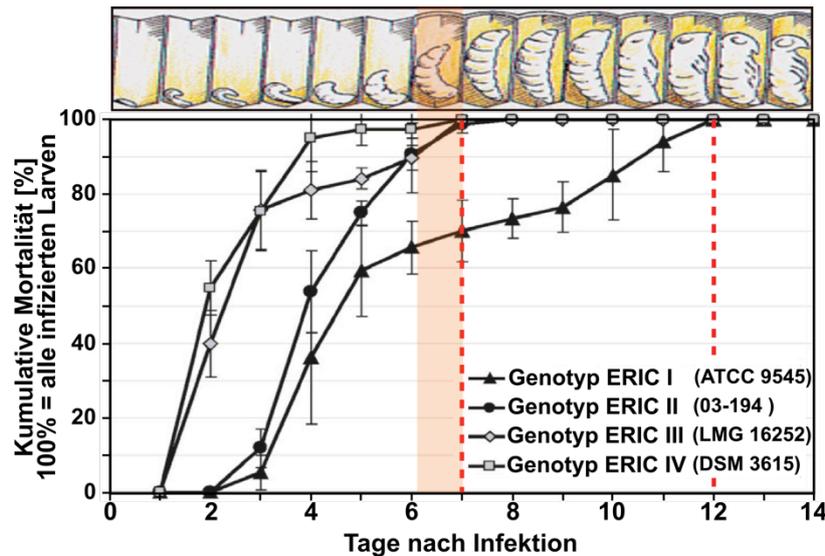


Abb. 4: Virulenz der verschiedenen *P. larvae* Genotypen. Die *P. larvae* Genotypen ERIC II-IV töten alle infizierten Larven in nur sieben Tagen nach Infektion. *P. larvae* Genotyp ERIC I dagegen benötigt bis zu zwölf Tage bis der Tod infizierter Larven eintritt. Infektionen mit dem *P. larvae* Genotyp ERIC I sind daher niedrig virulent für die einzelne Larve. Eine Infektion mit den *P. larvae* Genotypen ERIC II-IV ist im Gegensatz dazu hochvirulent. Durch die unterschiedlichen Krankheitsverläufe wird das Hygieneverhalten der Ammenbienen beeinflusst und dies führt zu einer entgegengesetzten Virulenz auf Volksebene. Bei einer Infektion mit den *P. larvae* Genotypen ERIC II-IV sterben alle infizierten Larven bis zum Zeitpunkt der Zellverdeckelung (orange markiert) an Tag 6/7 (rotgestrichelte Linie). Da die Brutzellen bis zu diesem Zeitpunkt offen sind, können kranke oder verstorbene Larven von Ammenbienen entdeckt und ausgeräumt werden. Bei einer Infektion mit *P. larvae* Genotyp ERIC I sterben auch nach Zellverdeckelung Larven bis einschließlich Tag zwölf nach Infektion (rotgestrichelte Linie). Nach Zellverdeckelung verstorbene Larven werden von den Ammenbienen nicht entdeckt und ausgeräumt. Es erfolgt die Zersetzung des Kadavers zu fadenziehender Masse, welche aus Millionen von Sporen besteht. Diese wird von Ammenbienen schließlich ausgeräumt und es kommt zur Weiterverbreitung der Sporen. (modifiziert von Genersch *et al.*, 2006; Larvenentwicklung entnommen von <http://www.imkerverein-reutlingen.de>; Design modifiziert von Hertlein, 2016)

Die Unterschiede im Krankheitsverlauf bei Infektion mit den verschiedenen Genotypen beeinflussen das Hygieneverhalten der Ammenbienen im Bienenvolk und führen zu einer entgegengesetzten Virulenz auf Volksebene. Im Rahmen des Hygieneverhaltens werden kranke oder tote Larven von Ammenbienen entfernt und so Brutpathogene beseitigt, damit gehört dieses Verhalten zur sozialen Immunantwort im Bienenvolk (Evans & Spivak, 2010; Spivak & Reuter, 2001; Spivak, 1998; Spivak & Gilliam, 1998; Wilson-Rich *et al.*, 2009). Bei einer Infektion mit den *P. larvae* Genotypen II-IV sterben fast alle infizierten Larven vor der Verdeckelung der Wabenzellen (Tag sieben). Die moribunden oder toten Larven werden mit einer über 90%igen Wahrscheinlichkeit von Ammenbienen entdeckt und ausgeräumt. Eine Weiterverbreitung der Erkrankung innerhalb und zwischen den Bienenvölkern wird dadurch

eingedämmt. Larven infiziert mit den *P. larvae* Genotypen ERIC II-IV werden frühzeitig durch Ammenbienen entdeckt und im Rahmen des Hygieneverhalten werden erkrankte Larven ausgeräumt. Im Gegensatz dazu werden mit Genotyp ERIC I infizierte Larven nur zu 60% ausgeräumt, da 40% der erkrankten Larven erst nach der Verdeckelung sterben und nicht von Ammenbienen detektiert werden. Infizierte Larven die nach der Verdeckelung sterben, werden zu einer charakteristischen fadenziehenden Masse zersetzt und trocknen zum sogenannten Faulbrutschorf ein, welcher aus Millionen von Sporen besteht. Der langsamere Krankheitsverlauf bei einer Infektion mit *P. larvae* Genotyp ERIC I führt durch die größere Anzahl nicht ausgeräumter zersetzter Larven und der damit entstehenden hohen Sporenbelastung, zu einer massiven Verbreitung der Erkrankung in und zwischen den Völkern (Genersch *et al.*, 2005; Rauch *et al.*, 2009). Damit ist eine Infektion mit *P. larvae* ERIC I auf Volksebene wesentlich schädlicher und führt eher zum Zusammenbruch eines Bienenvolks. Durch die partielle Aufdeckung der verschiedenen Pathogenesestrategien mit Hilfe genotypspezifischer Virulenzfaktoren in den *P. larvae* Genotypen ERIC I und ERIC II konnten bereits einige Unterschiede in den Krankheitsverläufen aufgeklärt werden. Die weitere Charakterisierung genotypspezifischer Virulenzfaktoren und Aufklärung der Pathogenesestrategien wird das Verständnis der Pathogenese einer Infektion von Bienenlarven mit *P. larvae* weiter vorantreiben.

1.5. Bestätigte Virulenzfaktoren

1.5.1 *P. larvae* chitinbindendes Protein 49 (PICBP49)

Um das Hämocoel erfolgreich zu besiedeln, muss *P. larvae* zunächst die peritrophe Membran (PM) abbauen. Diese semipermeable, chitinreiche, nicht-zelluläre Schicht kleidet das Darmlumen von Invertebraten aus und schützt das Darmepithel (Barbehenn, 2001; Hegedus *et al.*, 2009; Terra, 2001) (siehe auch Kap.1.3.1). Der Abbau der PM wurde bereits als Schlüsselschritt während der Pathogenese einer Infektion mit *P. larvae* identifiziert (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013). Der entscheidende Virulenzfaktor für diesen Abbau ist das chitinbindende und -abbauende Protein 49 (PICBP49), welches sowohl von *P. larvae* Genotyp ERIC I als auch Genotyp ERIC II exprimiert wird (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c). Zunächst wird aus der PM abgebautes Chitin als zusätzliche Nährstoffquelle (Kohlenstoff) genutzt. Nachdem die PM vollständig abgebaut wurde, erfolgt der Angriff des Larvendarmepithels mit Hilfe genotypspezifischer Virulenzfaktoren (siehe Abb. 5, Kap. 1.5.2, 1.5.3) und es erfolgt der Übertritt des Bakteriums in die invasive Lebensphase (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c; Yue *et al.*, 2008). Die

Schlüsselrolle von *PICBP49* konnte in Infektionsversuchen mit den *P. larvae* Wildtypen der Genotypen ERIC I und ERIC II sowie den zugehörigen Knockout-Mutanten, welche *PICBP49* nicht exprimierten, belegt werden. Bei fehlender Expression von *PICBP49* war der Abbau der PM deutlich reduziert und die Virulenz von *P. larvae* beinahe vollständig aufgehoben (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c). Mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Assays konnte außerdem gezeigt werden, dass *PICBP49* in der Lage ist lösliches und kristallines Chitin abzubauen (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c). Die Beschreibung und Charakterisierung des Virulenzfaktors *PICBP49* konnte endlich klären, wie *P. larvae* die chitinreiche PM überwindet, obwohl im Genom keine vollständigen und vermeintlich funktionellen Chitinasen entdeckt werden konnten (Djukic *et al.*, 2014). Der genaue Mechanismus wie *PICBP49* Chitin in der PM abbaut ist noch unklar und soll im Rahmen dieser Arbeit weiter aufgeklärt werden. Die noch unbekanntenen Zwischenschritte dieses Abbaus könnten mögliche Interventionspunkte im Verlauf der Pathogenese einer Infektion mit *P. larvae* darstellen. Für andere Pathogene wurde der Abbau der PM und die Verhinderung des Abbaus bereits als Interventionspunkt diskutiert (Hegedus *et al.*, 2009; Langer & Vinetz, 2001; Terra, 2001). Strukturelle Gemeinsamkeiten von *PICBP49* mit Mitgliedern der AA10 Familie (*Auxiliary Activity Family 10*, früher CBM33, (Lombard *et al.*, 2014)) lytischer Polysaccharid Monooxygenasen (LPMOs) konnten bereits gezeigt werden (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c). Mitglieder der AA10 Familie bauen Chitinsubstrate über einen kupferabhängigen oxidativen Mechanismus ab. Die strukturellen Gemeinsamkeiten legen nahe, dass *PICBP49* in der PM enthaltenes Chitin ebenfalls über einen metallionenabhängigen oxidativen Mechanismus abbaut. Als erste Mitglieder der AA10 Familie mit nachgewiesener katalytischer Aktivität wurden CBP21 (*Serratia marcescens*), EfCBM33A (*Enterococcus faecalis*) und GbpA (*Listeria monocytogenes*) beschrieben (Loose *et al.*, 2014; Paspaliari *et al.*, 2015; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2012; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Das vierte Mitglied dieser Familie und bestätigter Virulenzfaktor ist *PICBP49*.

1.5.2 *P. larvae* binäre Toxine

Bakterielle Toxine sind multifunktionelle Proteine, die Bakterien als Virulenzfaktoren dienen, indem sie essentielle Funktionen und Stoffwechselwege eukaryotischer Zellen unterdrücken und stören (Barth *et al.*, 2004; Carpusca *et al.*, 2006). Vergleichende Analysen der *P. larvae* Genotypen zeigten, dass die Genotypen ERIC I und ERIC II unterschiedliche Virulenzfaktoren nutzen und diese genotypspezifisch sind (Fünfhaus *et al.*, 2009; Fünfhaus *et al.*, 2013; Poppinga *et al.*, 2012). Für *P. larvae* Genotyp ERIC I konnten zwei binäre Toxine (Plx1, Plx2) identifiziert werden, welche nicht im Genotyp ERIC II exprimiert werden

(Fünfhaus *et al.*, 2009; Fünfhaus *et al.*, 2013). Diese als AB-Toxine klassifizierten Substanzen ermöglichen dem Genotyp ERIC I nach Abbau der PM den Angriff des Larvendarmepithels aus der Distanz, welcher schließlich zum Durchbruch des Epithels führt (Abb. 5). Sie sind wie alle AB-Toxine aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und einer für die Bindung an die Zielzelle und die Translokation in die Zielzelle verantwortlichen B-Untereinheit aufgebaut. Binäre Toxine sind bereits in zahlreichen anderen grampositiven, sporenbildenden *Bacilli* wie beispielsweise *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* oder auch *Bacillus anthracis* beschrieben (Barth *et al.*, 2004). Plx1 und Plx2 wurden bereits *in vivo* charakterisiert und als Virulenzfaktoren bestätigt (Fünfhaus *et al.*, 2013). Die A-Untereinheit von Plx2 wurde kürzlich weiter biochemisch und funktionell charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass es sich um eine mono-ADP-Ribosyltransferase (mART) mit RhoA als Zielmolekül handelt (Ebeling *et al.*, 2017). Ein weiteres Toxin von *P. larvae* ist C3larvin, welches ebenfalls zur Familie der mART gehört. Die A-Untereinheit dieses Toxins wurde bereits biochemisch und strukturell charakterisiert, jedoch blieb die Rolle als Virulenzfaktor ungeklärt (Krska *et al.*, 2015).

1.5.3 *P. larvae* S-layer Protein (SplA)

Der erste für *P. larvae* ERIC II identifizierte und funktionell charakterisierte Virulenzfaktor ist das S-layer-Protein SplA (Poppinga *et al.*, 2012). S-Layer (Glyko)-Proteine sind wasserunlösliche Peptide, die sich in einer zweidimensionalen, parakristallinen Schicht mit einer organisierten Struktur im Nanometerbereich auf der Bakterienoberfläche selbst organisieren können. Die dadurch entstehende Oberflächenschicht (surface layer, S-layer) findet sich an der Oberfläche vieler Eubakterien und Archaeen. Sie dient einerseits der Formgebung der Bakterienzellen und stellt einen Schutzmantel und eine Barriere gegen Umwelteinflüsse dar. Auf der anderen Seite vermittelt diese Oberflächenschicht Adhäsion- und Zellerkennungsmechanismen (Beveridge *et al.*, 1997; Sleytr *et al.*, 2007a; Sleytr *et al.*, 2007b). Vergleichende Proteomanalysen und Genomanalysen konnten zeigen, dass SplA für den Genotyp ERIC II spezifisch ist und nach Abbau der PM die direkte Anheftung der Bakterien an die Larvendarmzellen vermittelt (Abb. 5)(Fünfhaus & Genersch, 2012; Poppinga *et al.*, 2012). Diese Adhäsion könnte in der Pathogenese der AFB eine zentrale Rolle spielen, wie dies für S-layer-exprimierende Bakterien bei Vertebraten bereits gezeigt werden konnte (Konstantinov *et al.*, 2008; Sekot *et al.*, 2011). Die entscheidende Rolle des S-layers für die Virulenz von *P. larvae* ERIC II konnte in Larveninfektionsversuchen im Vergleich zu einer S-layer-defizienten Knockout-Mutante gezeigt werden. Wird das S-layer Protein nicht exprimiert, kommt es zum signifikanten Abfall der Larvenmortalität. Darüber hinaus bewirken S-layer-exprimierende Bakterien bei Vertebraten eine Modulation der

Immunantwort (Fagan & Fairweather, 2014). Dies könnte auch bei Infektionen von Honigbienenlarven mit *P. larvae* Genotyp ERIC II eine mögliche weitere Funktion sein. Falls die Hypothese einer immunmodulierenden Wirkung durch das S-layer Protein zutreffend ist, müsste die Immunantwort in ERIC II-infizierten Larven geringer ausfallen. Das S-layer Protein könnte *P. larvae* ERIC II vor dem Immunsystem der Larve maskieren und das Bakterium bliebe unentdeckt. Vertreter des *P. larvae* Genotyps ERIC I weisen eine Punktmutation und somit eine Leserasterverschiebung im *sp/A*-Gen auf, wodurch das Gen nicht exprimiert wird (Poppinga *et al.*, 2012). Sofern das S-layer Protein eine immunmodulierende Funktion hat, müsste die Immunantwort in ERIC I-infizierten Larven stärker ausfallen, da hier keine Maskierung durch ein S-layer Protein stattfindet.

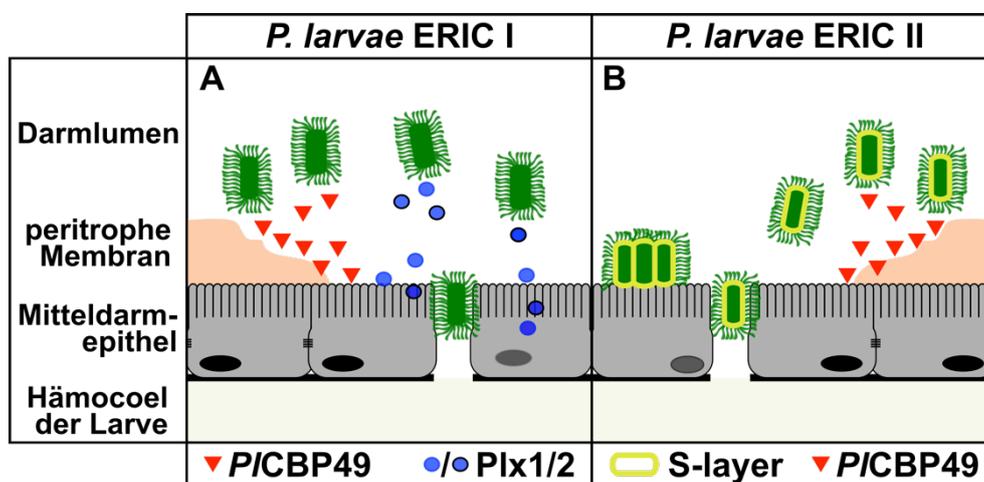


Abb. 5: Pathogenesestrategien von *P. larvae* Genotyp ERIC I und ERIC II. *P. larvae* Genotyp ERIC I und ERIC II sekretieren PICBP49 (rote Dreiecke), um die peritrophe Membran (orange Schicht), die chitinreiche Schutzschicht des Darmepithels, abzubauen und weitere Nährstoffquellen zu erschließen. Dieser Schritt markiert den Übergang in die invasive Lebensphase von *P. larvae*. (A) Nach Abbau der peritropen Membran kann *P. larvae* ERIC I mit seinen Toxinen Plx1/2 (blaue Kreise) das Darmepithel aus der Entfernung angreifen, zelluläre Funktionen stören und über die parazelluläre Route in das Hämocoel eindringen. (B) Nach dem Abbau der peritropen Membran heftet sich *P. larvae* Genotyp ERIC II mit Hilfe des S-layer Proteins (gelb) direkt an das Darmepithel an. Auch *P. larvae* Genotyp ERIC II dringt über die parazelluläre Route in das Hämocoel der Larve ein, jedoch sind die molekularen Details, die auf die Anheftung folgen noch unklar. (modifiziert von (Ebeling *et al.*, 2016; Poppinga & Genersch, 2015))

1.6. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die weitere Aufklärung molekularer Details zur Pathogen-Wirt-Beziehung im Verlauf der Pathogenese einer Infektion von Bienenlarven mit *Paenibacillus larvae*.

Der Verlauf einer Infektion mit *P. larvae* lässt sich in drei verschiedene Phasen einteilen. In der ersten Phase keimen über das Futter aufgenommene *P. larvae* Sporen im Mitteldarm aus und die vegetativen Bakterien vermehren sich massiv im Darm der Larve. *P. larvae* lebt zunächst kommensal im Larvendarm. Ab einem bestimmten Punkt erfolgt der Übergang in die zweite invasive Lebensphase. *P. larvae* bricht durch das Darmepithel und dringt in das Hämocoel der Larve. Zeitgleich mit dem Durchbruch der Darmwand kommt es zum Tod der Larve. In der dritten und letzten Lebensphase von *P. larvae* werden die Larvenüberreste zu einer fadenziehenden Masse zersetzt, welche aus Millionen von Sporen besteht (Yue *et al.*, 2008).

Im ersten Teil dieser Arbeit lag der Fokus auf dem Pathogen *P. larvae*. Der Virulenzfaktor PICBP49 baut die peritrophe Membran, eine chitinreiche Schutzschicht des Darmepithels ab (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c) und ermöglicht *P. larvae* den Angriff des Darmepithels mittels Toxinen (ERIC I) oder S-layer Protein (ERIC II). Der Abbau der peritrophen Membran markiert den Übergang von nicht-invasiver zu invasiver Lebensphase von *P. larvae* (Yue *et al.*, 2008). Der genaue Mechanismus des Chitinabbaus ist nicht bekannt. Durch die biochemische Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Erkenntnisse zum Chitinabbau durch PICBP49 gewonnen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit lag der Fokus auf dem Wirt der Larve der Honigbiene. Aufgrund der unterschiedlichen Pathogenesestrategien der *P. larvae* Genotypen ERIC I und ERIC II lag die Vermutung nahe, dass es Unterschiede in der individuellen Immunantwort der Larve geben könnte und diese Einfluss auf den Verlauf der Larvenmortalität haben. In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Immunreaktion der Larve bei einer Infektion mit den *P. larvae* Genotypen ERIC I oder ERIC II mittels RNA-Seq und qPCR.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Chemikalien & Reagenzien

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien

| Name | Hersteller |
|--|--|
| Aceton (C ₃ H ₆ O) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Acetonitril (C ₂ H ₃ N) | Merck, Darmstadt, DE |
| Acrylamid (Acrylamid/Bis-Acrylamid Lösung , 37.5:1, 30%) | Bio-Rad, München, DE |
| Agar (Agar-Agar, bakteriologisch) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Agarose - für die Elektrophorese | Biozym, Oldendorf, DE |
| Albumin Fraktion V (BSA) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Fluka, Steinheim, DE |
| Ampicillin Natriumsalz (C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Antischaummittel | Sigma, St. Louis, MO, US |
| Ascorbat (C ₆ H ₇ O ₆ Na) | VWR Prolabo Chemicals, Leuven, BE |
| β-Chitin (Schulp, Tintenfisch) | France Chitin, Orange, FR |
| BHI (Hirn-Herz-Bouillon) | Merck, Darmstadt, DE |
| BIS-TRIS (C ₈ H ₁₉ NO ₅) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Bromphenolblau Natriumsalz (C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ SNa) | Merck, Darmstadt, DE |
| Calcofluor white stain | Fluka, Steinheim, DE |
| Chelex 100 resin | Bio-Rad, München, DE |
| Chitin Resin | New England Biolabs, Ipswich, MA, US |
| Chitin from shrimp shells (α-Chitin) | Sigma, St. Louis, MO, US |
| Chloroform (CHCl ₃) | Merck, Darmstadt, DE |
| Chloramphenicol (C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Columbia-Blutagarbasis | Oxoid, Wesel, DE |
| DE(+)-Glucose Monohydrat (C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| 2,5-Dihydroxybenzoesäure (C ₇ H ₆ O ₄) (DHB) | Sigma, St. Louis, MO, US |
| di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| di-Natriumhydrogenphosphate (Na ₂ HPO ₄) | Merck, Darmstadt, DE |
| DNA-Leiter, 100bp PLUS | Peqlab, Erlangen, DE |
| DNA-Leiter, 1kb | Peqlab, Erlangen, DE |
| 6x DNA Loading Dye, Orange | Thermo Fisher Scientific, Mannheim, DE |
| dNTP Mix, peqGOLD (10mM) | Peqlab, Erlangen, DE |
| Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |

| Name | Hersteller |
|--|---|
| Erythromycin (C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Essigsäure (CH ₃ COOH) 100% | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Essigsäureanhydrid (C ₄ H ₆ O ₃) | Fluka Steinheim, DE |
| Essigsäureethylester (C ₄ H ₈ O ₂) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Ethidiumbromidlösung (1%) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Ethanol 99,8% (C ₂ H ₆ O) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Fructose (C ₆ H ₁₂ O ₆) >99,5% | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Gelée Royale | Werner Seip, Butzbach-Ebersgöns, DE |
| Gelée Royale | Naturprodukte Lembcke GbR, Faulenrost, DE |
| Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Harnstoff (CH ₄ N ₂ O) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Hefeextrakt | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Isopropanol (2-Propanol) (C ₃ H ₈ O) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Isopropyl-β-DE-thiogalactopyranosid (IPTG) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂) | Merck, Darmstadt, DE |
| Kaliumchlorid (KCl) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Kanamycinsulfat (C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ · H ₂ SO ₄) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Kupfersulfat (CuSO ₄) | Sigma, St. Louis, MO, US |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ · 6H ₂ O) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Magnesiumsulfat Hydrat (MgSO ₄ · H ₂ O) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Methylenblau (C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Methanol (CH ₃ OH) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS) (2-Mercaptoethanol) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Milchpulver | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Müller-Hinton-Bouillon | Oxoid, Wesel, DE |
| Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Natriumazid (NaN ₃) | Merck, Darmstadt, DE |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Natriumpyruvat (C ₃ H ₃ NaO ₃) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| PageBlue Proteinfärbelösung (Coomassie Blau) | Thermo Fisher Scientific, Mannheim, DE |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, 10x) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |

| Name | Hersteller |
|--|---|
| Penta-His Alexa Fluor 488 Conjugate | Qiagen, Hilden, DE |
| Pepton/Trypton | Sigma, St. Louis, MO, US |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (C ₇ H ₇ FO ₂ S) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Precision Plus Protein, Unstained Protein Standard | Bio-Rad, München, DE |
| Primer | Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, DE |
| Protease Inhibitor Cocktail (cComplete) | Sigma, St. Louis, MO, US |
| Roti Histofix 4% | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Roti [®] -Mark 10-150 PLUS Proteinmarker | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁) | Sigma, St. Louis, MO, US |
| Salzsäure rauchend 37% (HCl) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Schafblut, defibriniert | Oxoid, Wesel, DE |
| SDS ultra pure (Natriumdodecylsulfat) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| SDS Blue Loading Buffer (3x) | New England Biolabs, Ipswich, MA, US |
| SigmaFAST, Proteaseinhibitor Tabletten | Sigma, St. Louis, MO, US |
| Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 95-97% | Merck, Darmstadt, DE |
| Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Triton X-100 Detergent (Polyethyleneglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutylphenyl)]-ether) | Bio-Rad, München, DE |
| TRizol [®] Reagent | Thermo Fisher Scientific, Mannheim, DE |
| Wasser, Nuklease-frei, autoklaviert, DEPC-behandelt | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |

2.1.2 Geräte

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Geräte

| Name | Hersteller |
|--|--|
| Acquity UPLC BEH Amide, 150 mm | Waters Corporation, Milford, MA, US |
| Agilent 1290 Infinity UHPLC system | Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US |
| Autoklav Systec 2540EL, VX-150 | Systec GmbH, Osnabrück, DE |
| Binocular SZ_PT | Olympus, Tokio, JP |
| BioPhotometer | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Biowizard Golden Line, Kojair (Laminar flow cabinet) | Kojair, Nieuwe Niedorp, BE |
| ChemiDoc XRS Molecular Imager | Bio-Rad, München, DE |

| Name | Hersteller |
|--|--|
| Certomat M0 II, B. Braun, Certomat HK (Inkubationshaube) | B. Braun, Sartorius Group, Göttingen, DE |
| Concentrator 5301 | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Criterion Stain Free Imaging System | Bio-Rad, München, DE |
| Densitometer GS-800 | Bio-Rad, München, DE |
| Digitalkamera C 5060 | Olympus, Tokio, JP |
| DPU-414 Thermal Printer Seiko Instruments | SII, Chiba, JP |
| Elektroporator 2510 | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Fluoreszenzmikroskop Eclipse Ti-E, Inverses Mikroskop, Filterblock: DAPI EX- 340-380 | Nikon Instruments, Düsseldorf, DE |
| Gelkammer Class II | PeqLab, Erlagen, DE |
| HeraSafe KS, Class II Safety Cabinet | Thermo Scientific, St. Leon-Roth, DE |
| HiLoad 16/600 Superdex 200pg | GE Healthcare, Uppsala, SE |
| Inkubator | Memmert, Schwabach, DE |
| Inverses Mikroskop (VWR IT 400) | VWR, Darmstadt, DE |
| Magnetrührer (MR3001) | Heidolph, Schwabach, DE |
| MALDI-TOF/TOF (Ultraflex) | Bruker Daltonics, Bremen, DE |
| Mikrozentrifuge | Neolab, Heidelberg, DE |
| Mini-PROTEAN Tetra Cell Elektrophorese System | Bio-Rad, München, DE |
| MTP 384 target plate ground steel TF | Bruker Daltonics, Bremen, DE |
| Multimage Light Cabinet | Biozym, Oldendorf, DE |
| Orbital Schüttler DRS-12 | neoLab, Heidelberg, DE |
| Peltier Thermal Cycler, PTC-200 & Chromo4 Detector | Bio-Rad, München, DE |
| pH-Meter MP220 | Mettler Toledo, Gießen, DE |
| Pinzetten | A. Dumont & Fils, Montignez, CH |
| Pipetten Biomaster 4843, Reference 2, Research plus | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Präzisionswaage 573 | Kern, Balingen, DE |
| QIAcube | Qiagen, Hilden, DE |
| Sonifier 250 | neoLab, Heidelberg, DE |
| Spectrafuge Mini | neoLab, Heidelberg, DE |
| Standzentrifuge, Beckman Coulter Avanti JXN-26 | Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE |
| Superloop, 150 ml, complete | GE Healthcare, Uppsala SE |
| Synergy HT | Biotek, Bad Friedrichshall, DE |
| Take3 Mikro-Volume Plate | Biotek, Bad Friedrichshall, DE |
| Thermocycler S1000, C1000 Touch | Bio-Rad, München, DE |
| ThermoMixer C, comfort | Eppendorf, Hamburg, DE |

| Name | Hersteller |
|--|---|
| Thermoshake Inkubatorschüttler | Gerhardt, Bonn, DE |
| Thermostat plus | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Umlarvlöffel (Umsetzen der Honigbienenlarven) | Graze Bienenzuchtgeräte, Weinstadt, DE |
| Ultrasound desintegrator | VWR International GmbH, Dresden, DE |
| Ultraviolet sterilizing PCR workstation | Peqlab, Erlangen, DE |
| Ultrazentrifuge, Beckman Coulter Optima Max-XP | Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE |
| Vacusafer | Integra Biosciences, Fernwald, DE |
| Vibrating platform shaker | Heidolph, Schwabach, DE |
| Vibra Cell Ultrasonic Processor | Sonics & Materials, Newtown, CT, US |
| Vortexer (Reax top) | Heidolph, Schwabach, DE |
| Vortex- Genie 2 | Scientific Industries, Bohemia, NY, US |
| Wasserbad SUB6 | Grant, Cambridgeshire, GB |
| Wage (Discovery), Semi-Mikro, Analyse | OHAUS, Nänikon, CH |
| XK 16/20 Column | GE Healthcare, Uppsala SE |
| Zentrifuge 5415D, 5415R, 5427R, 5810R | Eppendorf, Hamburg, DE |
| ÄKTA Chromatographie System | GE Healthcare, Uppsala SE |

2.1.3 Verbrauchsmittel

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmittel

| Name | Hersteller |
|---|--|
| Flaschenaufsatzfilter (Nalgene, 150 ml, 500 ml) | VWR International GmbH, Dresden, DE |
| Einweg-Pipetten steril | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Elektroporationsküvetten, 1mm | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Eppendorf Tubes (1.5 ml, 2 ml), PCR clean | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Falkonröhrchen (15 ml, 50 ml) | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Impfösen | neoLab, Heidelberg, DE |
| KimTechScience Precision Wipes, white | VWR, Darmstadt, DE |
| Loch-Platten (6, 24, 96) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE |
| Objektträger HistoBond Adhäsion | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| Objektträger SuperFrost®/Plus | Carl-Roth, Karlsruhe, DE |
| PCR Reaktionsgefäße | Biozym, Oldendorf, DE |
| PD MidiTrap G-25 (GE Healthcare) | GE Healthcare, Freiburg, DE |

| Name | Hersteller |
|--|--|
| Petrischalen | Greiner, Nürtingen, DE |
| Pipettenspitzen mit Filter, SafeGuard (100 µl) | Peqlab, Erlangen, DE |
| Pipettenspitzen mit Filter, SafeSeal Tips (10 µl, 1000µl) | Biozym, Oldendorf, DE |
| Pipettenspitzen ohne Filter | Eppendorf, Hamburg, DE |
| qPCR Reaktionsgefäße (8-Tube Streifen, weiß), Deckel (8-Cap Streifen, optical ultraclear) | Bio-Rad, München, DE |
| Spritzen, steril | Braun, Melsungen, DE |
| Spritzenfilter (0,22 µm) | Braun, Melsungen, DE |
| Uvetten | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Zentrifugeneinheiten (Amicon Ultra) | Merck, Darmstadt, DE |
| Zentrifugeneinheiten (PALL Nanosep) | PALL Life Sciences, Ann Arbor, MI, US |

2.1.4 Enzyme und Kits

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

| Name | Hersteller |
|--|---|
| DNase I | Qiagen, Hilden, DE |
| FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase | Thermo Fisher Scientific, Mannheim, DE |
| Fast Digest <i>NcoI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>SphI</i> , <i>XbaI</i> , <i>XhoI</i> | Thermo Fisher Scientific, Mannheim, DE |
| <i>HindIII</i> , <i>NdeI</i> | New England Biolabs, Ipswich, MA, US |
| HotStar HiFidelity DNA Polymerase | Qiagen, Hilden, DE |
| HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase | Qiagen, Hilden, DE |
| Lysozym | Merck, Darmstadt, DE |
| Phusion High-Fidelity DNA Polymerase | New England Biolabs, Ipswich, MA, US |
| RNase-Free DNase | Qiagen, Hilden, DE |
| T4 DNA Ligase | Thermo Fisher Scientific, Mannheim, DE |
| <i>Taq</i> 2X Master Mix | New England Biolabs, Ipswich, MA, US |

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Kits

| Name | Hersteller |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| DNeasy Blood & Tissue Kit | Qiagen, Hilden, DE |
| In-Fusion Cloning Kit | Takara Bio, Mountain View, CA, US |
| MasterPure DNA purification Kit | Epicentre, Madison, WI, US |
| NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit | Macherey-Nagel, Düren, DE |
| NucleoSpin Plasmid Kit | Macherey-Nagel, Düren, DE |
| Protein Assay (Bradford) | Bio-Rad, München, DE |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen, Hilden, DE |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden, DE |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden, DE |
| QIAshredder | Qiagen, Hilden, DE |
| RNeasy MinElute Cleanup Kit | Qiagen, Hilden, DE |

2.1.5 Anzuchtmedien

Alle Medien wurden vor Gebrauch für 15 min bei 120°C autoklaviert. Thermolabile Bestandteile wurden sterilfiltriert und nach Abkühlung den autoklavierten Medien zugegeben. Alle Medien wurden mit MilliQ (Merck) Reinstwasser oder mit nuklease-freiem, autoklaviertem, DEPC-behandeltem Wasser (Carl-Roth) hergestellt.

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Medien (% beziehen sich auf (w/v))

| Medium | Zusammensetzung |
|-------------------------------|--|
| Brain-heart-infusion (BHI) | 3.7% (w/v) brain-heart-infusion |
| Columbia-Schafblut-Agar (CSA) | 3,9% Columbia Agar Base; autoklavieren und auf ~50°C abkühlen lassen, 7% defibriniertes Schafsblut hinzugeben |
| LB (Luria Bertani)-Medium | 0,5 % Pepton; 1,6 % Hefeextrakt; 1 % NaCl, (1,5% Agar) |
| M9 Minimal-Medium | 1 ml (10x M9 Salze); 9ml dest. H ₂ O; 0,99 mM MgSO ₄ ; 0,045 mM CaCl ₂ |
| 10 x M9 Salze | 0,46 M Na ₂ HPO ₄ ; 1,1 M KH ₂ PO ₄ ; 0,43 M NaCl; 0,93 M NH ₄ Cl |
| MYPGP-Medium | 1,6% Hefeextrakt; 1% Müller Hinton Medium; 0,3% K ₂ HPO ₄ ; 0,1% Natriumpyruvat; (2% Agar) |
| TB (Terrific Broth) -Medium | 1,2% Trypton; 2,4% Hefeextrakt; 0,4% Glycerin |

2.1.6 Puffer und Gele

Tab. 7: In dieser Arbeit verwendete Puffer

| Puffer | Zusammensetzung |
|-------------------------------|--|
| HPLC Puffer | 0,24% Tris-HCl pH 8,0 |
| TB Puffer (Harbinger System) | 1,3% Trypton, 2,7% Hefeextrakt, 0,4% Glycerin (100%), 0,011% Antischaummittel |
| 10 x TBE | 10,8% Tris, 5,5% Borate, 0,6% EDTA, pH 8.3 |
| 10 x TGX | 0,3% Tris, 192 mM Glycin; 0,1% SDS; pH 8,3 |
| SDS PAGE 5 x Probenpuffer | 26,4% Urea, 0,08% β -Mercaptoethanol, 1,9% Tris (pH 6.8), 5,8% SDS, 2,7% Nonidet P-40, 4,2% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau |
| SDS PAGE Fixierungspuffer | 20% Ethanol (v/v), 20% (v/v) Essigsäure, 50% dest. H ₂ O |
| SDS PAGE 10 x Laufpuffer | 25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS |
| Äkta Elutionspuffer (PICBP49) | 0,15% Essigsäure |
| Äkta Elutionspuffer (SplA) | 0,8% Tris-HCl, 0,1% MgCl ₂ , 36% Harnstoff (pH 7,2) |
| Äkta Laufpuffer (PICBP49) | 0,7% NaCl, 0,1% CaCl ₂ , 0,4% Tris-HCl (pH 7,5) |

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Gele

| Gel | Zusammensetzung |
|---------------------------------------|---|
| 1% Agarosegel | 1% Agarose in TBE Puffer |
| Mini PROTEAN TGX Precast Gel, Bio-Rad | Tris, eXtended Glycin, any kD, 4-20% Gel |
| SDS PAGE Sammelgel (4%) | 0,6 ml 30% acrylamide, 1.25 ml 0.5 M Tris pH 6.8, 3.1 ml H ₂ O dest., 25 μ l TEMED, 25 μ l 10% APS |
| SDS PAGE Trenngel (10%) | 4 ml 30% Acrylamid; 3 ml 1,5 M Tris pH 8,0; 4,9 ml H ₂ O dest.; 50 μ l TEMED, 50 μ l 10% APS |

2.1.7 Oligonukleotide

Tab. 9: *P. larvae* Primer

| Name | Sequenz (5'-3') | Amplikon- größe [bp] | Annealing Temp. [°C] | Elongations- zeit [min] | Verwendung | Referenz |
|--------------------------|---|-------------------------|-------------------------|----------------------------|---|-------------------------------|
| EI.1_EcoRI.F | GAATTCATGATCTCTAATTTGGGTATTAAAA | ca. 1330 | 52 | 1,5 | Screening <i>cbp49</i> , Amplifizierung | Garcia- Gonzalez (2012) |
| EI.1_SmaI.R | CCCGGGTTATTCAATCACCGTCCATA | | | | | |
| cbp_RTF | GGCATGGGGCCCTGAGCTTG | - | - | - | <i>cbp49</i> mittig | Garcia- Gonzalez (2012) |
| cbp_RTR | AAGCGGCCCCGGTATCTGCT | | | | | |
| pRSETB_Seq_F | GATCTCGATCCCGCGAAATT | - | - | - | Sequenzierung pRSETB+ <i>cbp49</i> | diese Arbeit |
| pRSETB_Seq_R | TGTTAGCAGCCGGATCAAGC | - | - | - | | |
| <i>P</i> /CBP49_pRSETB_F | CGCAACAGGCGAATGCCACGGATACGTT GAAGCAC | ca. 1250 | 52 | 1,5 | Screening <i>cbp49</i> , Sequenzierung | diese Arbeit |
| <i>P</i> /CBP49_pRSETB_R | CAGCCGGATCAAGCTTTTATTCAATCA CCGTCCATAAAGAT | | | | | |
| CBP49_pRSETBint_F | TATAACATCCCTACTGATCGC | - | - | - | Screening <i>cbp49</i> , Sequenzierung | diese Arbeit |
| CBP49_pRSETBint_R | CTCTGTATTTGGTTTTAATTCGGTA | - | - | - | | |
| CBP49pRSETintFII | CTCTCGTATAGATTTGATGTGGA | - | - | - | | |
| CBP49pRSETintFIII | CCAAGTGCTGCCTATAAAAAA | - | - | - | | |
| SPCBP49_pRSETBRn | AAGGAGATATACATAATGATCTCTAATTTG GGTATTA AAAAAGA | - | - | - | | |

| Name | Sequenz (5'-3') | Amplikon- größe [bp] | Annealing Temp. [°C] | Elongations- zeit [min] | Verwendung | Referenz |
|------------------------------|---|-------------------------|-------------------------|----------------------------|---|-------------------------------------|
| IBS_ <i>spA</i> _101 | AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAATAGCCCTG | ca. 350 | 55 | 0.5 | <i>spA</i> KO Konstruktion | Poppinga <i>et al.</i> , 2012 |
| EBS1d_ <i>spA</i> _101 | GAAGTGCGCCCAGATAGGGTG | | | | | |
| EBS2_ <i>spA</i> _101 | CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAA GTCCTGGAACTAACTTACCTTTCTTTGT TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTGCTATCC GATAGAGGAAAGTGTCT | | | | | |
| sl-XbaI-F | GCGTCTAGAATGAGGAATATGGGCTCCGC | 3039 | 58 | 1 | Konstruktion pAD43-25- <i>spA</i> - His ₆ - <i>ery</i> | Poppinga (2012) |
| sl-Linker-R1 | CCCCCCCCCAAGGTTTTTAACAAGATTACC | 3039 | 58 | 1 | | |
| sl-His ₆ -SphI-R2 | GCGGCATGCTTAATGATGATGATGATGATGC CCCCCCCCAAG | 3048 | 58 | 1 | | |
| SplA-F | ATATGGGCTCCGCTATTTCC | wt 1530 KO 2445 | 58 | 5 | Screening <i>spA</i> , Nachweis KO | Poppinga <i>et al.</i> , 2012 |
| SplA-R | AATCCGCAGAACCTTTAGCA | | | | | |
| SplA-F1 | ATGAGGAATATGGGCTCCG | - | - | - | <i>spA</i> Sequenzierung | Poppinga <i>et al.</i> , 2012 |
| SplA-R1 | CTGTTTTTTCGTTAAGCATGGTT | - | - | - | | |
| SplA-F2 | ACTATCAGCAAATCGTTATTGAAGG | - | - | - | | |
| SplA-R2 | TCAACTGTTGTTGCACCGG | - | - | - | | |
| SplA-F3 | TATTAACCTGGAAAAGTAGATGTCC | - | - | - | | |
| SplA-R3 | TTAAAGTTTTTAACAAGATTACCAGC | - | - | - | | |
| SplA-F4 | GGTTAGCCAATATTGAAGCTCTG | - | - | - | | |
| SplA-R4 | AATCCGCAGAACCTTTAGCA | - | - | - | | |
| SplA-F5 | AAGATTTAATTGAAACTCTTAATGCAG | - | - | - | | |
| SplA-R5 | TCGGTACTGCAGAAAACCTTTG | - | - | - | | |

| Name | Sequenz (5'-3') | Amplikon- größe [bp] | Annealing Temp. [°C] | Elongations- zeit [min] | Verwendung | Referenz |
|-------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|---|-------------------------------|
| Ery-Smal-F2 | GGTCCCGGGCGCCTACGAGGAATTTGTATC | 1536 | 58 | 3 | Nachweis der Erythromycin- kassette | Poppinga (2012) |
| Ery-Smal-R2 | GGTCCCGGGCGCCTACGAGGAATTTGTATC | | | | | |
| purH_F | GACGGACACCCGTCATAATCATGG | 386 | 57,5 | 1 | RT-PCR Referenzgen <i>P. larvae</i> | Garcia- Gonzalez (2012) |
| purH_R | CGGGCTGAGTGAAAGTGACCTTAAA | | | | | |

Tab. 10: *A. mellifera* Primer

| Name | Sequenz (5'-3') | Typ | Zielgen | Effizienz | Produktgröße [bp] | Herkunft |
|------------------------------|--|----------|---|-----------|-------------------|-----------------------------------|
| Actin_F Actin_R | AGGAATGGAAGCTTGCGGTA AATTTTCATGGTGGATGGTGC | - | Actin related protein 1 (Gene ID 406122) | - | 181 | Geschenk von Dr. Möckel |
| Aba_F Aba_R | GGTAGTGATATTTATCTTCGC TTGAGGCCATTTAATTTTCGG | Target | Abaecin (Gene ID 406144) | 0,89 | 148 | Aronstein <i>et al.</i> , 2010 |
| ATu_E_F ATu_E_R | GCACGTGAAGATCTAGCAGCTC GCACCTTCTCCTTCACCTTCAG | Referenz | Alpha-Tubulin (Gene ID 550827) | 1,06 | 80 | Cornman <i>et al.</i> , 2013 |
| Api_E_F Api_E_R | TAGTCGCGGTATTTGGGAAT TTTCACGTGCTTCATATTCTTCA | Target | Apidaecin (Gene ID 406115) | 0,80 | 926 | Cornman <i>et al.</i> , 2013 |
| Apis_F Apis_R | TGAGCAAAATCGTTGCTGTC AACGACATCCACGTTTCGATT | Target | Apisimin (Gene ID 406093) | 0,84 | 116 | Evans <i>et al.</i> , 2006 |
| Def_F Def_R | GTTGAGGATGAATTCGAGCC TTAACCGAAACGTTTGTCCC | Target | Defensin1 (Gene ID 406143) | 1,0 | 225 | Aronstein <i>et al.</i> , 2010 |
| Dorsal1_H4_F Dorsal1_H4_R | TATCAGAGCCGACGGAAAGG ACTCCATTGGCGATGTACGA | Target | Dorsal1 (Gene ID 406086) | 0,76 | 162 | diese Arbeit |
| Glu_E_F Glu_E_R | CACGGATACATCCTGCAGTCATC GAGAATGACGAGATACAGAACTGTCAC | Referenz | Glucuronyltransferase (Gene ID 409203) | 1,05 | 117 | Cornman <i>et al.</i> , 2013 |
| Hym_E_F Hym_E_R | CTCTTCTGTGCCGTTGCATA GCGTCTCCTGTCATTCCATT | Target | Hymenoptaecin (Gene ID 406142) | 1,03 | 200 | Cornman <i>et al.</i> , 2013 |
| MGS_E_F MGS_E_R | TTGCTCTGTAAGGTTGTTTTGC TGTCTGGTTAACTACAAATCCTTCTG | Referenz | Microsomal glutathione- S-transferase (Gene ID 410837) | 0,87 | 122 | Cornman <i>et al.</i> , 2013 |
| MyD88_H2_F MyD88_H2_R | GCTCAAGCATTGGGCATTGG TGAGGTGGTAGTCGACATCT | Target | Myeloid differentiation primary response factor 88 (Gene ID 413194) | 0,94 | 77 | diese Arbeit |
| RPS5_F RPS5_R | AATTATTTGGTCGCTGGAATTG TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA | Referenz | Ribosomal Protein S5 (Gene ID 409728) | 0,96 | 115 | Evans <i>et al.</i> , 2006 |
| Ubi_E_F Ubi_E_R | ACAGCTGGAAGATGGTCGTACAC CGAAGTACAAGGTGAAGAGTCGATTC | Referenz | Ubiquitin (Gene ID 409657) | 0,92 | 72 | Cornman <i>et al.</i> , 2013 |

2.1.8 Software

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Software

| Name | Hersteller |
|---|---|
| Adobe Creative suite CS6 | Adobe Systems Incorporated, San José, CA, US |
| Bruker FlexAnalysis | Bruker Daltonics, Bremen, DE |
| ChemStation rev.B.04.02 chromatography Software | Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US |
| Geneious R9 | Biomatters Ltd., Auckland, NZ |
| GraphPadPrism 6 | GraphPad Software, San Diego, CA, US |
| Image Lab (Version 5.2.1) | Bio-Rad, München, DE |
| Microsoft Office 2010, 2011 | Microsoft, München, DE |
| NIS-Elements | Nikon GmbH, Düsseldorf, DE |
| Opticon Monitor 3 | Bio-Rad, München, DE |
| Qbase+ (Version 3.1) | Biogazelle, Gent, BE |
| QuantityOne (Version 4.6.9) | Bio-Rad, München, DE |
| R (Version 3.3.1.) | (R Development Core Team, 2016), The R Foundation, mit den Packages: |
| · Bioconductor (Version 3.3) | (Gentleman <i>et al.</i> , 2004), https://www.bioconductor.org |
| · DESeq2 (Version 1.12.4) | (Love <i>et al.</i> , 2014) |
| · Kallisto (Version 0.43.1) | (Bray <i>et al.</i> , 2016) |
| · Tximport (Version 1.0.3.) | (Soneson <i>et al.</i> , 2015) |
| Snappgene Viewer (Version 3.3.3) | GSL Biotech LLC, Chicago, IL, US |
| Vector NTI (Version 11.0) | Thermo Fisher Scientific, Mannheim, DE |

2.1.9 Bakterienstämme

Tab. 12: In dieser Arbeit verwendete *P. larvae* Stämme

| Stamm | Herkunft | ERIC |
|--|---|------|
| ATCC9545** | ATCC | I |
| ATCC9545+pAD43-25+ <i>spIA</i> -His ₆ | diese Studie | I |
| DSM25430** (04-309) | Honig | II |
| DSM25430Δ <i>spIA</i> | Geschenk von Dr. Poppinga, Poppinga <i>et al.</i> , 2012 | II |

** charakterisiert in (Fünfhaus & Genersch, 2012; Genersch *et al.*, 2005; Genersch *et al.*, 2006; Neuendorf *et al.*, 2004).

Tab. 13: Selektive Anzucht verwendeter manipulierter Stämme

| Wirt | Vektor | Herkunft | Selektivmedium |
|---|---------------------------|------------------------------|--|
| <i>E. coli</i> Stellar Competent Cells | pRSETB+ <i>cbp49</i> | diese Arbeit | LB Amp 100 µg/ml |
| <i>E. coli</i> BL21 | pRSETB+ <i>cbp49</i> | diese Arbeit | LB Amp 100 µg/ml |
| <i>P. larvae</i> | pAD43-25- <i>ery</i> | Geschenk von Dr. Poppinga | CSA Ery 0,3 µg/ml MYPGP Ery 0,3 µg/ml |
| | pAD43-25- <i>spIA-ery</i> | diese Arbeit | CSA Ery 0,3 µg/ml MYPGP Ery 0,3 µg/ml |

Tab. 14: Weitere verwendete Bakterienstämme

| Stamm | Gramfärbung | Herkunft |
|-----------------------------|-------------|-----------------------|
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | + | Laborsammlung |
| <i>B. megaterium</i> 32 | + | DSMZ |
| <i>B. megaterium</i> 786 | + | DSMZ |
| <i>B. subtilis</i> | + | Laborsammlung |
| <i>B. thuringiensis</i> | + | Laborsammlung |
| <i>E. coli</i> DH5α | - | Invitrogen, Darmstadt |
| <i>E. faecalis</i> | + | Laborsammlung |
| <i>P. alvei</i> | + | Laborsammlung |
| <i>P. larvae</i> | + | Laborsammlung |

2.2. Verwendete *P. larvae* Stämme

In dieser Arbeit wurden verschiedene *P. larvae* Stämme (Tab. 12) der am häufigsten vorkommenden Genotypen verwendet. Als Vertreter des Genotyps ERIC I wurden in dieser Arbeit ATCC9545 aus der American Type Culture Collection eingesetzt (Genersch & Otten, 2003). Als Repräsentant des Genotyps ERIC II wurde in dieser Arbeit der Stamm DSM25430 (04-309) eingesetzt (Genersch *et al.*, 2005). Diese Stämme wurden bereits eingehend charakterisiert (Ashiralieva & Genersch, 2006; Fünfhaus *et al.*, 2009; Genersch *et al.*, 2005; Rauch *et al.*, 2009) und erfolgreich genetisch manipuliert (Fünfhaus *et al.*, 2013; Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014a; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014b; Hertlein *et al.*, 2014; Hertlein *et al.*, 2016; Poppinga, 2012; Poppinga & Genersch, 2012; Poppinga *et al.*, 2012).

2.2.1 Anzucht von *P. larvae*

Die Anzucht der verwendeten Wildtyp-Stämme erfolgte bei 37°C über zwei bis drei Tage auf Columbia Sheep Blood Agar (CSA) oder in MYPGP-Medium, wie bereits beschrieben (Genersch & Otten, 2003; Neuendorf *et al.*, 2004). Manipulierte *P. larvae* Stämme mit dem pAD43-25+*spIA* Vektor wurden auf CSA bzw. in MYPGP-Medium mit zusätzlich 3 µg/ml Erythromycin unter gleichen Bedingungen kultiviert.

2.2.2 Herstellung von Sporensuspension und Konzentrationsbestimmung

Für die Herstellung von Sporensuspensionen erfolgte die Kultivierung der verwendeten *P. larvae* Stämme (Tab. 12) wie bereits beschrieben (Genersch & Otten, 2003; Neuendorf *et al.*, 2004). Frisch gewachsene Kolonien der *P. larvae* Stämme wurden von jeweils zwei CSA Platten mit sterilen Ösen entnommen. Die Bakterien wurden in 300 µl BHI-Medium resuspendiert und mit einer sterilen Glaspipette in Schrägblutagarröhrchen überführt. Die luftdichtverschlossenen Schrägblutagarröhrchen wurden mindestens zehn Tagen bei 37°C inkubiert. Die Sporensuspensionen wurden in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C gelagert. Die Bestimmung der Sporenkonzentration (in cfu/ml; „colony forming units“) erfolgte durch wiederholte Kultivierung serieller Verdünnungsreihen der Sporensuspensionen auf CSA. Nach einem Hitzeschock von 90°C für 5 min wurden von jeder Verdünnung 5 x 200 µl auf CSA ausplattiert und für sechs Tage bei 37°C inkubiert. Die optimale Sporenverdünnung (5-50 cfu/Platte) wurde erneut auf CSA ausplattiert und für weitere sechs Tage bei 37°C inkubiert. Es wurden drei Wiederholungen der finalen

Verdünnung mit je fünf CSA Platten durchgeführt und daraus der Mittelwert bestimmt. Die Herstellung und Konzentrationsbestimmung der Sporensuspension erfolgte unter sterilen Bedingungen.

2.2.3 Herstellung elektrokompetenter *P. larvae* Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter *P. larvae* Zellen (Murray & Aronstein, 2008) wurden Vorkulturen mit je 2 ml MYPGP-Medium mit einer Kolonie der verwendeten *P. larvae* Wildtypen (ATCC9545 bzw. DSM25430) angeimpft. Für die Hauptkultur wurden 10-15 µl der Vorkultur in 200 ml vorgewärmtes MYPGP-Medium überführt und bei 37°C und 180 rpm (Certomat M0 II, B. Braun) über Nacht inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 (exponentielle Wachstumsphase) erfolgte die Abkühlung der Kultur für 15-20 min auf Eis und anschließend die Zellernte mittels Zentrifugation (20 min, 3200 g, 4°C). Das erhaltene Pellet wurde dreimal mit eiskalter, steriler 0,625 M Saccharose-Lösung gewaschen. Das finale Pellet wurde in 0,4 ml Medium aufgenommen, resuspendiert und in 40 µl Aliquots abgefüllt und bei -70°C gelagert.

2.3. Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

2.3.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Für die Isolation und Vermehrung von Plasmiden wurden *Escherichia coli* DH5α Zellen (Invitrogen) verwendet. In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Wildtyp-Stämme wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Agar bei 37°C über 16 h kultiviert. Nach erfolgter Transformation mit genetisch veränderten Plasmiden erfolgte die selektive Anzucht auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum (Tab. 13). Für eine effiziente Expression und die weitere Aufreinigung von Proteinen wurden manipulierte Plasmide in *E. coli* BL21 (Invitrogen, Sigma-Aldrich) transformiert und anschließend auf LB-Agar mit dem jeweiligen Antibiotikum (Tab. 13) ausplattiert.

2.3.2 Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen

Hitzekompetente *E. coli* Zellen wurden nach den Beschreibungen von (Mandel & Higa, 1970) hergestellt. Für die Hauptkultur wurden 100 ml LB-Medium mit einem Milliliter einer *E. coli* Vorkultur (5 ml LB-Medium, 200 rpm, 37°C, ü.N.) (Certomat M0 II, B. Braun) angeimpft und anschließend 2 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Im 30 min Rhythmus wurde die OD₆₀₀

bestimmt und die Kultur bei einer optischen Dichte zwischen 0,3 und 0,5 (exponentielle Wachstumsphase) geerntet. Die Abkühlung der Bakterienkultur erfolgte für ca. 10 min auf Eis. Für die Zellernte wurde die Bakterienkultur anschließend 10 min bei 2057 g und 4°C zentrifugiert. Die geernteten Zellen wurden mit 50 ml einer eiskalten 0,1 M MgCl₂-Lösung gewaschen und erneut für 10 min bei 2057 g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 10 ml einer 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (2057 g, 4°C). Das erhaltene Zellmaterial wurde in 2,06 ml einer 0,1 M CaCl₂-Lösung und 0,44 ml 85% Glycerol gelöst und Aliquots von 100 µl abgefüllt. Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden bis zur Verwendung in einer Transformationsreaktion bei -80°C gelagert.

2.3.3 Transformation chemokompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation manipulierter Plasmide in chemokompetente *E. coli* Zellen wurde ein 100 µl Aliquot chemokompetenter *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Je nach Ansatz wurde 1 µl (50-100ng Plasmid DNA) oder 8-10 µl Ligationsansatz zu den chemokompetenten *E. coli* Zellen pipettiert. Während der zehnmütigen Inkubation auf Eis erfolgte alle 2 min vorsichtiges Durchmischen des Ansatzes. Um die Aufnahme der DNA in die Bakterienzelle zu induzieren, wurde das DNA-Bakterienzellen-Gemisch einem Hitzeschock bei 42°C für 90 s unterzogen. Direkt im Anschluss wurde der Ansatz erneut kurz auf Eis gekühlt, 750 µl erwärmtes LB-Medium (37°C) zur Regeneration der Zellen hinzugegeben, und bei 37°C und 350 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) für 1 h inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz auf den entsprechenden LB-Selektionsagarplatten ausplattiert, 16 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und rekombinante *E. coli* Klone isoliert und auf Aufnahme des Plasmids mittels PCR untersucht.

2.4. Klonierung - Herstellung von Mutanten

2.4.1 Knockout Konstruktion

Bei vielen Mitglieder der Gattungen *Bacilli* oder *Paenibacilli* war die genetische Manipulation lange nicht erfolgreich. Im Jahr 2012 gelang Poppinga und Kollegen (Poppinga *et al.*, 2012) die Integration eines Typ II Introns in das *spIA*-Gen von *P. larvae* DSM25430 (ERIC II). Das verwendete Targetron Protokoll (Sigma) erwies sich als praxistauglich. Für die Herstellung von Knockout-Mutanten von *P. larvae* wurde der modifizierte Vektor pTT_wsfa243 verwendet (Zarschler *et al.*, 2009). Dieser Vektor wurde bereits erfolgreich für den Knockout

des S-layers Proteins SplA, der Toxine Plx1 und Plx2, des chitinbindenden Proteins PICBP49 und der Proteine verschiedener Sekundärmetabolite verwendet (Fünfhaus *et al.*, 2013; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014a; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014b; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c; Hertlein *et al.*, 2014; Hertlein *et al.*, 2016; Poppinga *et al.*, 2012). Für die Konstruktion eines Knockouts mussten spezifische Insertionsstellen für das Typ II Intron im offenen Leseraster (ORF) des Zielgens, hier *spA*, gefunden werden. Zur Identifizierung von Insertionsstellen wurde ein Computeralgorithmus (<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/targetron>) verwendet, welcher potentielle Insertionsstellen erkennt und passende Primer für die Modifikation des LI.LtrB Targetrons designt (Tab. 9). Spezifische Targetron Vektoren wurden nach Angaben des Herstellers generiert und anschließend für die Vermehrung der Plasmide in *E. coli* DH5 α transformiert. Nach der Präparation und Überprüfung der Plasmide mittels Restriktionsenzymverdau und Gelelektrophorese, erfolgte die Elektroporation in elektrokompetente *P. larvae* Zellen (siehe Kap. 2.2.3). Der in dieser Arbeit verwendete SplA-Knockout wurde von Dr. Poppinga generiert (Poppinga *et al.*, 2012) und ist Bestandteil der laboreigenen Stammsammlung.

2.4.2 Klonierung von *cbp49* in den *E. coli* Expressionsvektor pRSETB

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung des von *P. larvae* Genotyp ERIC I und ERIC II exprimierten Virulenzfaktors PICB49, wurde das *cbp49*-Gen in den *E. coli* Expressionsvektor pRSETB (Invitrogen) kloniert. Der pRSETB Vektor wurde wie bereits beschrieben (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005b) mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Hind*III (New England Biolabs) verdaut, der komplette Restriktionsansatz gelelektrophoretisch getrennt und das Rückgrat (2900 bp) des Plasmids durch Gelextraktion mit dem NucleoSpin Gel & PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. In einer weiteren PCR wurde *cbp49* mit den Primer EI.1_EcoRI.F und EI.1_SmaI.R aus ultrareiner DNA (MasterPure DNA Purification Kit, Epicentre) des *P. larvae* Stamms DSM25430 (ERIC II) mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) amplifiziert (Tab. 9). Das Insert wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Hind*III verdaut und anschließend gereinigt. Nach Anleitung des In-Fusion Cloning Kits (Takara Bio USA) wurden Rückgrat und *cbp49* mit Hilfe des 5x In-Fusion HD Enzyme Premix im molaren Verhältnis 1:3 ligiert. Anschließend wurde pRSETB+*cbp49* nach Herstellerangaben in *E. coli* Stellar Competent Cells transformiert. Eine zusätzliche auf dem Vektor enthaltene Ampicillinkassette (Abb. 6) ermöglichte die selektive Anzucht der *E. coli* Klone auf LB-Agar Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin. Von über Nacht gewachsenen Klonen wurde eine Öse mit Koloniematerial in 25 μ l *Taq* 2X Master Mix (New England Biolabs) gegeben, die Primer EI.1_EcoRI.F und EI.1_SmaI.R (Tab. 9) hinzugefügt und die Aufnahme des Inserts überprüft.

Von positiv getesteten Klonen wurden Vorkulturen in 5 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin mit einer Öse Koloniematerial angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Isolierung des Plasmids erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) aus 5 ml Vorkultur. Mit Hilfe eines Qubit Fluorometers (Invitrogen) wurde die Konzentration des aufgereinigten Plasmids bestimmt. Positiv getestete Plasmide wurden zur Überprüfung der *cbp49*-Sequenz an die Firma MWG Eurofins übergeben und mit verschiedenen Primern (Tab. 9) überprüft. Die Sequenzanalyse erfolgte mit der Software ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007). Für eine effiziente Expression und die weitere Aufreinigung von *PICBP49* aus *E. coli* wurden Plasmide mit korrekter Sequenz in *E. coli* BL 21 (Invitrogen) transformiert, anschließend auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und mittels PCR auf die Aufnahme des Plasmids untersucht. Heterolog in *E. coli* exprimiertes *PICBP49* wird im weiteren Verlauf als *recPICBP49* (recombinant *PICBP49*) bezeichnet.

Die Klonierung von *cbp49* in den Expressionsvektor pRSETB erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Loose und Herrn Prof. Vaaje-Kolstad an der Norwegian University of Life Sciences (NMBU, Ås Norwegen).

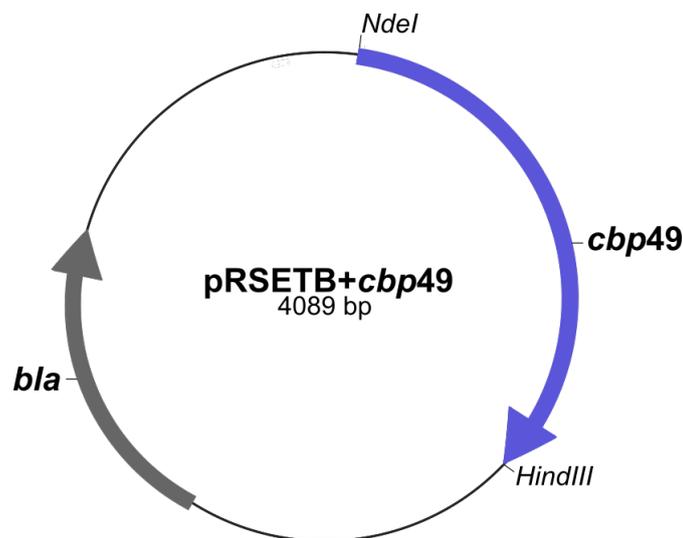


Abb. 6: Schematische Vektorkarte von pRSETB+cbp49. Das in den Vektor klonierte *cbp49* ist in violett dargestellt, die zur selektiven Anzucht der *E. coli* Klone genutzte Ampicillinresistenzkassette in grau. Vektor und *cbp49*-Insert wurden mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *HindIII* verdaut, aufgereinigt und anschließend nach Anleitung des In-Fusion Cloning Kits (Takara Bio USA) ligiert. Das entstandene Plasmid hat eine Größe von 4089 bp und dient der heterologen Expression von *recPICBP49* in *E. coli* BL 21. *bla* = Ampicillinresistenzkassette.

2.4.3 Klonierung von *spIA* in den Expressionsvektor pAD43-25-ery

Zur weiteren Analyse der Funktion des S-layer Proteins SplA, wurde dieses in den *E. coli-Bacillus*-Shuttle Vektor pAD43-25 (Bacillus Genetic Stock Centre) kloniert und erfolgreich heterolog im SplA-defizienten Genotyp ERIC I (ATCC9545) exprimiert. Der Vektor pAD43-25 wurde bereits erfolgreich genutzt um Gene heterolog in *P. larvae* zu exprimieren (Poppinga & Genersch, 2012). In dieser Arbeit wurde das Plasmid pAD43-25-ery verwendet (konstruiert von Dr. Poppinga), welches zusätzlich eine Erythromycinresistenzkassette enthält. Zur Herstellung des Plasmids pAD43-25+*spIA*-His₆-ery wurde zunächst das ursprünglich auf dem Plasmid enthaltene grünfluoreszierende Protein (*gfpmut3a*) durch Restriktionsenzymverdau mit *Xba*I und *Sph*I (Fermentas) entfernt. Der komplette Restriktionsansatz wurde gelelektrophoretisch getrennt, und das Rückgrat (8020 bp) des Plasmids durch Gelextraktion (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das *spIA*-Gen wurde in einer weiteren PCR aus ultrareiner DNA (MasterPure DNA Purification Kit, Epicentre) des *P. larvae* Stamms DSM25430 (ERIC II) mit den Primern sl-*Xba*I-F und sl-Linker-R1 amplifiziert (Tab. 9). Hierdurch wurde eine *Xba*I Restriktionsschnittstelle an das 5'-Ende und ein Linker (GlyGlyGly) an das 3'-Ende des *spIA* Gens amplifiziert. In einer weiteren PCR mit den Primern sl-*Xba*I-F und sl-His₆-*Sph*I-R2 (Tab. 9) erfolgte die Fusionierung von *spIA* mit sechs Histidinresten, einem Stopp-Codon, sowie die Inserterung einer Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende. Beide PCRs wurden mit der HotStar HiFidelity Polymerase (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Insert wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Sph*I verdaut und anschließend mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt. Insert und Vektorrückgrat wurden im molaren Verhältnis 1:6 gemischt und bei 22°C über Nacht ligiert (T4 DNA Ligase, Thermo Fisher Scientific). Das entstandene Plasmid wurde pAD43-25+*spIA*-His₆-ery genannt (Abb. 7). Zur Vermehrung des Plasmids erfolgte die Transformation in chemokompetente *E. coli* DH5 α Zellen (Kap. 2.3.3). Die Bakterien wurden auf LB-Agar mit 100 μ g/ml Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Um gewachsene Klone auf die Aufnahme des Plasmids zu untersuchen, wurde eine Öse mit Koloniematerial auf einer neuen Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Koloniematerial wurde mit einer Öse entnommen und in 50 μ l dd H₂O resuspendiert, für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. 1 μ l des DNA-haltigen Überstandes wurde in der PCR Analyse mit den Primer SplA-F und SplA-R (Tab. 9) eingesetzt, um die Aufnahme des Plasmids zu prüfen. Von positiv getesteten Klonen wurden Kulturen mit 5 ml LB-Medium und 100 μ g/ml Ampicillin inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Isolierung des Plasmids erfolgte mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Die Konzentration des gereinigten Plasmids wurde mit Hilfe des Take3 Synergy HT (Biotek) bestimmt. Zur Überprüfung der Sequenz des *spIA*-Inserts wurde das Plasmid zur Sequenzierung

eingeschickt (MWG Eurofins) und mittels der Primer SplA-F1/R1 - SplA-F5/R5 überprüft (Tab. 9). Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit VectorNTI. Nach Überprüfung der Sequenz erfolgte die Elektroporation des Plasmids in kompetente *P. larvae* Zellen (siehe Kap. 2.2.3). Zu 40 µl gefrorenen elektrokompetenten *P. larvae* Zellen (ATCC9545, Genotyp ERIC I) wurde 1 µg Plasmid-DNA gegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 10-15 min auf Eis inkubiert und alle 5 min vorsichtig durchmischt. Die Elektroporation erfolgte mit einer Feldstärke von 9 kV/cm (*P. larvae* ERIC I, ATCC9545) in eiskalten 1 mm Elektroporationsküvetten (Eppendorf), bei einem Widerstand von 600 Ω (Poppinga & Genersch, 2012). Geschockte Zellen wurden sofort in 1 ml vorgewärmtes MYPGP-Medium überführt und für 16 h bei 37°C und 350 rpm regeneriert. Anschließend wurden die Ansätze auf selektiven MYPGP-Agarplatten mit 0,3 µg/ml Erythromycin ausplattiert und die Aufnahme des Plasmid mittels PCR überprüft.

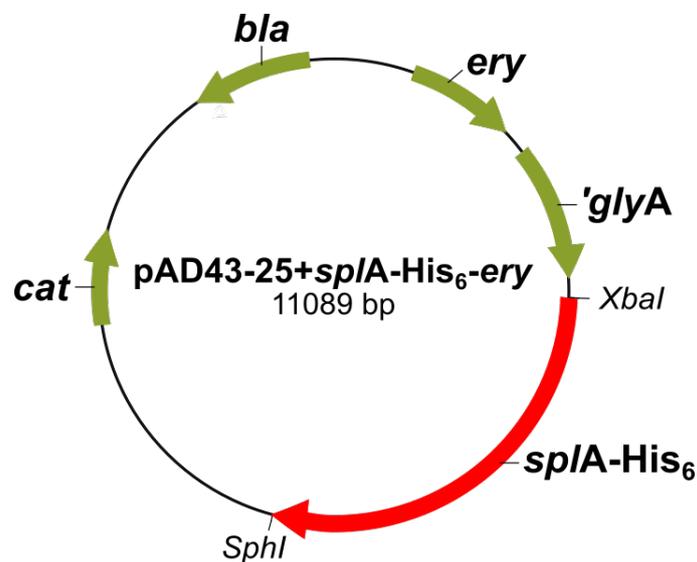


Abb. 7: Schematische Vektorkarte von pAD43-25+spIA-His₆-ery. Das in den Vektor eingefügte spIA-His₆ ist rot dargestellt. Alle weiteren ORFs sind in grün dargestellt. Vektor und Insert wurden mit den Restriktionsenzymen XbaI und SphI verdaut, aufgereinigt und mit der T4 DNA Ligase (Fermentas) ligiert. Das entstandene Plasmid hat eine Größe von 11089 bp und dient der heterologen Expression von spIA-His₆ in ERIC I (ATCC9545). bla = Ampicillinresistenzkassette; cat = Chloramphenicolresistenzkassette; ery = Erythromycinresistenzkassette; 'glyA = letzte 1010 bp des *B. cereus* Gens für Glycine/Serine Hydroxymethyltransferase.

2.5. Proteinexpression und Charakterisierung

2.5.1 Detektion des heterolog exprimierten SplA-His₆ in *P. larvae* ERIC I

In der konstruierten Mutante ATCC9545+*sp/A* (Kap. 2.4.3) erfolgte die heterologe Expression von SplA fusioniert mit einem C-terminalen Histidin₆-Rest. Um SplA-His₆ nachzuweisen wurden Alexa Fluor⁴⁸⁸ konjugierte Antikörper (PentaHis Alexa Fluor, Qiagen) verwendet. Diese konjugierten monoklonalen Antikörper binden spezifisch an fünf aufeinanderfolgende Histidinreste im Peptid und ermöglichten die *in vivo* Darstellung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dazu erfolgte die Anzucht des ERIC I Wildtyps ATCC9545 in 8 ml MYPGP-Medium und der *P. larvae* Mutante mit dem Plasmid pAD 43-25+*sp/A-ery* unter Zusatz von 0,3 µg/ml Erythromycin. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37°C und 200 rpm (Certomat M0 II, B. Braun) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5. Die Anzucht des *P. larvae* Wildtyps ATCC9545 (ERIC I) unter gleichen Bedingungen diente als jeweilige Negativkontrolle für den Versuch. Je 2 ml Kultur wurden entnommen und für die Zellernte zentrifugiert (3341 g, 5 min, 4°C). Das erhaltene Bakterienpellet wurde dreimal mit je 2 ml PBS gewaschen, das finale Bakterienpellet in 200 µl PBS resuspendiert und unter Lichtausschluss 10 µl Alexa Fluor⁴⁸⁸ (Qiagen) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur (~22°C) und 400 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf), erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (4°C, 3341 g, 5 min) und dreimaliges Waschen mit je 0,5 ml PBS Puffer. Die erhaltenen Bakterienpellets wurden in 350 µl PBS gelöst und 10 µl zur Analyse auf einen Objektträger überführt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Nikon Ti-E (Inverses Mikroskop) erstellt. Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurde Differenzialinterferenzkontrast (DIC) und für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ein Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) - Filtersystem eingesetzt.

2.5.2 Expression und Aufreinigung von recPICBP49 aus *E. coli*

Für eine effiziente Expression und die weitere Aufreinigung von recPICBP49 wurden korrekte pRSETB+*cbp49* Klone (siehe Kap. 2.4.2) nach Sequenzierung in *E. coli* BL21 (Invitrogen) transformiert und anschließend auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Über Nacht gewachsene Klone wurden mittels PCR auf die Aufnahme des Plasmids untersucht (Tab. 9). Für die Aufreinigung von recPICBP49 wurden Vorkulturen mit 4 ml LB-Medium unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin, über Nacht bei 35°C und unter schütteln angezogen. Für die Kultivierung der Hauptkulturen wurden je 450 ml TB-Medium mit 100 mg/ml Ampicillin in einem LEX-48 High Throughput Bioreactor System (Harbinger Biotechnology and Engineering, Canada) über Nacht bei 30°C kultiviert. Die Aufreinigung von recPICBP49 erfolgte aus dem periplasmatischen Extrakt, welcher durch kalten osmotischen Schock und

mehreren Zentrifugationsschritten gewonnen wurde (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005b). Anschließend wurde recPICBP49 über ein Äkta Purifier System mit einer starken Anionen-Säule (HiTrap QFF, GE Healthcare) mittels Ionenaustausch aufgereinigt. Mit Hilfe eines Laufpuffers (20 mM Tris, pH 8,3) wurden die Proben auf die Anionen-Säule aufgetragen und anschließend mit einem Elutionspuffer (20 mM Tris, 1M NaCl, pH 8,3) recPICBP49 von der Säule eluiert. Abschließend wurde der pH der aufgefangenen Fraktionen angepasst, Proteaseinhibitor hinzugegeben und bis zur weiteren Verwendung alle ausgewählten Fraktionen bei 4°C gelagert. Die aufgefangenen Fraktionen der Aufreinigung wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit geprüft und selektiert. Ausgewählte Fraktionen wurden zusammengeführt und aufkonzentriert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay (Protein-Assay, BioRad). Die Expression und Aufreinigung von recPICBP49 aus *E. coli* erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Loose und Herrn Prof. Vaaje-Kolstad an der Norwegian University of Life Sciences (NMBU, Ås Norwegen).

2.5.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat (SDS) - Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) (Laemmli, 1970) dient der Auftrennung von Proteingemischen entsprechend ihrer Molekülmasse. In dieser Arbeit wurden 10%ige Trenngele mit 4%igen Sammelgelen verwendet (Tab. 8). Zur Bestimmung der Molekülgrößen wurden der Roti-Mark 10-150 PLUS Proteinmarker (Carl-Roth) und der Precision Plus Protein Unstained Standard (Bio-Rad) verwendet. Zu untersuchende Proben wurden mit 5 x SDS-Ladepuffer versetzt, für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Beladene Gele wurden in einem Mini-Protean Tetra Cell Elektrophoresesystem (Bio-Rad) entwickelt (30 min 90 V, 90 min 120 V). Anschließend erfolgte für 30 min die Fixierung der Gele in einem Fixierungspuffer (20% Ethanol (v/v), 20% Essigsäure (v/v), 50% H₂O) und die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (Page Blue, Fermentas) nach Herstellerangaben. Bilder gefärbter Gele wurden mit dem Densitometer GS-800 (Bio-Rad) aufgenommen und mit Hilfe der Software Quantity One (Bio-Rad) ausgewertet. Außerdem wurden in dieser Arbeit vorgefertigte Gele der Firma Bio-Rad verwendet (10%-20% bzw. Any kD, Mini-PROTEAN TGX stainfree, Precast Gel). Zu untersuchende Proben wurden nach Herstellerangaben mit 10 x reducing agent (NuPAGE, New England Biolabs) und SDS blue Ladepuffer (New England Biolabs) vermischt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben auf einem 10% Mini-PROTEAN TGX stainfree, Precast Gel (Bio-Rad) bei 300 V für 17 min. Aufnahmen der ungefärbten und gefärbten Gele (Page Blue, Fermentas) erfolgte mit einem Criterion Stain Free Imaging System (Bio-Rad).

2.5.4 Chitinabbau-Assay

Für die weitere Charakterisierung von *recPICBP49* wurde zunächst ein geeignetes Chitinsubstrat bestimmt. Hierzu erfolgte die Inkubation verschiedener Chitinsubstrate (α -Chitin, β -Chitin, Chitin Resin) mit *recPICBP49* über 4 h. Die Aufbereitung der verwendeten β -Chitin Partikel (France Chitin) erfolgte wie bereits beschrieben (Fan *et al.*, 2008). Zusammenfassend wurden 75 mg β -Chitin Partikel in 1,8 mM Essigsäure bis zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Suspension wurde anschließend 4 min bei einer Amplitude von 35% mit einem Vibra Cell Ultrasonic Processor (Sonics) sonifiziert. Vor jeder Verwendung von *recPICBP49* in funktionellen Assays erfolgte eine Sättigung mit Kupfersulfat (Cu(II)SO_4) (Loose *et al.*, 2014). *RecPICBP49* wurde im molaren Verhältnis 1 : 3 mit Cu(II)SO_4 versetzt und für 30 min bei 22°C inkubiert. Überschüssiges Kupfersulfat wurde anschließend über eine PD MidiTrap G-25 (GE Healthcare) bzw. eine Zentrifugenfiltereinheit (Amicon Ultra, Merck) nach Angaben der Hersteller entfernt. Für die Bestimmung eines geeigneten Substrates wurden in einem 200 μl Inkubationsansatz jeweils 50 μl der verschiedenen Substrate mit 0,1 mg/ml kupfergesättigtem *recPICBP49*, 50 mM BisTris Puffer (pH 6,8), 1 mM Ascorbat mit Wasser vermischt und über 4 h bei 37°C und 300 rpm (ThermoMixer C, Eppendorf) inkubiert. Anschließend erfolgte die Trennung des flüssigen Überstands und des festen Substrates durch Zentrifugation mit 5000 rpm für 3 min. Mittels SDS-PAGE (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, Bio-Rad) (siehe auch Kap. 2.5.3) erfolgte eine visuelle Inspektion der Bindung von *recPICBP49* an die verschiedenen Substrate. Alle weiteren Chitinabbau-Assays wurden mit dem präferierten Substrat, β -Chitin, durchgeführt. Um Beeinflussungen durch den pH auszuschließen, erfolgte die Inkubation von *recPICBP49* mit dem präferierten Chitinsubstrat in einen pH-Bereich von pH 6-pH 11 mit jeweils 3 technischen Replikaten.

2.5.5 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight (MALDI-TOF)

Für die qualitative Analyse der Abbauprodukte von β -Chitin nach Inkubation mit *recPICBP49* (Kap. 2.5.6), wurden Proben aus den Überständen der Inkubationsansätze des Chitinabbau-Assays entnommen. Zu 1 μl Überstand wurden 2 μl 2,5-Dihydroxybenzoesäure (9 mg/ml, gelöst in 30% Acetonitril) auf einer MTP 384 Probenplatte (Bruker Daltonics) gemischt und mit warmer Luft getrocknet. Die Massenspektrometrie wurde im positiven Erfassungsmodus mit einem Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight) der Firma Bruker Daltonics GmbH durchgeführt und die Analyse der Ausschläge erfolgte mit der Bruker FlexAnalysis Software (Version 3.3). Im Durchschnitt wurden 400 Lasereinheiten auf eine Probe appliziert, um ein Produktprofil des Chitinabbaus zu erhalten.

Bei der Auswertung der Proben wurde die geringste notwendige Laserintensität verwendet, um ein ausreichendes Signal im Verhältnis zum Hintergrundrauschen zu erhalten.

2.5.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die Auftrennung und Quantifizierung der Abbauprodukte von β -Chitin nach Inkubation mit recPICBP49 in den Überständen des Chitinabbau-Assays (Kap. 2.5.4) erfolgte durch hydrophile Interaktionschromatographie (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC). Die entstandenen oxidierten Oligosaccharide wurden über ein Agilent 1290 Infinity UHPLC System (Agilent Technologies) ausgerüstet mit einer Acquity UPLC BEH Amide (150 mm, Waters Corporation) Säule aufgetrennt und die Messung der Absorption erfolgte bei 205 nm. Die Auftrennung erfolgte mit 74% Acetonitril und einem Laufpuffer (15 mM Tris-HCl pH 8,0) als mobiler Phase. Jeweils 7 μ l Probe wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min auf die Säule appliziert. Als Referenz wurden Aldonsäurestandards mit einem Polymerisationsgrad von 1-6 verwendet (Loose *et al.*, 2014; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit ChemStation rev.B.04.02 chromatography Software (Agilent Technologies) ausgewertet. Aus den Überständen eines Chitinabbau-Assays erfolgte die Quantifizierung des oxidierten Hexamers nach Inkubation von recPICBP49 und β -Chitin im Bereich pH 6-11 sowie der Vergleich des Substratumsatzes bei pH 7 über 6 h. Es wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (0,5 h, 2 h, 6 h) Proben aus den Überständen des Chitinabbau-Assays entnommen und die Menge an oxidiertem Hexamer bestimmt. Die Quantifizierung des oxidierten Hexamers erfolgte aus drei technische Replikate aus Überständen des Chitinabbau-Assays.

2.6. Larveninfektionsversuch

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von SplA für die Virulenz von *P. larvae* während der molekularen Pathogenese erfolgte die Durchführung von Larveninfektionsversuchen (Abb. 8) mit Honigbienenlarven wie bereits beschrieben (Ashiralieva & Genersch, 2006; Genersch *et al.*, 2005; Genersch *et al.*, 2006). Für den Genotyp ERIC I erfolgte der Vergleich vom Wildtyp (ATCC9545) mit der konstruierten Mutante, ATCC9545+*sp/A*, welche zusätzlich SplA exprimiert. Zusätzlich wurde für Genotyp ERIC II der Wildtyp (DSM25430) mit dem SplA-defizienten Knockout, DSM25430 Δ *sp/A*, verglichen. Für die Infektionsversuche wurden bis zu 12 h alte Honigbienenlarven aus mindestens drei verschiedenen Bienenvölkern (*A. mellifera carnica*) des Länderinstituts für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V. entnommen. Die Entnahme der Larven aus verschiedenen Völkern diente der Minimierung volksspezifischer Effekte. In jede Vertiefung einer 24-Loch-Platte (Mikrotiterplatte) wurden 10

Larven auf 300 µl Larvenfutter (66 % Gelee Royale (v/v), 3% Glukose (w/v) und 3% Fruktose (w/v)) gesetzt. Das Larvenfutter enthielt die ersten 24 h des Versuchs eine definierte Menge an Sporen (~ LC₈₀), anschließend wurde den Larven normales Larvenfutter (sporenfrei) angeboten. Die Kontrollgruppe erhielt über den gesamten Zeitraum normales Larvenfutter. Während des gesamten Versuchs wurden die Larven bei 35°C und hoher Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator gehalten. Nach der Defäkation erfolgte das Umsetzen jeder Larve in eine einzelnes mit Papierwischtüchern ausgekleidete Vertiefung einer 24-Loch-Platte. Täglich erfolgte das Umsetzen der Larven in eine neue Vertiefung mit frischem Futter bzw. Papierwischtücher, eine Beurteilung der Vitalität und die Dokumentation der Mortalität bis mindestens Tag 14 nach Infektion. Ein Larveninfektionsversuch bestand aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Wiederholungen mit jeweils 30 Larven für jeden zu testenden *P. larvae* Stamm (*P. larvae* Wildtyp, *P. larvae* Mutante) und einer nicht infizierten Kontrollgruppe. Die Sterblichkeit in der Kontrollgruppe diente als Qualitätsmerkmal der Larveninfektionsversuche und durfte 20% nicht überschreiten (Crailsheim *et al.*, 2013).

Larven aus denen RNA für die vergleichende Transkriptomanalyse (RNA-Seq) oder die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) aufbereitet werden sollte, wurden in jedem biologischen Replikat in separaten Gruppen (*P. larvae* Wildtyp, *P. larvae* Mutante, nicht-infizierte Kontrolle) infiziert und bis zur Entnahme an Tag 3 nach Infektion täglich kontrolliert und in neues Futter gesetzt.

Tote Larven wurden auf CSA ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert (Abb. 8 D). Die gewachsenen Kolonien wurden phänotypisch und auf molekularer Ebene mittels PCR überprüft, um den verwendeten *P. larvae* Stamm (*P. larvae* Mutante oder Wildtyp) zu bestätigen (Genersch *et al.*, 2005). Außerdem wurde mit Hilfe der PCR die Stabilität der verwendeten Knockout-Mutante (DSM25430Δ*spIA*) überprüft. Die spezifischen Knockout Primer flankierten hierbei die Insertionstelle des Introns. Für die Analyse mittels PCR wurde eine Öse mit Koloniematerial in 50 µl DEPC Wasser resuspendiert und bei 95°C für 10 min denaturiert. Anschließend wurden Zelldebris und DNA-haltiger Überstand durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min getrennt und der Überstand bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Die Produkte der PCR wurden mittels Gelelektrophorese auf 1%igen Agarosegelen überprüft, mit Ethidiumbromid gefärbt und durch UV-Licht sichtbar gemacht.

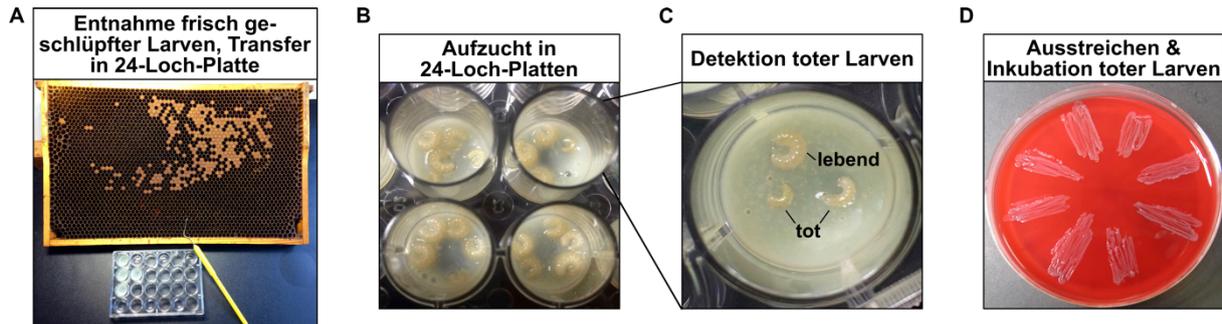


Abb. 8: Übersicht Larveninfektionsversuch. (A) Entnahme frisch geschlüpfter Larven und Überführung in eine 24-Loch-Platte. Die mit sporenhaltigem Futter infizierten Larven werden über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen nach Infektion täglich begutachtet, gefüttert (bis zur Defäkation) und umgesetzt. (B) Die Aufzucht der Larven erfolgte in 24-Loch-Platten. Hier dargestellt sind Larven ca. 4 Tage nach Infektion. (C) Larven wurden als tot beurteilt, wenn sie im Entwicklungsstadium zurückblieben, keine Atmung mehr festzustellen war und die Oberflächenspannung deutlich nachgelassen hatte. (D) Überreste toter Larven wurden auf CSA ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Gewachsene Bakterien wurden mittels PCR untersucht. (Abbildung inspiriert durch Poppinga, 2012)

2.7. Genexpressionsanalyse

2.7.1 Versuchsaufbau der Genexpressionsanalyse

Um zu untersuchen ob sich die Immunantwort der Larve gegenüber dem infizierenden *P. larvae* Genotyp (ERIC I oder ERIC II) unterscheidet, wurden verschiedene Larveninfektionsversuche durchgeführt (siehe auch Kap. 2.6). Aufgrund der Versuchsgröße und der benötigten Anzahl an Larven erfolgten die Infektionsversuche mit den *P. larvae* Genotypen ERIC I und ERIC II nicht parallel, sondern zeitlich gestaffelt. In der experimentellen Gruppe I wurden ERIC I-infizierte Larven, infiziert mit dem *P. larvae* Stamm ATCC9545, mit einer nicht-infizierten Kontrolle verglichen. In der experimentellen Gruppe II erfolgte der Vergleich von ERIC II-infizierten Larven, infiziert mit dem *P. larvae* Stamm DSM25430, mit der zugehörigen nicht-infizierten Kontrolle. Im Larveninfektionsversuch 1 erfolgte in drei biologischen Replikaten (Abb. 9 A, a-c) mit jeweils 30 Larven pro *P. larvae* Stamm (Genotyp ERIC I bzw. ERIC II) bzw. Kontrollgruppe ein Monitoring der Larvenmortalität (Abb. 9 A) über mindestens 14 Tage, um eine erfolgreiche Infektion, den Infektionsverlauf und bereits beschriebene Qualitätsstandards zu überprüfen. Die Mortalität der Kontrollgruppen lag in allen Versuchen unter 20% und keine der Kontrolllarven wies eine Infektion mit *P. larvae* auf. Im Larveninfektionsversuch 2 wurden aus den biologischen Replikaten d-f (Abb. 9 B) jeweils 10 von insgesamt 30 Larven an Tag 3 nach Infektion zufällig

entnommen, die RNA extrahiert (siehe Kap. 2.7.2), zu gleichen Anteilen gemischt und zur Sequenzierung (RNA-Seq) eingeschickt (siehe Kap. 2.7.4). Aus den Sequenzierungsdaten erfolgte die vergleichende Analyse der Transkriptome, wobei jeweils eine nicht-infizierte Kontrolle mit *P. larvae* ERIC I-infizierten bzw. *P. larvae* ERIC II-infizierten Larven verglichen wurde (siehe Kapitel 2.7.5). Im Larveninfektionsversuch 3 erfolgte die Verifizierung der Genexpressionsmuster aus der vergleichenden Transkriptomanalyse anhand der Expression ausgewählter Immungene (Abb. 9 C). Hierfür wurden jeweils drei Larven von insgesamt 30 Larven aus den biologischen Replikaten g-i zufällig entnommen, die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Untersuchung ausgewählter Immungene mittels qPCR (siehe Kapitel 2.7.6) aus der RNA individueller Larven.

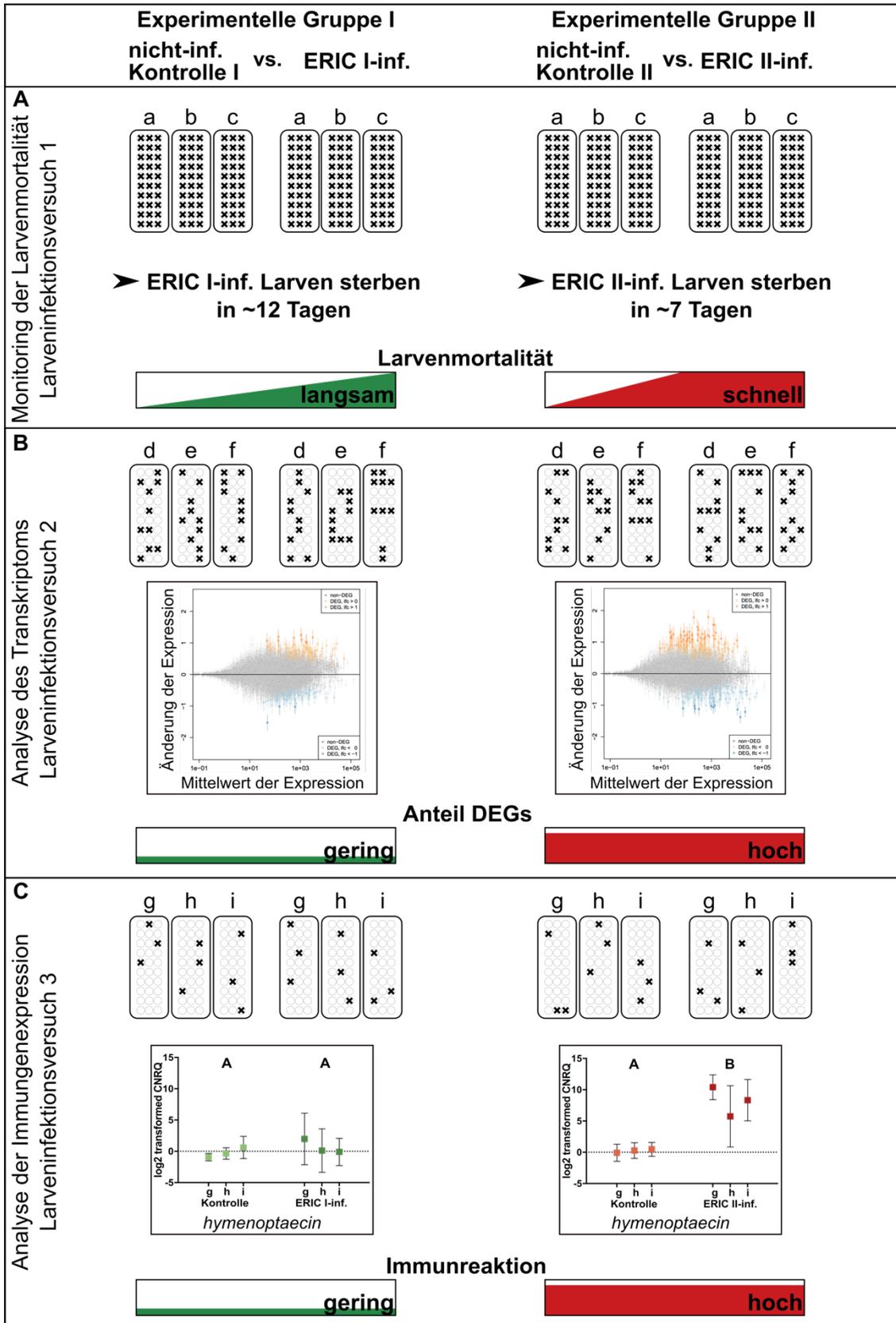


Abb. 9: Monitoring der Larvenmortalität, Analyse des Transkriptoms und der Immunexpression. Mit Kreuzen ist die jeweilige Anzahl beurteilter bzw. entnommener Larven gekennzeichnet. Die Buchstaben a-i kennzeichnen die biologischen Replikate in den Larveninfektionsversuchen 1-3. (A) Monitoring der Larvenmortalität mit *P. larvae* ERIC I- oder *P. larvae* ERIC II-infizierten Larven. Larven die mit *P. larvae* ERIC II infiziert wurden, starben schneller als Larven die mit *P. larvae* ERIC I infiziert wurden (siehe Kasten Larvenmortalität). (B) RNA-Seq-Analyse der Transkriptome mit *P. larvae* ERIC I- oder *P. larvae* ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur jeweiligen nicht-infizierten Kontrollgruppe. Die experimentellen Gruppen zeigten Unterschiede in den Genexpressionsmustern. Mit ERIC II-infizierte Larven zeigten eine höhere Anzahl und Amplitude differentiell exprimierter Gene (DEGs) als *P. larvae* ERIC I-infizierte Larven (siehe Kasten Anteil DEGs). (C) Die qPCR Analyse ausgewählter Immungene bestätigte die Unterschiede in den Genexpressionsmustern zwischen den experimentellen Gruppen. Mit ERIC I-infizierte Larven zeigten eine schwächere Immunantwort (Anzahl der Gene und Amplitude der Expression) als Larven, die mit *P. larvae* ERIC II infiziert waren (siehe Kasten Immunreaktion). Biologische Replikate mit unterschiedlichen Buchstaben unterschieden sich signifikant, wogegen biologische Replikate mit gleichen Buchstaben nicht signifikant verschieden sind.

2.7.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben. Jede entnommene Larve wurde separat in 1 ml TRIzol Reagent manuell mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze zerkleinert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit (25.000 g, Zentrifuge 5427R, Eppendorf) zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Alle weiteren Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und jeweils 200 µl Chloroform hinzugefügt. Anschließend wurden alle Proben für 15 s gemischt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries), 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich für 15 min zentrifugiert (16.000 g). Nach der Zentrifugation war die Auftrennung der einzelnen Proben in drei Phasen zu beobachten. Die obere RNA enthaltene wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol vermischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die präzipitierte RNA mittels Zentrifugation (8 min, 16.000 g) pelletiert. Das entstandene Pellet wurde jeweils in 1 ml 75% Ethanol gelöst, kräftig gemischt und erneut zentrifugiert (8.000 g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 25 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Um eventuelle Verunreinigungen durch larvale DNA oder die Trizol-Aufreinigung zu beseitigen, wurden alle Proben zunächst mit DNase I (Qiagen) verdaut und anschließend mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.7.3 RNA-Qualitätskontrolle

Um abzusichern, dass nur infizierte Larven aus den *P. larvae* infizierten Gruppen (*P. larvae* Genotyp ERIC I oder ERIC II) in die weitere Analyse eingingen, wurde jede aufgereinigte Larve auf Infektion mit *P. larvae* mittels OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) untersucht. Hierfür wurden Primer gegen das *P. larvae* Gen *purH* (Garcia-Gonzalez, 2012) verwendet (siehe Tab. 9, Abb. 10). Ausschließlich positiv getestete Larven des gleichen infizierenden *P. larvae* Stamms, ATCC9545 für *P. larvae* Genotyp ERIC I bzw. DSM25430 für *P. larvae* Genotyp ERIC II, wurden in Poolproben vereint. Zusätzlich wurden alle Larven aus den Kontrollgruppen auf eine Infektion mit *P. larvae* überprüft und in keiner konnte eine Infektion mit *P. larvae* nachgewiesen werden. Um Verfälschungen der Sequenzierungsergebnisse durch kontaminierende larvale DNA zu vermeiden, wurde die aufbereitete RNA mit DNase I (Qiagen) verdaut und anschließend mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Alle aufbereiteten RNA Proben wurden auf noch vorhandene larvale DNA Verunreinigungen, in einer PCR mit Primern gegen das *A. mellifera* Referenzgen Glucuronyltransferase (*Glu*) (siehe Tab. 10), untersucht. Bei Nachweis einer DNA Verunreinigung (Amplikon in der PCR) wurden der DNase I Verdau und die anschließende Aufreinigung wiederholt bis keine Verunreinigung mittels PCR mehr festgestellt werden konnte. Nur RNA Proben mit einem 260/280 nm - Verhältnis von über 1,8 wurden weiter verwendet. Jeweils 10 RNA Proben infiziert mit dem gleichen *P. larvae* Genotyp oder der nicht infizierten Kontrolle wurden in gleichen Anteilen zu Poolproben vereint. Insgesamt wurden 15 Poolproben aus RNA von Larven infiziert mit dem *P. larvae* Genotyp ERIC I (ATCC9545) bzw. ERIC II (DSM25430) sowie der ERIC I Mutante (ATCC9545+*sp/A*) und den zugehörigen Kontrollen aus den drei biologischen Replikaten generiert.

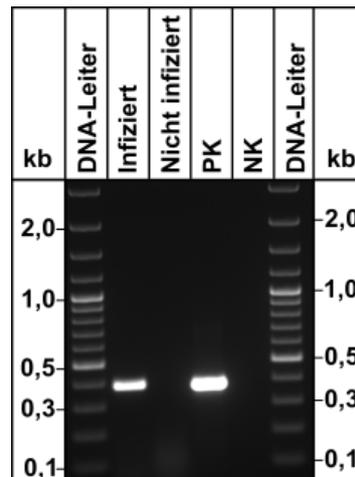


Abb. 10: Reverse Transkriptase (RT)-PCR zur Überprüfung des Infektionsstatus der verwendeten Larven-RNA. In der RT-PCR wurden Primer gegen das *P. larvae* Gen *purH* (Garcia-Gonzalez, 2012) verwendet, welche die Anwesenheit von RNA aus *P. larvae* in der larvalen RNA überprüft. Bei erfolgreicher Infektion der Larve mit *P. larvae* wurde ein Amplikon mit einer Größe von 386 bp aus der Larven-RNA amplifiziert. Bei RNA aus Larven die nicht erfolgreich infiziert werden konnten, konnte kein Amplikon detektiert werden. Zur weiteren Analyse wurden ausschließlich RNAs von erfolgreich infizierten Larven verwendet. Larven aus allen Kontrollgruppen wurden ebenfalls auf eine *P. larvae* Infektion überprüft. Bei keiner konnte eine Infektion mit *P. larvae* nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde DNA von *P. larvae* verwendet. Hier dargestellt sind repräsentative RNA Proben in denen mittels RT-PCR und Primern für das *P. larvae* Gen *purH*, eine Infektion mit *P. larvae* überprüft wurde. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1% Agarosegel, die Proben wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels UV Licht visualisiert. PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle, kB = Kilobasen.

2.7.4 RNA-Seq: Herstellung einer cDNA-Bibliothek und RNA Sequenzierung

Für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek und anschließende Sequenzierung wurden der Firma LGC Genomics (Berlin) 15 RNA-Poolproben übergeben. Die Sequenzierung erfolgte paired end 100bp mit einem Illumina HiSeq2000 Sequenzierer.

2.7.5 RNA-Seq: Genexpressionsanalyse

Die genetische Kartierung ('mapping') der Fragmente der RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) erfolgte an einem von Dr. Yvonne Pöschl (iDiv, Deutsches Zentrum für integrative Biodiversitätsforschung, Halle-Jena-Leipzig) erstellten *A. mellifera* Transkriptom, das auf dem veröffentlichten *A. mellifera* Genom Amel_4.5 (Elsik *et al.*, 2014) basiert. Die Zählung sequenzierter Fragmente und die anschließende Zuordnung zum Referenztranskriptom erfolgte nach Qualitätsfilterung jeder Poolprobe mit dem Programm *Kallisto* (Bray *et al.*,

2016) in Standardeinstellung. Fragmente, die sich nicht eindeutig zu einem Gen zuordnen ließen, wurden aus der Zählung der Fragmente pro zuzuordnendem Gen ausgeschlossen. Dadurch wurden Spleißvarianten oder auch Genhomologe nicht weiter berücksichtigt. Nach Normalisierung erfolgte die Zählung eindeutig zuordenbarer Fragmente sowie die statistische Analyse mit R (Version 3.3.1., (R Development Core Team, 2016)) und dem Bioconductor Softwarepaket (Version 3.3., <https://www.bioconductor.org>). Das R/Bioconductor Softwarepaket *DESeq2* (Love et al., 2014) wurde verwendet, um differentiell exprimierte Gene zu bestimmen. Die Rohdaten aller Fragmente aus der RNA-Seq wurden in *DESeq2* mit Hilfe des *tximport* Softwarepakets (Soneson et al., 2015) eingespeist. Zwischen 3.575.028 und 9.472.183 eindeutig zuordenbaren Fragmenten wurden gezählt (zusätzliche Tab. Z1, Kap. 8.1). Auch nicht eindeutig zuordenbare Fragmente wurden zusammen mit zuordenbaren Fragmenten zur Normalisierung in *DESeq2* verwendet.

Anschließend erfolgte die Umwandlung der Zählungen (Anzahl der Fragmente) mittels regularisierten Logarithmus (*rlog*, regularized-logarithm) in eine logarithmische (\log_2) Skalierung. Hierbei wurden die Gesamtanzahlen aller Fragmente pro Poolprobe gegeneinander normalisiert, um eine Fehlinterpretation bei geringer Gesamtanzahl von Fragmenten zu vermeiden. Abschließend wurden die Anzahlen der Fragmente pro Gen in Beziehung zueinander gesetzt und gruppenweise verglichen. Vor der genauen Untersuchung einzelner Gene, erfolgte eine Qualitätsüberprüfung aller verwendeten Poolproben. Hierzu wurden alle Poolproben auf Ausreißer sowie Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Daten untersucht. Zusätzlich wurde die Häufigkeitsverteilung und Varianz von bereits beschriebenen Haushalts- und Referenzgenen über alle Datensätze geprüft (siehe Tab. 10, Herkunft). Die Verwendung bereits veröffentlichter Primer mit einer ausreichenden Effizienz erwies sich als schwierig. Für die Gene *dorsal 1* und *myd88* mussten im Rahmen dieser Studie neue Primer designt werden, da die veröffentlichten Primer entweder keine oder sehr unspezifische Bindung zeigten

Die berechneten Genhäufigkeiten wurden als beobachtete Genexpression interpretiert und im weiteren Verlauf als Genexpression bezeichnet. Die Beschreibung von Genen, funktionelle Zuordnungen sowie die Zugehörigkeit zu Signaltransduktionswegen erfolgte wie bereits beschrieben (Doublet et al., 2017; Evans et al., 2006; Kanehisa et al., 2017; Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa et al., 2016). Für die Bestimmung differentiell exprimierter Gene (DEGs) erfolgte der Vergleich der experimentellen Gruppen mit dem *DESeq2* Softwarepaket. Jede experimentelle Gruppe bestand aus RNA infizierter und nicht-infizierter Larven. In der experimentellen Gruppe I wurde RNA ERIC I-infizierter Larven (ATCC9545) mit der RNA der nicht-infizierten Kontrolle I verglichen. In der experimentellen Gruppe II erfolgte der Vergleich von RNA ERIC II-infizierter Larven (ERIC IIDS25430) mit der RNA der nicht infizierten Kontrolle II. Ein Gen wurde als differentiell exprimiert bezeichnet, wenn es einen Benjamini-Hochberg korrigierten *p*-Wert gleich oder kleiner als 0,05 aufwies.

Zusätzlich erfolgte eine Sortierung der DEGs nach den in *DESeq2* bestimmten Änderungen in der Expression (\log_2 change, lfc). Vier verschiedene Kategorien wurden bestimmt: extrem hochregulierte DEGs ("++", $lfc > 1$); hochregulierte DEGs ("+", $0 < lfc < 1$); herunterregulierte DEGs ("-", $-1 < lfc < 0$) und extrem herunterregulierte DEGs ("--", $lfc < -1$). Die Anzahl der DEGs für hoch- bzw. herunterregulierte Gene wurde in den experimentellen Gruppen mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests verglichen. Die Genexpressionsanalyse wurde in Kooperation mit Frau Dr. Y. Pöschl vom iDiv Halle-Jena-Leipzig durchgeführt.

2.7.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die Genexpressionsmuster aus der RNA-Seq wurden mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) in RNA aus individuellen Larven überprüft. Vorab wurde aus 1 μ g RNA kontaminierende genomische DNA (gDNA wipeout Puffer) entfernt und diese anschließend in cDNA umgeschrieben (QuantiTect Reverse Transkriptase Kit, Qiagen). Um die Genexpression zu untersuchen wurde die generierte cDNA im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und von dieser Verdünnung 1 μ l verwendet. Die qPCR (Tab. 15) wurde mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. In jeder PCR wurde eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Die Effizienz der Primerpaare wurde, wie von Pfaffl beschrieben, über eine Verdünnungsreihe bestimmt (Pfaffl, 2001). Für die Überprüfung der RNA-Seq Ergebnisse wurden aus jedem biologischen Replikat Larven jedes verwendeten *P. larvae* Stamms bzw. der nicht-infizierten Kontrolle verglichen. Für *P. larvae* Genotyp ERIC I wurde ATCC9545 sowie die konstruierte Mutante ATCC9545+*spIA* mit einer nicht-infizierten Kontrolle verglichen. Für *P. larvae* Genotyp ERIC II wurde DSM25430 sowie die Knockout-Mutante DSM25430 Δ *spIA* mit einer nicht-infizierten Kontrolle verglichen. Es wurden jeweils 3 Larven aus jedem der drei unabhängigen Larveninfektionsversuche (Abb. 9 C, g-i) untersucht. Pro Probe wurden 3 technische Replikate durchgeführt. Die gemessene Genexpression jeder Probe wurde gegen 5 Referenzgene (ATu, Glu, MGS, RPS5, Ubi, siehe auch Tab. 10) normalisiert. Die Gesamtgenexpression wurde relativ zur Genexpression in nicht-infizierten Kontrolllarven berechnet. Aufgrund der hohen Probenanzahl erfolgte die Untersuchung der Expression unterschiedlicher Gene in separierten Läufen. Um einen gleichbleibenden Ablauf zu garantieren, wurden mit jedem PCR-Lauf interne Kontrollen durchgeführt. Die Berechnung der Genexpression erfolgte mit qbase (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium-www.qbaseplus.com). Alle Daten der Genexpression wurden anschließend logarithmiert (\log_2) und für die weitere statische Auswertung in die Software GraphPad Prism übertragen. Die statistische Auswertung erfolgte mit one-way ANOVA, gefolgt vom Bonferroni Test, um den Mehrfachvergleich zu korrigieren und Fehler 1. Art (falsch positiv) zu minimieren.

Außerdem wurde ein Barlett's Test durchgeführt um die Varianzverteilung zwischen den Gruppen zu untersuchen.

Tab. 15: Protokoll der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR)

| Schritt | Dauer | Temperatur |
|-----------------------------------|----------|------------|
| Aktivierung <i>Taq</i> Polymerase | 15 min | 95°C |
| Denaturierung | 1 min | 94°C |
| Anlagerung | 1 min | 60°C |
| Verlängerung | 1 min | 72°C |
| Plattenscan | - | Ja |
| Entfaltung | 20 s | 78°C |
| Plattenscan | - | Ja |
| zurück zu Schritt 2 | - | 40 x |
| Schmelzkurve | 1 min/°C | 75-90°C |

2.8. Platteninhibitionsassays

Zur Untersuchung des Wirkungsspektrums der larvalen Immunantwort wurden die antimikrobielle Peptide (AMPs) Abaecin und Hymenoptacein in Platteninhibitionsassays gegen *P. larvae* Genotyp ERIC I und ERIC II sowie weitere Bakterien getestet (Tab. 12, Tab. 14). Die Synthetisierung der AMPs erfolgte durch die Firma peptides & elephants GmbH (Potsdam). Je 5 ml Medium (LB- bzw. MYPGP-Medium) wurden mit den verschiedenen Erregern angeimpft und über Nacht bei 37°C und 80 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die OD₆₀₀ der Vorkulturen photometrisch bestimmt (Eppendorf, BioPhotometer), LB-Agar bzw. MYPGP-Agar verflüssigt, abgekühlt und jeweils 15 ml Agar auf eine OD₆₀₀ von 0,01 mit den jeweiligen Bakterien angeimpft. 125 µM der AMPs wurden mit Medium über Nacht bei 23°C in 0,5 ml PCR Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler (Biorad) inkubiert. Je nach aufzutragendem Volumen des AMPs wurden unter sterilen Bedingungen, mit der Rückseite einer sterilen 10 µl bzw. 100 µl Pipettenspitzen (Eppendorf), Löcher in die mit Bakterien beimpften Agarplatten gestanzt. Die gestanzten Löcher wurden mit dem inkubierten AMP-Medium-Gemisch gefüllt und für 48 h bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation wurden die Agarplatten begutachtet, die Ergebnisse dokumentiert (Olympus C-5060 Digitalkamera) und entstandene Hemmhöfe vermessen.

3. Ergebnisse

3.1. Weitere Untersuchung zur Relevanz von *PICBP49*

In der Vergangenheit wurden bereits mehrere Virulenzfaktoren von *P. larvae* identifiziert (Kap. 1.5), u.a. ein Schlüsselfaktor für die Pathogenese und Virulenz: das chitinbindende und -abbauende Protein *PICBP49* (*P. larvae* chitin-binding protein 49) (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c). *PICBP49* wird von *P. larvae* Genotyp ERIC I sowie Genotyp ERIC II exprimiert und baut die peritrophe Membran, eine chitinreiche Schutzschicht des Darmepithels ab (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c), sodass im weiteren Verlauf der Pathogenese einer Infektion mit *P. larvae* das Darmepithel durch weitere Virulenzfaktoren angegriffen werden und die Invasion in die Körperhöhle erfolgen kann (Yue *et al.*, 2008). Strukturelle Gemeinsamkeiten von *PICBP49* mit Mitgliedern der AA10 Familie (Auxiliary Activity Family 10, früher CBM33) lytischer Polysaccharid Monooxygenasen (LPMOs) wurden bereits gezeigt (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c) und legen nahe, dass *PICBP49* in der peritrophen Membran vorhandenes Chitin über einen metallionen-abhängigen oxidativen Mechanismus abbaut. Die Arbeiten zur biochemischen Charakterisierung erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Vaaje-Kolstad und Dr. Loose an der Norwegian University of Life Sciences (Ås, Norwegen).

3.1.1 Identifizierung eines präferierten Substrats

Das Verständnis des Virulenzfaktors *PICBP49* ist Voraussetzung, um die molekulare Pathogenese der AFB genauer zu verstehen. Für die weitere biochemische Charakterisierung des Virulenzfaktors *PICBP49* erfolgte die heterologe Expression in *E. coli* (*recPICBP49*). Hierfür wurde *cbp49* in den Vektor pRSETB kloniert und der manipulierte Vektor anschließend in *E. coli* Stellar Competent Cells transformiert (Abb. 11). Mit diesem Vektor wurden bereits Proteine anderer Mitglieder der AA10 Familie heterolog exprimiert (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005b). Da *PICBP49* in *E. coli* nicht überexprimiert wurde, erfolgte die Anpassung der Kultivierungsbedingungen. Hierfür wurden größere Kulturvolumina und ein Hochdurchsatz Bioreaktor (LEX-48 High Throuput Bioreactor System, Harbinger Biotechnology and Engineering, Canada) für die Anzucht der Hauptkulturen verwendet.

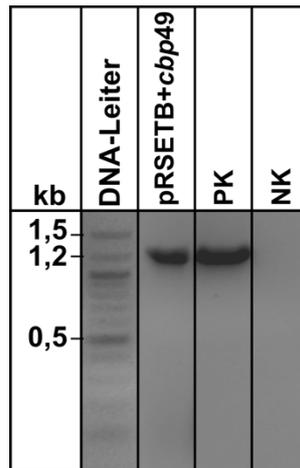


Abb. 11: Erfolgreiche Aufnahme des Vektors pRSETB+cbp49 in *E. coli* Stellar Competent Cells. *Cbp49* flankierende Primer amplifizieren ein ca 1250 bp großes Fragment aus DNA über Nacht gewachsener Klone. PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle.

Um die Funktionsweise von *recPICBP49* weiter zu untersuchen, wurde zunächst ein bevorzugtes Substrat bestimmt. Aufgereinigtes und mit Kupfersulfat gesättigtes *recPICBP49* wurde mit α -Chitin und β -Chitin sowie Chitin Resin (New England Biolabs) über 4 h inkubiert (Abb. 12 A). Nach Inkubation wurden flüssiger Überstand und feste Substrate durch Zentrifugation getrennt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die SDS-PAGE Analyse zeigte, dass *recPICBP49* an alle getesteten Substrate bindet. Die intensivste Bande konnte im Inkubationsansatz mit β -Chitin festgestellt werden.

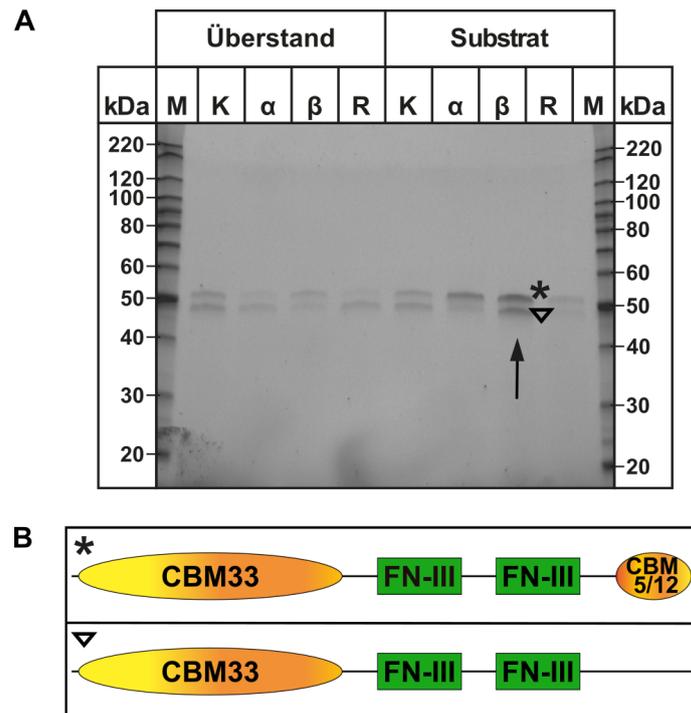


Abb. 12: Identifizierung eines bevorzugten Substrats von *recPICBP49*. (A) SDS-PAGE der Inkubationsansätze des Chitinabbau-Assays zur Identifizierung eines geeigneten Substrats. *RecPICBP49* wurde mit α -Chitin, β -Chitin und Chitin Resin über 4 h, bei 37°C und schütteln inkubiert. Proben der Überstände und der verschiedenen Substrate des Assays wurden voneinander getrennt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Intensität der Banden veranschaulicht das Verhältnis von freiem und an die Substrate gebundenem *recPICBP49*. Bei allen geprüften Substraten war eine Doppelbande sichtbar, welche mit Hilfe von Massenspektrometrie untersucht wurde. Die intensivsten Banden konnten bei β -Chitin beobachtet werden (Pfeil). (B) Mittels Massenspektrometrie konnte die obere Bande als *recPICBP49* mit allen vier Domänen (N-terminale CBM33 (AA 10), 2 FN-III-Wiederholungen, CBM5/12 Domäne) (Stern) identifiziert werden und die untere Bande als *recPICBP49* ohne die CBM5/12 Domäne (Dreieck). (Domänenstruktur modifiziert aus Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014) M = Marker, K = Kontrolle, α = α -Chitin, β = β -Chitin, R = Chitin Resin (NEB).

Die starke Bindung an β -Chitin lässt vermuten, dass es sich hierbei um ein präferiertes Substrat handelt. Alle weiteren Assays wurden mit β -Chitin durchgeführt. Bei allen getesteten Substraten wurde eine Doppelbande festgestellt, welche mittels Massenspektrometrie untersucht wurde. Die obere Bande wurde als *recPICBP49* mit allen vier Domänen (N-terminale CBM33 (AA 10), 2 FN-III-Wiederholungen, CBM5/12 Domäne) identifiziert. Bei der unteren Bande handelte es sich ebenfalls um *recPICBP49*, jedoch fehlte die CBM5/12 Domäne (Abb. 12 B, zusätzliche Abb. A3).

3.1.2 Kinetik von recPICBP49

Um den Abbau von β -Chitin durch recPICBP49 genauer zu verstehen, erfolgte die quantitative und qualitative Untersuchung der oxidierten Abbauprodukte. Nach Inkubation von recPICBP49 mit β -Chitin im pH-Bereich 6-11 erfolgte die Quantifizierung des oxidierten Hexamers im Überstand mittels hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC). Die Quantifizierung erfolgte repräsentativ am oxidierten Hexamer, da dieser bereits bei CBP21 von *S. marcescens* als eines der Hauptprodukte nachgewiesen werden konnte (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Im Vergleich der verschiedenen pH-Bereiche konnte bei pH 7 signifikant mehr oxidiertes Hexamer detektiert werden (Abb. 13 A) als bei den anderen getesteten pHs (analysiert mit one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison mit $\alpha < 0,05$).

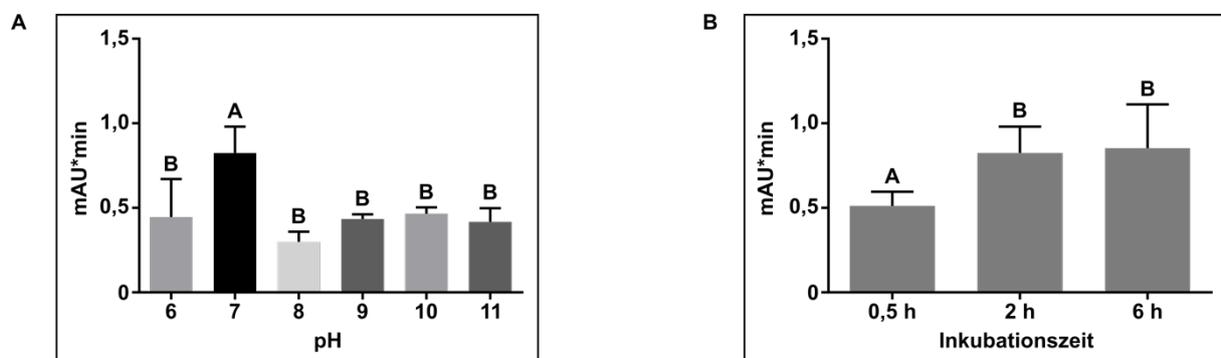


Abb. 13: Bestimmung des optimalen pHs und der optimalen Inkubationszeit von recPICBP49 mit β -Chitin anhand des oxidierten Hexamers. (A) Quantifizierung des oxidierten Hexamers nach 2 h Inkubation von recPICBP49 mit β -Chitin im pH-Bereich von pH 6-11. Der Substratumsatz bei pH 7 war signifikant höher als bei allen anderen getesteten pHs. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterschieden sich signifikant, wogegen Säulen mit gleichen Buchstaben nicht signifikant verschieden sind. Es wurden drei technische Replikate durchgeführt, welche als Mittelwerte \pm SD dargestellt sind (analysiert mit one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison mit $\alpha < 0.05$). mAU*min = milli absorption units per min. (B) Vergleich des Substratumsatzes des oxidierten Hexamers bei pH 7 über einen Zeitverlauf von 6 h aus demselben Assay. RecPICBP49 wurde mit β -Chitin inkubiert und zu drei verschiedenen Zeitpunkten (0,5 h, 2 h, 6 h) wurden Proben aus dem Überstand entnommen. Nach 2 h Inkubationszeit konnte signifikant mehr oxidiertes Hexamer detektiert werden. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf insgesamt 6 h brachte keine signifikante Steigerung des Substratumsatzes von oxidiertem Hexamer. Es wurden drei technische Replikate durchgeführt, welche als Mittelwerte \pm SD dargestellt sind (analysiert mit one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison mit $\alpha < 0.05$). mAU*min = milli absorption units per minute.

Nachdem pH 7 als optimaler pH für den Umsatz des oxidierten Hexamers bestimmt wurde, erfolgte im selben Assay die Analyse des Umsatzes von oxidiertem Hexamer über 6 h. Nach einer Inkubationszeit von 2 h konnte signifikant mehr oxidiertes Hexamer als nach einer Inkubationszeit von 0,5 h festgestellt werden (Abb. 13 B). Die Inkubation von *recPICBP49* mit β -Chitin in weiteren Assays kann über einen Zeitraum von 2 h erfolgen, da dies ausreichend Zeit für den optimalen Umsatz von oxidiertem Hexamer unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu sein scheint. Eine verlängerte Inkubationszeit von 6 h zeigte keine signifikante Erhöhung der Menge oxidierten Hexamers und wurde somit nicht weiter angewendet.

Nachdem ein präferiertes Substrat, ein optimaler pH sowie eine effektive Inkubationszeit bestimmt werden konnten, erfolgte die Analyse des Produktprofils von *recPICBP49*. Hierzu wurde *recPICBP49* 2 h mit β -Chitin bei pH 7 inkubiert und anschließend der Überstand des Chitinabbau-Assays mittels hydrophiler Interaktionschromatographie untersucht. Geradzahlige oxidierte Produkte (A4 ox, A6 ox) waren in größeren Mengen feststellbar als ungeradzahlige oxidierte Produkte (Abb. 14). Eine Präferenz für geradzahlige oxidierte Produkte wurde bereits bei anderen Vertretern der AA-10 Familie beschrieben (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010)(Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Diese Gemeinsamkeiten im Produktprofil legen nahe, dass *recPICBP49* Chitin ebenfalls über einen metallionen-abhängigen oxidativen Mechanismus abbaut. Um eine Beeinflussung des erhaltenen Produktprofils durch den pH auszuschließen, erfolgte die Überprüfung des Produktprofils im pH Bereich 6-11. Für alle getesteten pHs konnten ähnliche Produktprofile festgestellt werden, eine Verzerrung durch den pH ist somit auszuschließen.

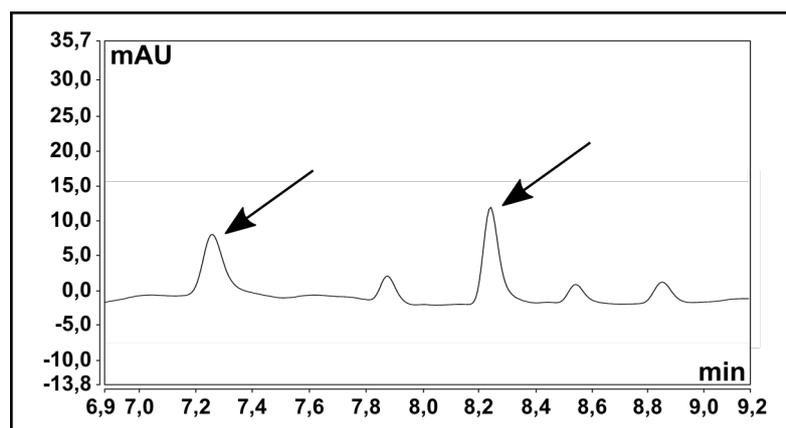


Abb. 14: Produktprofil von *recPICBP49* nach zweistündiger Inkubation mit β -Chitin bei pH 7. Eine größere Menge an geradzahligen oxidierten Produkten (A4 ox, A6 ox; Pfeile) konnte beobachtet werden, wie es auch schon bei anderen Vertretern der AA10 Familie der Fall war.

3.2. Weitere Untersuchung zur Relevanz von SplA

Der erste für *P. larvae* Genotyp ERIC II identifizierte und funktionell charakterisierte Virulenzfaktor ist das S-layer-Protein SplA (Poppinga *et al.*, 2012). Die entscheidende Rolle des S-layers für die Virulenz von *P. larvae* ERIC II konnte in Larveninfektionsversuchen im Vergleich zu einem S-layer-defizienten Knockout gezeigt werden. Wird das S-layer Protein nicht exprimiert, kommt es zum signifikanten Abfall der Larvenmortalität. Die Expression von SplA scheint ein entscheidender Schritt in der Strategie von *P. larvae* ERIC II zu sein, welcher in dieser Arbeit weiter untersucht wurde. Hierzu erfolgte die heterologe Expression von SplA in *P. larvae* Genotyp ERIC I, welcher natürlicherweise kein S-layer Protein exprimiert.

3.2.1 Heterologe Expression von *spIA* in *P. larvae* Genotyp ERIC I

Zur weiteren Analyse der Funktion des S-layer Proteins SplA erfolgte die Klonierung von *spIA* in den *E. coli*-Bacillus-Shuttle Vektor pAD43-25 (siehe 2.5.1; (Poppinga, 2012)). Die heterologe Expression des S-layer Proteins erfolgte wie bereits beschrieben (Poppinga *et al.*, 2012) im SplA-defizienten *P. larvae* Genotyp ERIC I, in dieser Studie jedoch zum ersten Mal im *P. larvae* Stamm ATCC9545. Nachdem das *spIA* zunächst mit 6 Histidinresten am C-terminalen Ende fusioniert wurde, erfolgte die Ligation von *spIA*-His₆ in den pAD43-25-ery-Vektor. Die Aufnahme des ligierten Vektors wurde über den Nachweis der Erythromycinkassette mittels PCR überprüft (Abb. 15).

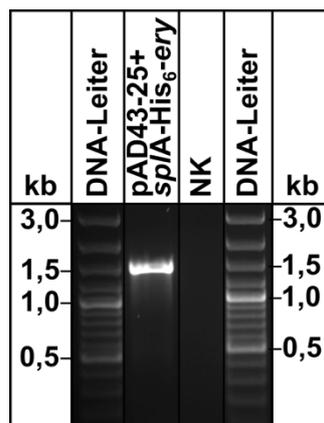


Abb. 15: Überprüfung der Aufnahme des Plasmids pAD43-25+*spIA*-His₆-ery. Nachweis der Erythromycinkassette in über Nacht gewachsenen *P. larvae* Klonen, um die Aufnahme des Plasmids pAD43-25+*spIA*-His₆-ery zu überprüfen. PCR Analysen mit Primern, welche die Erythromycinkassette des Vektors flankieren, amplifizierten wie erwartet ein Stück von ca. 1500 bp.

Die SplA-His₆ exprimierende Mutante (ATCC9545+*spIA*) sowie der zugehörige ERIC I Wildtyp (ATCC9545) wurden wie beschrieben (Kap. 2.5.1) mit monoklonalen His-Antikörpern, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (PentaHis Alexa Fluor, Qiagen), behandelt. Anschließend erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Mutante und des Wildtyps mit Hilfe eines inversen Mikroskops und einem FITC-Filtersystem. Bei der Mutante ATCC9545+*spIA* konnte Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 16). Der Wildtyp des *P. larvae* Genotyps ERIC I (ATCC9545) zeigte nach Behandlung mit PentaHis Alexa Fluor⁴⁸⁸ keine Fluoreszenz. Heterolog exprimiertes SplA-His₆ ordnete sich wie bereits gezeigt (Poppinga, 2012) auf der Oberfläche der manipulierten Bakterienzellen an. Diese Ergebnisse zeigen, dass heterolog exprimiertes SplA-His₆ der Mutante ATCC9545+*spIA* an die Zelloberfläche exportiert wird und sich dort organisiert. Diese Ergebnisse belegen, dass SplA funktionell in ERIC I exprimiert wird und Larveninfektionsversuche mit dieser möglicherweise hypervirulenten Mutante durchgeführt werden können.

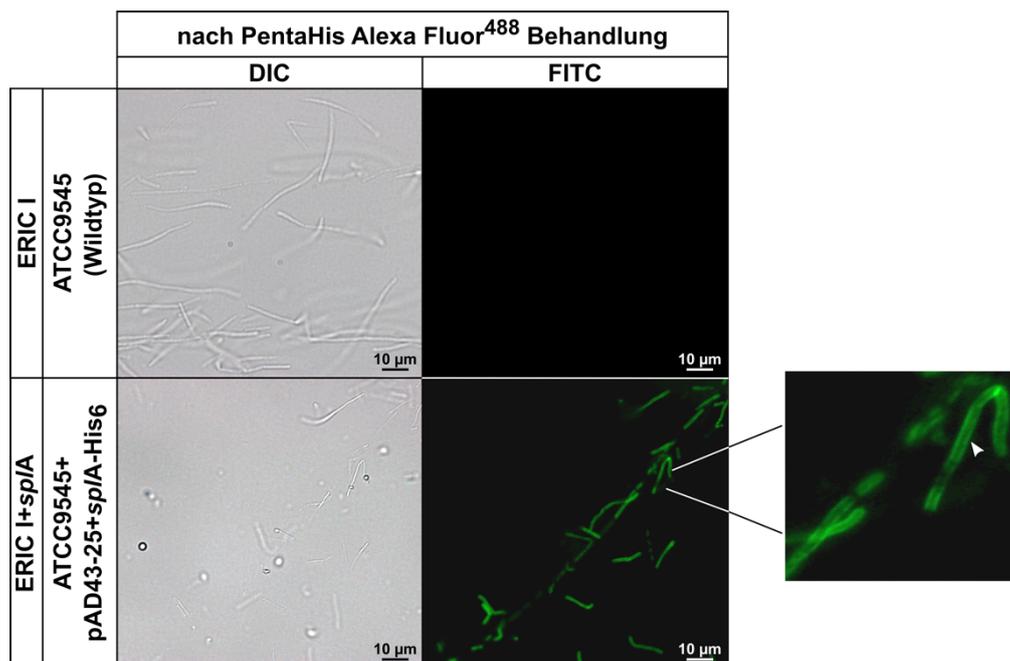


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Detektion des heterolog exprimierten SplA-His₆ in *P. larvae* ERIC I (ATCC9545). Die Bakterienzellen wurden mit Alex Fluor488 konjugierten Antikörpern behandelt, welche spezifisch an Histidinreste binden. Der behandelte Wildtyp ATCC9545 zeigte keinerlei Fluoreszenz. Die Mutante ATCC9545+pAD43-25+*spIA*-His₆ zeigte eine deutliches Fluoreszenzsignal. SplA-His₆ organisierte sich an der Oberfläche der Bakterien (weißer Pfeil), was durch die Abgrenzung einer äußeren grünen Schicht und einem dunkleren Inneren der Bakterien deutlich wird (Design übernommen aus Poppinga, 2012).

3.2.2 Larveninfektionsversuche mit der Mutante ATCC9545+*spIA*

Um die Rolle von SplA für die Virulenz von *P. larvae* weiter zu untersuchen, wurde die ERIC I Mutante (ATCC9545+*spIA*) im Vergleich zum Wildtyp (ATCC9545) im Larveninfektionsversuch (siehe auch Kap. 2.6) getestet. Vom Wildtyp und der Mutante wurden Sporensuspensionen hergestellt, die Sporenkonzentration bestimmt (Kap. 2.2.2) und die Larven mit definierter Sporenmenge ($\sim LC_{80}$) infiziert (Genersch *et al.*, 2005; Genersch *et al.*, 2006). Ein Larveninfektionsversuch bestand aus drei unabhängig voneinander durchgeführten biologischen Replikaten mit jeweils 30 Larven infiziert mit dem *P. larvae* Wildtyp (ATCC9545), der *P. larvae* Mutante (ATCC9545+*spIA*) bzw. der nicht-infizierten Kontrollgruppe. Die nicht-infizierte Kontrollgruppe wurde mitgeführt, um die natürliche Mortalitätsrate der Larven zu bestimmen und den jeweiligen Versuch zu validieren. Die Gesamtmortalität der Larven wurde ermittelt, indem die Zahl der Larven, die an AFB gestorben waren, in Relation zur eingesetzten Gesamtzahl der Larven gesetzt wurde. Eine Infektion der Larven mit dem *P. larvae* Stamm ATCC9545 (ERIC I), welcher natürlicherweise nur die Toxine, nicht aber SplA exprimiert, führte zu $63,33\% \pm 10,19\%$ Gesamtmortalität. Die Gesamtmortalität in den Gruppen, die mit der *P. larvae* Mutante ATCC9545+*spIA* (ERIC I+*spIA*, Toxin+SplA-Mutante) infiziert wurden, lag bei $67,78\% \pm 7,78\%$ und unterschied sich nicht signifikant vom *P. larvae* Wildtyp ($p = 0,7463$, Abb. 17 A). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem unpaired Student's t-test. Bei der Berechnung der kumulativen Mortalität entsprachen 100% allen an AFB gestorbenen Larven. Am Ende des Versuchs wurde ermittelt, welcher Anteil der an AFB gestorbenen Larven an den jeweiligen Tagen bereits tot war. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der kumulativen Mortalität bei Larven, die mit ATCC9545 oder mit ATCC9545+*spIA* infiziert wurden, beobachtet werden (Abb. 17 B). Die statistische Analyse erfolgte mit two-way ANOVA. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die zusätzliche Expression des ERIC II-spezifischen Virulenzfaktors SplA in ERIC I-Stämmen nicht zu einer erhöhten Virulenz führt, obwohl in der getesteten Mutante sowohl die ERIC I-spezifischen Toxine als auch das S-layer Protein aktiv waren (siehe auch Kap. 3.2.1).

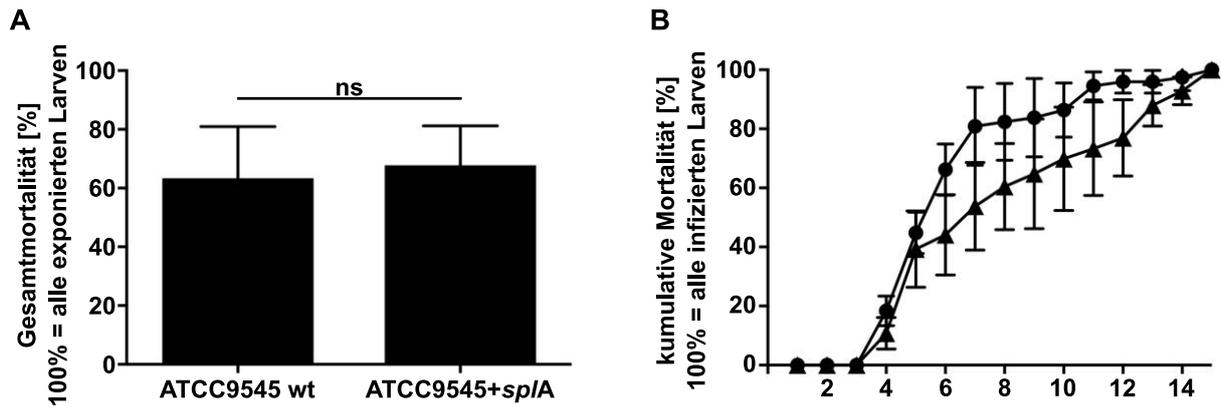


Abb. 17: Bestimmung der Gesamt- und kumulativen Mortalität in der mit ATCC9545 und der ATCC9545+spIA infizierten Gruppe. (A) Die Gesamtmortalität der Larven, die mit ATCC9545 (ERIC I, Wildtyp) oder ATCC9545+spIA (SpIA-exprimierende Mutante infiziert wurden, wurde ermittelt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD (analysiert mit unpaired Student's t-Test, p -Wert = 0,7463). wt = Wildtyp, +spIA = SpIA Knock-in-Mutante, ns = nicht signifikant. (B) Die kumulativen Mortalität wurde berechnet, wobei 100% aller an AFB gestorbenen Larven entsprach. Die Analyse der kumulativen Mortalität zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Wildtyp ATCC9545 (Kreise) und der Mutante ATCC9545+spIA (Dreiecke). Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD (analysiert mit two-way ANOVA, p -Wert > 0,05).

3.3. Untersuchung der Immunantwort

Um zu untersuchen ob sich die Immunantwort der Larve gegenüber dem infizierenden Genotyp *P. larvae* ERIC I bzw. *P. larvae* ERIC II unterscheidet, erfolgte die Durchführung von Larveninfektionsversuchen mit beiden Genotypen (Kap. 2.6). Aus zusätzlichen Gruppen der Larveninfektionsversuchen wurden Larven der verschiedenen Zustände (ERIC I-infiziert, nicht-infizierte Kontrolle I, ERIC II-infiziert, nicht-infizierte Kontrolle II) für die Untersuchung der Immunantwort entnommen (Abb. 9), RNA aus den entnommenen Larven isoliert (Kap. 2.7.2) und auf Infektion mit *P. larvae* untersucht (Abb. 10). Nach Überprüfung der Reinheit und Qualität der aufgereinigten RNA (Kap. 2.7.3) erfolgte das anteilige Zusammenführen von jeweils 10 Einzel-RNAs infiziert mit demselben *P. larvae* Stamm bzw. der nicht-infizierten Kontrolle zu einer Poolprobe. Die insgesamt 12 Poolproben (3 x ATCC9545, 3 x Kontrolle, 3 x DSM25430, 3 x Kontrolle) wurden zur Sequenzierung eingeschickt (LGC Genomics). Im Anschluss erfolgte die bioinformatische Analyse der RNA-Seq-Daten in Kooperation mit Dr. Y. Pöschl (iDiv, Halle-Jena-Leipzig).

3.3.1 Qualitätskontrolle der RNA-Seq-Daten

Vor einer vertiefenden Analyse einzelner Gene erfolgte die Überprüfung der Qualität der RNA-Seq-Daten. Die Expressionsdaten aller Poolproben wurden auf Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit untersucht. Der Vergleich der Verteilung der Genexpressionsdaten aller Poolproben erfolgte durch visuelle Inspektion an Hand einer Kastengrafik (Boxplot) mit den *DESeq2* korrigierte Fragmentanzahlen (Abb. 18). Die Mediane (horizontaler Strich), der Interquartilsabstand (IQA, Begrenzung des Kastens) und die Antennen ('whisker') sowie die Ausreißer (definiert als $> 1,5 \times > IQAs$) waren in allen 12 Poolproben ähnlich verteilt. Um zu testen, ob eine vergleichbare Verteilung vorlag, wurde anschließend ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,99$) in der Verteilung der Genexpressionsdaten festgestellt werden, eine vertiefende Analyse war somit möglich.

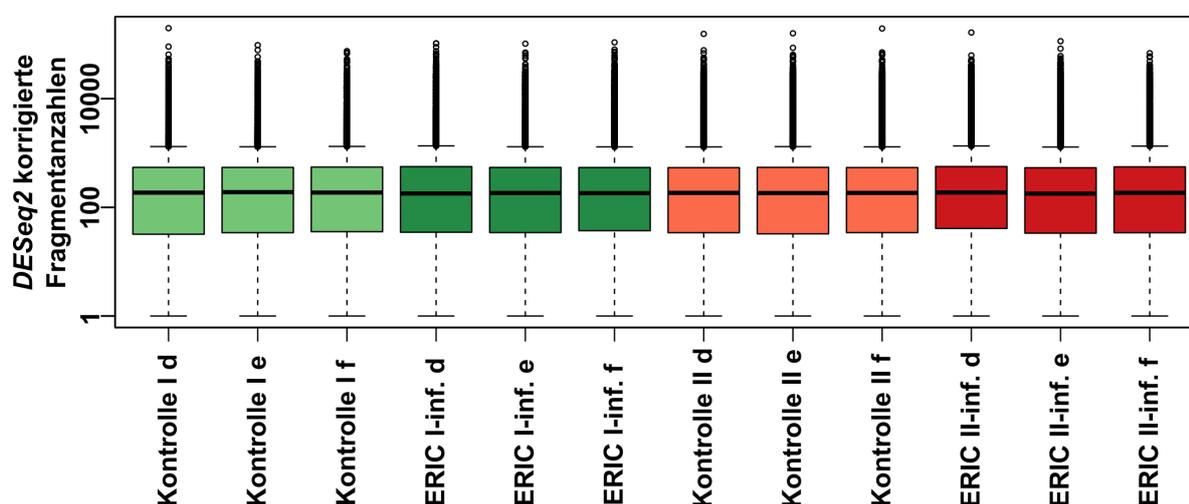


Abb. 18: Verteilung der Genexpressionsdaten aller sequenzierten Poolproben. Dargestellt sind die *DESeq2* korrigierte Fragmentanzahlen aller 12 Poolproben. Die Mediane (horizontaler Strich), der Interquartilsabstand (IQA, Begrenzung des Kastens), die Antennen ('whisker') sowie die Ausreißer (definiert als $> 1,5 \times > IQAs$) waren ähnlich verteilt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung festgestellt werden (Kruskal-Wallis Test, $p = 0,99$). Die vorliegenden Daten konnten für eine vertiefende Analyse verwendet werden. Die Analyse erfolgte in Kooperation mit Dr. Y. Pöschl vom iDiv (Halle-Jena-Leipzig).

Anschließend erfolgte die Untersuchung der Beschaffenheit der durchgeführten biologischen Replikate der experimentellen Gruppen. Dies erfolgte durch den paarweisen Vergleich der *r-log* (*regularisierter Logarithmus*) transformierten Rohexpressionsdaten. Der Vergleich erfolgte jeweils zwischen den biologischen Replikaten infiziert mit dem gleichen *P. larvae*

Stamm sowie den nicht-infizierten Kontrollen, mittels visueller Überprüfung in einem Streudiagramm (Scatterplot) und der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (Abb. 19). Die Streudiagramme in den Quadraten in der jeweiligen oberen rechten Ecke der Abbildung zeigen den paarweisen Vergleich aller *r-log* transformierten rohen Expressionsdaten pro Gen für die biologischen Reolikate. Alle Punkte der paarweisen Vergleiche bilden die Diagonale des jeweiligen Quadrats. Diese lineare Anordnung zeigt an, dass die biologischen Replikate reproduzierbar sind. Die Berechnung der Pearson-Korrelation in den Quadraten der jeweiligen unteren linken Ecke, bestätigte die Reproduzierbarkeit der biologischen Replikate ($r \geq 0,99$). Hierbei entspricht ein Korrelationskoeffizient (r) nahe 1 einer positiven (linearen) Korrelation. Liegt dieser Betrag nahe 0, liegt keine (lineare) Korrelation vor.

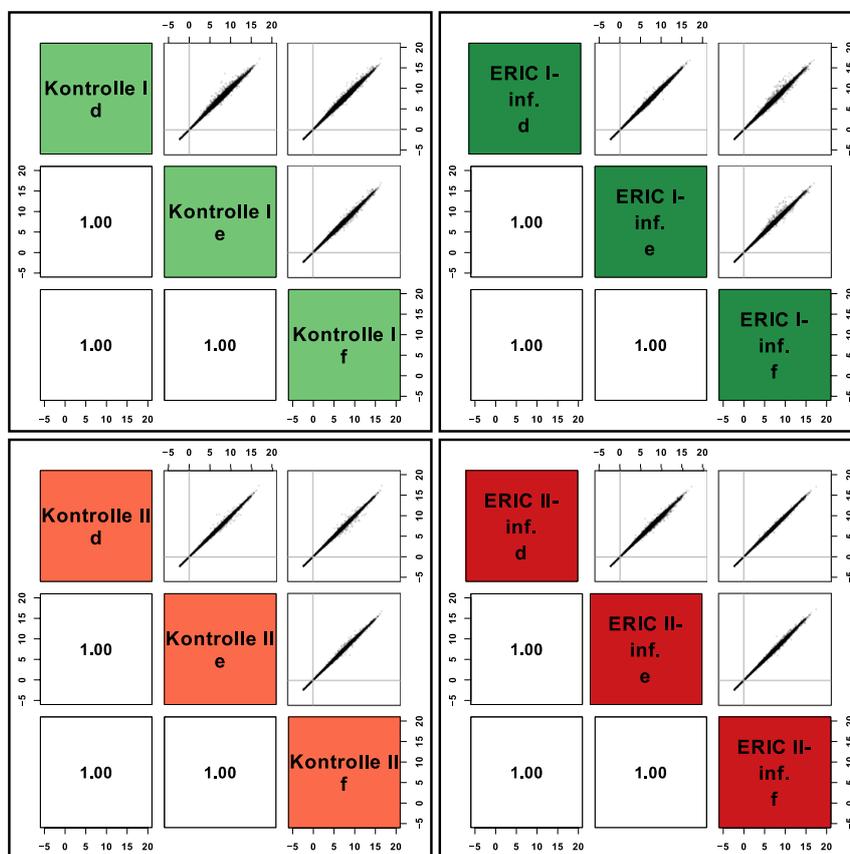


Abb. 19: Überprüfung der Beschaffenheit der durchgeführten biologischen Replikate. Vergleich die *r-log*-transformierten Rohexpressionsdaten. Gruppen infiziert mit dem gleichen *P. larvae* Stamm sowie nicht-infizierten Kontrollen aller 12 Poolproben wurden innerhalb der biologischen Replikate paarweise gegenübergestellt. Alle Punkte des paarweisen Vergleichs ordneten sich in der Diagonalen des entsprechenden Quadrats an (Quadrate jeweils rechte obere Ecken). Diese lineare Anordnung zeigt die Reproduzierbarkeit der biologischen Replikate. Die Berechnung der Pearson-Korrelation belegte die Reproduzierbarkeit mit einer positiven Korrelation ($r = 1$) (Quadrate jeweils linke untere Ecken). Die Analyse wurde in Kooperation mit Dr. Y. Pöschl (iDiv, Halle-Jena-Leipzig) durchgeführt.

Zusätzlich erfolgte die Analyse der Expression der ausgewählten Haushalts- und Referenzgene in allen Poolproben. Insgesamt erfolgte die Untersuchung von sieben Haushaltsgenen und fünf Referenzgenen, welche bereits in vorherigen Studien verwendet wurden (Herkunft siehe Tab. 10). Mit Hilfe von Kastengrafiken wurden die Genexpressionslevel verglichen, gefolgt vom Ausreißertest nach Grubbs (basierend auf \log_2 -transformierten Werten, Abb. 20). Bei allen untersuchten Haushalts- (Abb. 20, grau dargestellt) und Referenzgenen (Abb. 20, braun dargestellt) konnte lediglich bei dem Haushaltsgen *gapdh* (Gen ID: 410122) ein signifikanter Ausreißer bestimmt werden (Ausreißertest nach Grubbs, $p = 0,01$). Alle anderen Gene wiesen im Vergleich der Expressionsdaten über alle Poolproben keine Ausreißer auf. Mit Hilfe des Cochran-Mantel-Haenszel-Tests erfolgte die Untersuchung der Varianz der Expressionsleveldaten aller ausgewählten Haushalts- und Referenzgene. Das Referenzgen *glucuronyltransferase* (Glu, Gen ID: 409203) zeigte eine größere, jedoch nicht signifikante Varianz als alle anderen untersuchten Gene. Ähnliche Expressionslevel der Haushalts- und Referenzgene in allen Poolproben belegten die Vergleichbarkeit der erhobenen Daten und ermöglichen den Ausschluss systematischer Fehler.

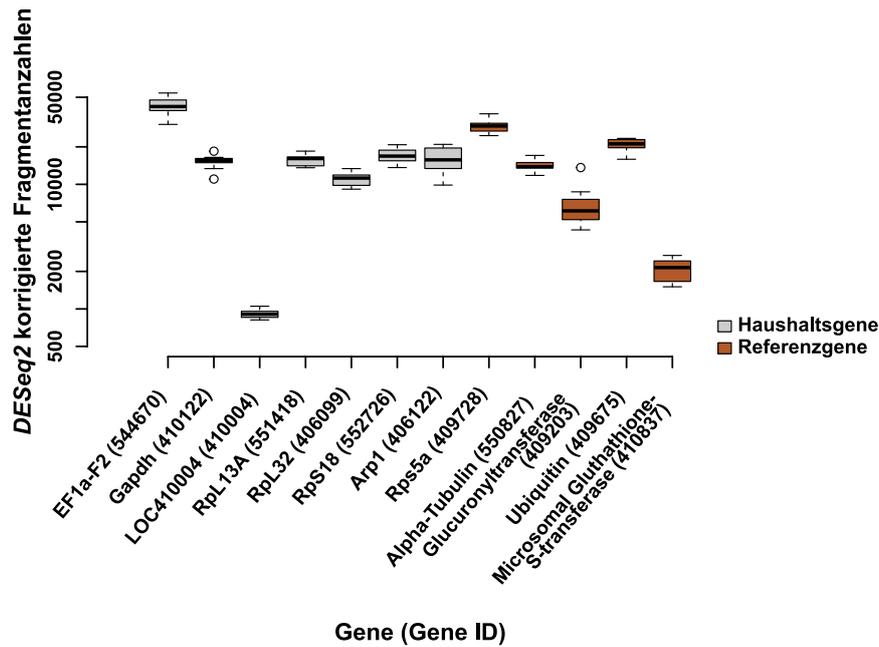


Abb. 20: Expressionslevel der Haushalts- und Referenzgene über alle Poolproben. Dargestellt sind die *DESeq2* normalisierten Fragmentanzahlen für die sieben ausgewählten Haushaltsgene (grau) und fünf Referenzgene (braun) als Kastengrafik mit Median (horizontaler Strich), Interquartilsabstand (IQA, Begrenzung des Kastens), Antennen sowie Ausreißern (definiert als $> 1,5 \times$ IQAs). Lediglich das Haushaltsgen *gapdh* (Gen ID 410122) wies einen signifikanten Ausreißer auf (analysiert mit dem Ausreißertest nach Grubbs, $p < 0,05$). Das Referenzgen *glucuronyltransferase* (Gen ID 409203) zeigte eine größere, jedoch nicht signifikante Varianz der gemessenen Expressionslevel als alle anderen getesteten Gene (analysiert mit Cochran-Mantel-Haenszel-Test, $p > 0,05$). Die Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Y. Pöschl (iDiv, Halle-Jena-Leipzig) durchgeführt.

3.3.2 Analyse der Genexpressionsmuster

Zur Bestimmung differentiell exprimierter Gene wurden die Transkriptome von *P. larvae*-infizierten Larven und der jeweiligen nicht-infizierten Kontrollgruppe mit Hilfe des Softwarepakets *DESeq2* (Bioconductor, (Love *et al.*, 2014)) verglichen. Der Vergleich erfolgte jeweils innerhalb der experimentellen Gruppen. In der experimentellen Gruppe I wurden *P. larvae* ERIC I-infizierte Larven mit nicht-infizierten Kontrolllarven verglichen (Abb. 21 A). Dementsprechend wurden in der experimentellen Gruppe II *P. larvae* ERIC II-infizierte Larven mit nicht-infizierten Kontrolllarven verglichen (Abb. 21 B). Die Anzahl und Amplitude differentiell exprimierter Gene (DEGs) wurde für beide experimentellen Gruppen bestimmt (Abb. 21). Es erfolgte der Vergleich der Mittelwerte der Expression (x-Achse) in Abhängigkeit von der Änderung der Expressionswerte (\log_2 fold change, lfc; y-Achse) einschließlich der Standardfehler, basierend aus der Kombination der Datensätze der biologischen Replikate, für beide experimentellen Gruppen. Differenziell hochregulierte Gene wiesen eine Änderung der Expression von $0 < \text{lfc} < 1$ und einen p-Wert $< 0,05$ auf ("+", orange), wogegen

differenziell herunterregulierte Gene eine Änderung der Expression von $0 > \text{Ifc} > -1$ und einen p-Wert $< 0,05$ aufwiesen ("-", blau). Zusätzlich erfolgte die Filterung von Genen die einen $\text{Ifc} > 1$ bzw. $\text{Ifc} < -1$ aufwiesen, diese Gene wurden als extrem regulierte Gene ("++", dunkelorange bzw. "--", dunkelblau) bezeichnet. Nicht differenziell regulierte Gene (non-DEG, grau) zeigten keine signifikante Änderung der Expression ($p > 0,05$) im Vergleich zur jeweiligen nicht-infizierten Kontrolle. Beide experimentellen Gruppen reagierten auf die Infektion mit *P. larvae* (Abb. 18 A, B). Im Vergleich der Anzahl der DEGs konnten jedoch signifikant mehr DEGs in der experimentellen Gruppe II beobachtet werden (Abb. 21 C, Kap. 8.2 Tab. Z2).

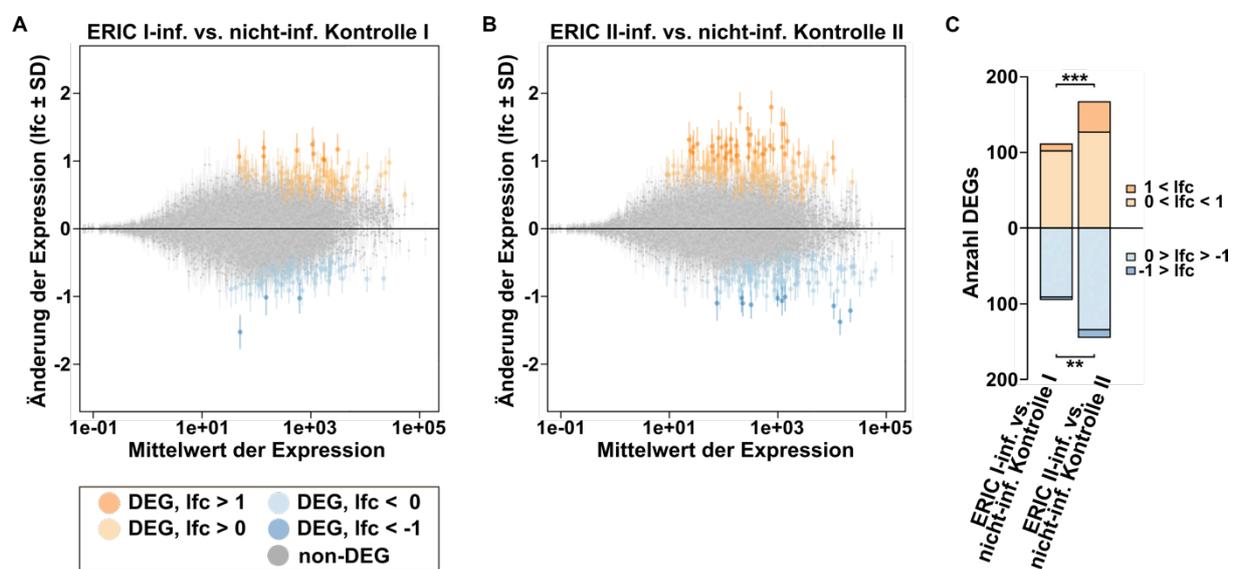


Abb. 21: Bestimmung differenziell exprimierter Gene (DEGs). (A+B) Vergleich der Mittelwerte der Expression aller untersuchten Gene (x-Achse) und deren Änderungen der Expression (y-Achse, $\text{Ifc} \pm \text{SD}$) der *P. larvae*-infizierten Gruppen mit der jeweiligen nicht-infizierten Kontrollgruppe. (A) Experimentelle Gruppe I: *P. larvae* ERIC I-inf. im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle. (B) Experimentelle Gruppe II: *P. larvae* ERIC II-inf. im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle. (C) Balkendiagramm der Anzahl der DEGs in den experimentellen Gruppen I und II. In der experimentellen Gruppe II konnten signifikant mehr DEGs gefunden werden. Die Anzahl der bestimmten DEGs wurde mit dem Chi-Quadrat-Test verglichen (siehe *** $p = 0,0008$, ** $p = 0,001$, Kap. 8.2 Tab. Z2). Die Änderung der Expressionswerte wird dargestellt als $\text{Ifc} \pm \text{SD}$. Hochregulierte DEGs ($0 < \text{Ifc} < 1$; $p < 0,05$) sind in orange hervorgehoben. Herunterregulierte DEGs sind in blau hervorgehoben ($0 > \text{Ifc} > -1$; $p < 0,05$). Extreme DEGs ($\text{Ifc} > 1$ bzw. $\text{Ifc} < -1$) sind in dunklerem orange bzw. blau gekennzeichnet. Gene die nicht differenziell exprimiert waren (non-DEG, $p > 0,05$) sind in grau dargestellt. Die Analyse erfolgte in Kooperation mit Dr. Y. Pöschl (iDiv, Halle-Jena-Leipzig).

Die signifikant höhere Anzahl von DEGs in der experimentellen Gruppe II ließ vermuten, dass der infizierende *P. larvae* Genotyp einen Einfluss auf die Immunantwort der Larve hat. Um dies genauer zu untersuchen, erfolgte die weitere Analyse ausgewählter Gene unter Berücksichtigung der Zuordnung zu bereits beschriebenen immunrelevanten Signalwegen der Honigbiene (Doublet *et al.*, 2017; Evans *et al.*, 2006). Hierbei erfolgte die Unterscheidung zwischen intermediären Signalkomponenten der verschiedenen Signalwege und regulierten Effektoren wie antimikrobiellen Peptiden (AMPs) (Abb. 22). Insgesamt waren wenige Gene der intermediären Signalkomponenten differenziell exprimiert.

In *P. larvae* ERIC II-infizierten Larven waren die zur Apoptose zugehörigen Gene, kodierend für Homologe des *death-associated-protein-1* und *caspase-1*, signifikant hochreguliert und der *apoptosis inducing factor (aif)*, welcher bei der Initiierung eines Caspase-unabhängigen Apoptose-Signalwegs beteiligt ist, signifikant herunterreguliert. In ERIC I-infizierten Larven konnten für den Apoptose-Signalweg dagegen keine signifikant regulierten Gene gefunden werden. Im RNAi-Signalweg war das Gen *tudor-sn protein (tudor-sn)* in beiden experimentellen Gruppen signifikant herunterreguliert. Im Gegensatz dazu waren die Transkripte des Gens kodierend für FMR1 (fragile X mental retardation syndrome-related protein 1) ausschließlich in ERIC I-infizierten Larven signifikant herunterreguliert. Keine intermediären Signalkomponenten des JAK/STAT-Signalwegs waren differentiell reguliert (siehe Kap. 8.2, Tab. Z3).

Im Toll- und Imd/JNK-Signalweg waren jeweils drei Gene signifikant differentiell exprimiert. Im Toll-Signalweg waren die Gene *serine protease 14 (sp14)* und *petidoglycan recognition protein s2 (pgrp-s2)* ausschließlich in ERIC II-infizierten Larven signifikant hochreguliert, wogegen *cact2*, Inhibitor des kappaB-Orthologs Cactus 2, in beiden experimentellen Gruppen signifikant hochreguliert war. Für *dorsal*, den sequenzspezifischen Transaktivator der AMP Genexpression, konnte keine transkriptionelle Regulation beobachtet werden. Für den Imd/JNK-Signalweg waren die Gene kodierend für den Rel/ NF-κB Transkriptionsfaktor *relish* und den Transkriptionsfaktor *kayak*, Homolog des humanen Protoonkogens *c-Fos*, ausschließlich in ERIC II-infizierten Larven signifikant hochreguliert. Die Expression des Jun-related antigen (*jra*) war in beiden experimentellen Gruppen signifikant hochreguliert. Bei allen anderen Genen konnte keine differentielle Expression in den experimentellen Gruppen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Die Expression der Mehrheit der Gene, die intermediäre Signalkomponenten kodieren, war einheitlich, was nahe legt, dass diese Komponenten bei einer Infektion eher nicht transkriptionell reguliert werden.

Im Gegensatz dazu ist für antimikrobielle Effektorgene eine transkriptionelle Regulierung bekannt. Insgesamt waren 6 von 10 Effektoren signifikant differentiell exprimiert, wobei wesentlich mehr Gene in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle II signifikant hochreguliert waren. Die für Abaecin, Apidaecin 1, Apidaecin 73 und Hymenotaecin kodierenden Gene waren signifikant in ERIC II-infizierten Larven

hochreguliert. Die Expression von Defensin 1 war in beiden experimentellen Gruppen stark hochreguliert, wobei nur bei einer Infektion mit *P. larvae* ERIC I eine signifikante Hochregulierung im Vergleich zur Kontrolle I beobachtet werden konnte. Eine signifikante Hochregulierung konnte ebenfalls für Lysozyme 3 in der experimentellen Gruppe I beobachtet werden. Keine differentielle Regulation konnte für die Effektoren Apisimin, Lysozyme 1, Lysozyme 2 und die Prophenoloxidase beobachtet werden.

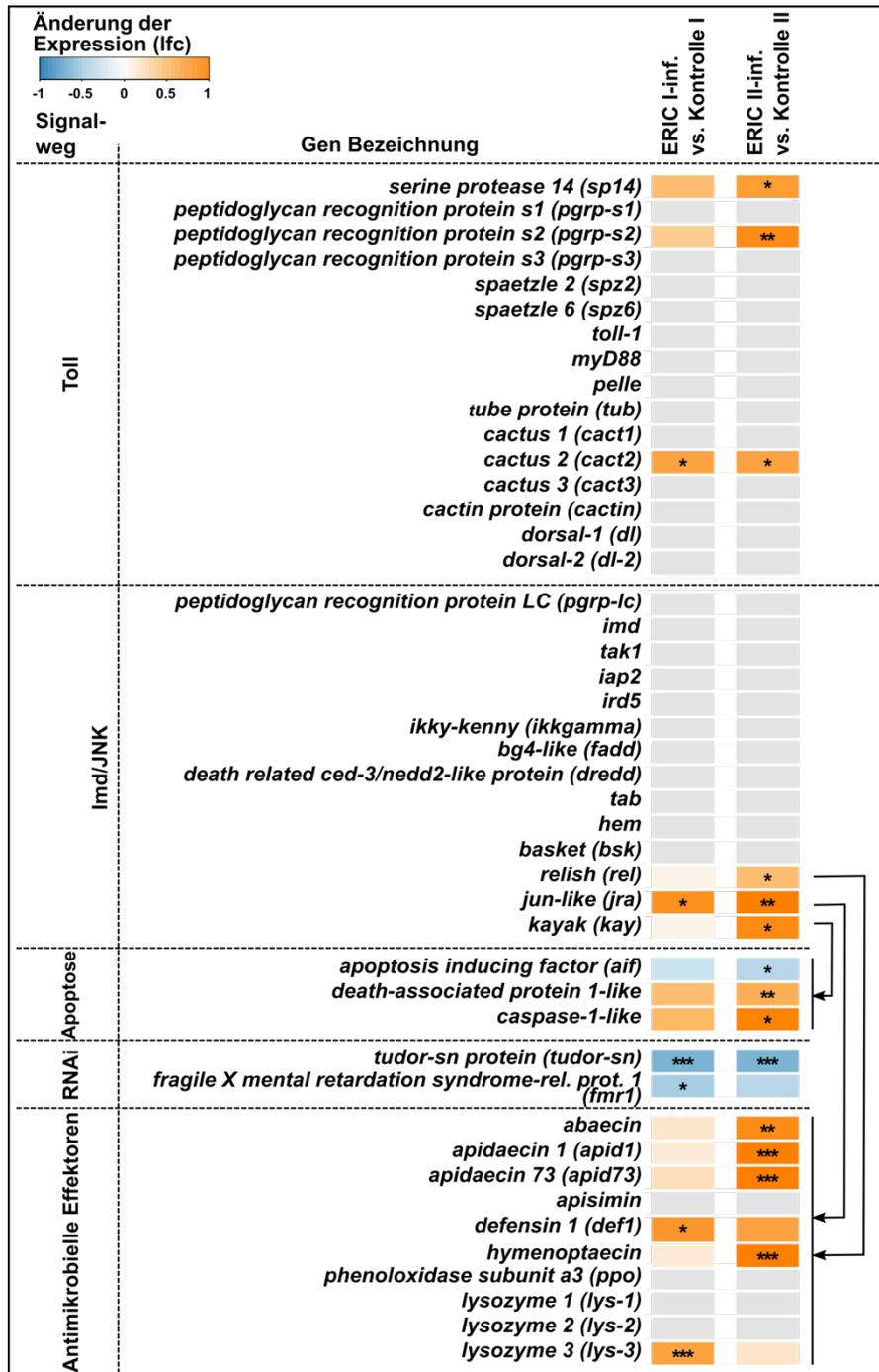


Abb. 22: Vergleich der Veränderung der Expression ausgewählter Gene, unter Berücksichtigung der Zugehörigkeit zu bereits beschriebenen immunrelevanten Signalwegen. Die Änderung der Expression (lfc) ausgewählter Gene wurde in ERIC I-infizierten Larven im Vergleich zur Änderung der Expression in nicht-infizierten Larven der Kontrolle I betrachtet. Die Änderung der Expression ausgewählter Gene wurde ebenfalls in ERIC II-infizierten Larven mit der nicht-infizierten Kontrolle II verglichen. Es erfolgte die Unterscheidung zwischen intermediären Signalkomponenten und regulierten Effektoren (antimikrobielle Peptide, AMPs). Dargestellt sind die Änderungen der Expression in lfc (log₂ fold change), wobei hochregulierte Gene (lfc > 0) in orange, herunterregulierte Gene (lfc < 0) in blau und nicht-regulierte Gene in grau dargestellt sind. Signifikant unterschiedlich exprimierte Gene im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit *** ($p \leq 0,001$), ** ($p \leq 0,01$) oder * ($p \leq 0,05$) gekennzeichnet (Benjamini-Hochberg korrigierter p -Wert). Die Aktivität der

Transkriptionsfaktoren ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Analyse erfolgte in Kooperation mit Dr. Y. Pöschl (iDiv, Halle-Jena-Leipzig).

3.3.3 Verifizierung der Genexpressionsmuster

Um die bioinformatischen Ergebnisse der RNA-Seq-Datenanalyse zu verifizieren, erfolgte die Bestimmung der mRNA-Level von sieben ausgewählten immunrelevanten Genen mittels qPCR in RNA aus individuellen Larven (Kap. 2.7.6.). Hierfür wurden Larven aus drei unabhängigen Replikaten aus Larveninfektionsversuchen entnommen (Abb. 9 C, g-i), die RNA aufgereinigt und diese in cDNA umgeschrieben. Die Berechnung der Genexpression erfolgte mit qbase (Biogazelle) in kalibrierten normalisierten relativen Einheiten (*calibrated normalized relative quantities*, CNRQ). Nach Normalisierung gegen fünf Referenzgene (ATu, Glu, MGS, RPS5, Ubi, siehe auch Tab. 10), wurden die Daten logarithmiert (\log_2 transformiert) und die statistische Auswertung erfolgte anschließend in GraphPad Prism. Die Auswahl einer ausreichenden Anzahl von Referenzgenen und die Abdeckung der verschiedenen Genexpressionslevel ermöglicht die Erhebung verlässlicher Daten, eine valide Normalisierung und damit eine valide Einordnung hoch- bzw. herunterregulierter Gene (Hellemans *et al.*, 2007). Im Vergleich der mRNA-Level ERIC I-infizierter Larven und nicht-infizierter Kontrolllarven war die Expression von *defensin 1* signifikant hochreguliert. Bei den Effektorgenen *abaecin*, *apidaecin 73* und *hymenoptaecin* konnte keine differentielle Regulation von ERIC I-infizierten Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle I festgestellt werden (Abb. 23, Tab. 16). Im Gegensatz dazu konnten in der experimentellen Gruppe II signifikant höhere mRNA-Level für *abaecin*, *apidaecin 73*, *defensin 1* und *hymenoptaecin* in *P. larvae* ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle II gemessen werden. Die Gene der intermediären Signalkomponenten *myD88* und *dorsal 1* zeigten in beiden experimentellen Gruppen keine unterschiedliche Regulation im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (Tab. 16). Für *apisimin* konnte, wie auch in der Analyse der RNA-Seq-Daten, in keiner der beiden experimentellen Gruppen eine signifikant unterschiedliche Regulation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle festgestellt werden. Die Ergebnisse der qPCR bestätigten die in der bioinformatischen Analyse der RNA-Seq-Daten bereits beobachtete Hochregulation von *defensin 1* in ERIC I-infizierten Larven im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrolllarven. Außerdem konnte die Hochregulation von *abaecin*, *apidaecin 73* und *hymenoptaecin* in ERIC II-inf. Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle in der qPCR bestätigt werden (Abb. 23, Tab. 16).

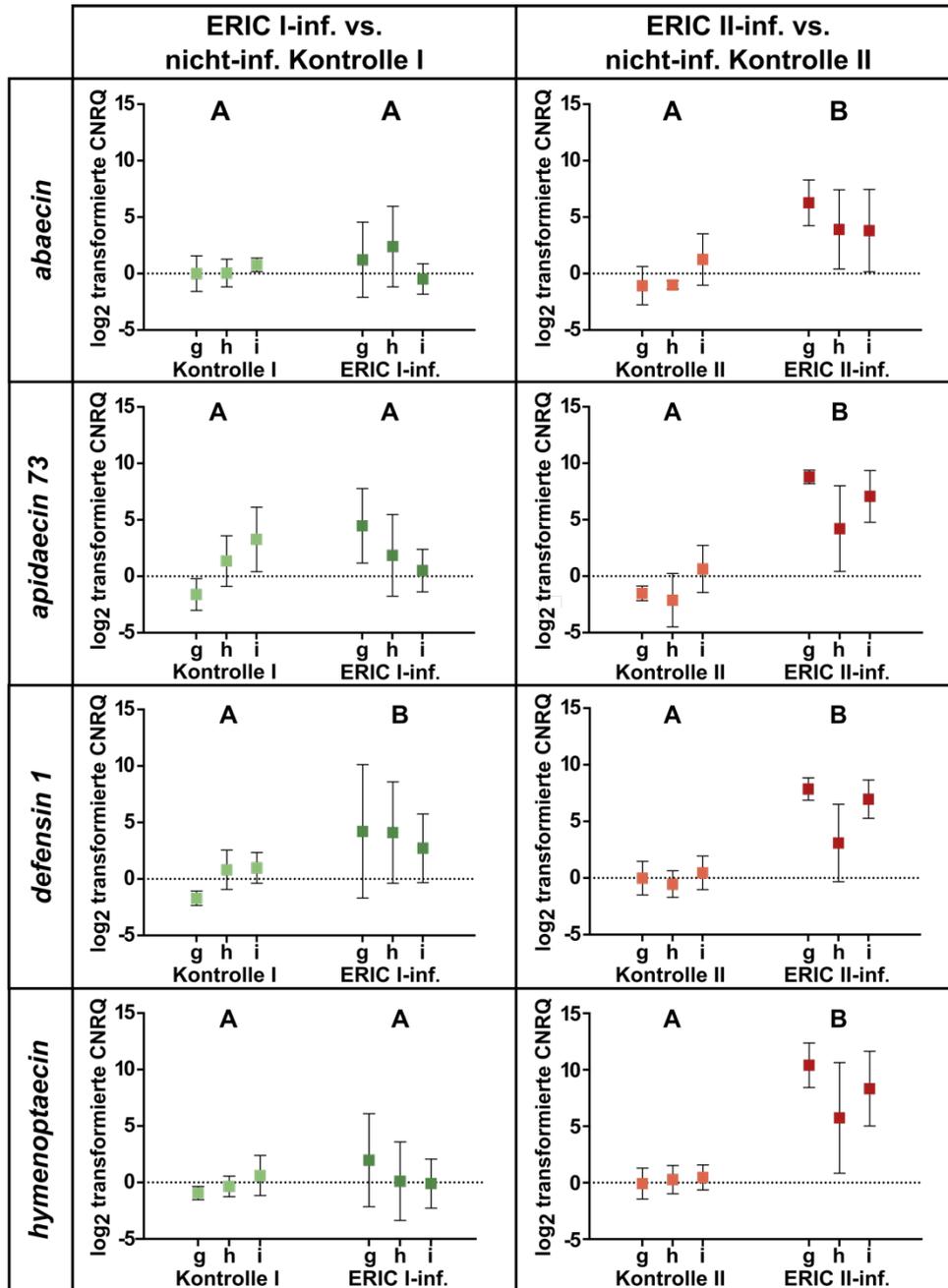


Abb. 23: Verifizierung der bioinformatischen Ergebnisse der RNA-Seq-Daten mittels qPCR. Verglichen wurde die Genexpression individueller Larven infiziert mit ERIC I mit der nicht-infizierten Kontrolle I, und ERIC II-infizierten Larven mit nicht-infizierten Kontrolllarven. Dargestellt sind die log₂ transformierten CNRQs (*calibrated normalised relative quantities*) ausgewählter immunrelevanter Effektorgene. Die farblich hervorgehobenen Quadrate markieren die Mittelwerte ±SD der Expression der jeweilige Gene aus 3 individuell untersuchten Larven aus 3 unabhängigen Gruppen (g-i). Die gemessene Expression der verschiedenen Gene wurde gegen fünf Referenzgene normalisiert. Gruppen die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant, während Gruppen mit gleichen Buchstaben sich nicht signifikant unterscheiden. Die Analyse erfolgte mit One-way ANOVA, gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur mit $\alpha < 0,05$.

Tab. 16: Vergleichende Übersicht der Ergebnisse aus der RNA-Seq und der qPCR. Verglichen wurde die Expression sieben ausgewählter immunrelevanter Gene in der experimentellen Gruppen I (ERIC I-inf. vs. nicht-infizierte Kontrolle I) und der experimentellen Gruppe II (ERIC II-inf. vs. nicht-infizierte Kontrolle II). Die Ergebnisse sind für jedes Gen und den Vergleich innerhalb einer experimentellen Gruppe aufgelistet. Die Änderung der Expression der Gene ist angegeben in lfc (\log_2 fold change) und wurde für die qPCR mit qbase berechnet, gegen fünf Referenzgene normalisiert, anschließend transformiert (\log_2) und mit GraphPad Prism ausgewertet. Die entsprechenden lfc der RNA-Seq wurden mit *DESeq2* berechnet und ausgewertet. Das Ausgangsmaterial der RNA-Seq war gepoolte RNA, wogegen die qPCR mit RNA aus individuellen Larven durchgeführt wurde. Mit * gekennzeichnet sind signifikant unterschiedlich regulierte Gene (adj. *p*-Wert, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p \leq 0,05$, - $p > 0,05$).

| Bezeichnung (Gen ID) | ERIC I-inf. vs. nicht-infizierte Kontrolle I | | | | ERIC II-inf. vs. nicht-infizierte Kontrolle II | | | |
|----------------------------------|---|-------------------------------|---------------|--------------------------------|---|-------------------------------|---------------|--------------------------------|
| | RNA-Seq (lfc) | Seq Adj. <i>p</i> -Wert | qPCR (lfc) | qPCR Adj. <i>p</i> -Wert | RNA-Seq (lfc) | Seq Adj. <i>p</i> -Wert | qPCR (lfc) | qPCR Adj. <i>p</i> -Wert |
| <i>myD88</i> (413194) | -0,01 | - | 0,72 | - | 0,21 | - | 1,40 | - |
| <i>dorsal 1</i> (406086) | -0,18 | - | 0,36 | - | 0,11 | - | 0,57 | - |
| <i>abaecin</i> (406144) | 0,19 | - | 1,05 | - | 0,88 | ** | 4,66 | **** |
| <i>apidaecin 73</i> (406115) | 0,24 | - | 2,28 | - | 1,26 | *** | 6,69 | **** |
| <i>apisimin</i> (406093) | 0,12 | - | 0,9 | - | -0,47 | - | 0,76 | - |
| <i>defensin 1</i> (406143) | 0,76 | * | 3,68 | * | 0,66 | - | 5,97 | **** |
| <i>hymenoptaecin</i> (406142) | 0,12 | - | 0,67 | - | 1,55 | *** | 8,16 | **** |

Die bioinformatische Analyse der RNA-Seq-Daten aus RNA Poolproben und die Ergebnisse der qPCR aus RNA individueller Larve zeigten, dass es unterschiedliche Reaktionen in *P. larvae* ERIC I-infizierten Larven und in *P. larvae* ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur jeweiligen nicht-infizierten Kontrolle gab. Die unterschiedliche Immunreaktion der Larven könnte mit den unterschiedlichen Pathogenesestrategien der beiden Genotypen zusammenhängen (Kap. 4.2.3). Das für Genotyp *P. larvae* ERIC II-spezifische S-layer Protein SplA (Poppinga *et al.*, 2012) vermittelt die Adhäsion an das Larvendarmepithel und ist ein relevanter Virulenzfaktor für diesen Genotyp. Der Genotyp *P. larvae* ERIC I exprimiert AB-Toxine (Fünfhaus *et al.*, 2013) und attackiert das Mitteldarmepithel der Larve aus der Entfernung ohne direkten Kontakt zwischen dem Bakterium und den Zellen des Darmepithels. Die Entdeckung einer Infektion mit *P. larvae* ERIC I ist für das Immunsystem der Larve somit erschwert. Das ERIC II-spezifische S-layer Protein scheint geeigneter zu sein, um den Einfluss der verschiedenen Pathogenesestrategien auf die Immunreaktion der Larve genauer zu untersuchen. Für den Knockout konnte bereits gezeigt werden, dass ohne Expression des S-layer Protein keine Adhäsion an das Mitteldarmepithel der Larve mehr möglich ist (Poppinga *et al.*, 2012). Um zu untersuchen, ob die Expression des S-layer Proteins SplA allein die Pathogenesestrategie von *P. larvae* ERIC II auslösen kann, wurden mit der in dieser Arbeit konstruierten Mutante ERIC I+*spIA* (ATCC9545+*spIA*) zusätzliche Gruppen in den Larveninfektionsversuchen infiziert (Kap. 2.6). Aus 3 unabhängigen Larveninfektionsversuchen wurden Larven infiziert mit ERIC I+*spIA* und ERIC II Δ *spIA* an Tag drei nach Infektion entnommen und aus diesen RNA isoliert. Nach Synthese der cDNA erfolgte ebenfalls die Bestimmung der mRNA-Level von sieben ausgewählten immunrelevanten Genen. Nach Berechnung und Normalisierung (gegen fünf Referenzgene) der gemessenen CNRQs, erfolgte die statistische Auswertung der logarithmierten Daten in GraphPad Prism. Im Vergleich der mRNA-Level von ERIC I+*spIA*-infizierten Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle I, konnte für keines der untersuchten Gene ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Für Larven die mit der ERIC II Δ *spIA* Knockout-Mutante infiziert waren, konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Level der untersuchten Gene im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 24).

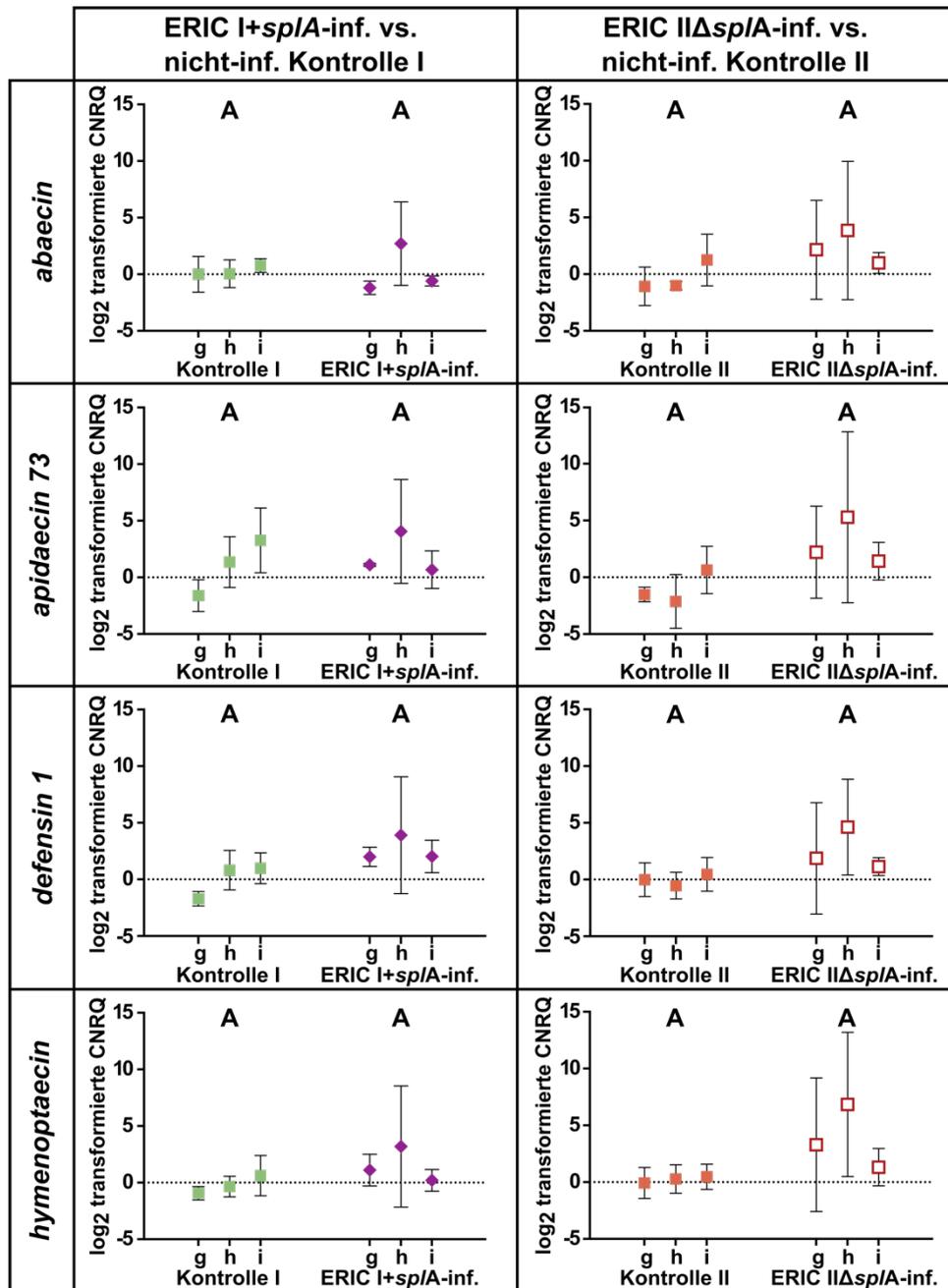


Abb. 24: Untersuchung der Genexpression ausgewählter immunrelevanter Gene in individuellen Larven infiziert mit der Mutante ERIC I+*spA* bzw. dem Knockout ERIC IIΔ*spA*. Dargestellt sind die log₂ transformierte CNRQ (*calibrated normalised relative quantities*) ausgewählter immunrelevanter Effektorgene normalisiert gegen fünf Referenzgene. Die farblich hervorgehobenen Quadrate markieren die Mittelwerte ± SD der Expression der jeweilige Gene aus 3 individuell untersuchten Larven aus 3 unabhängigen Gruppen (g-i). Gruppen die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant, während Gruppen mit gleichen Buchstaben sich nicht signifikant unterscheiden. Die Analyse erfolgte mit One-way ANOVA, gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur mit $\alpha < 0,05$.

3.3.4 Platteninhibitionsassay

Um die Wirksamkeit der Immunantwort der Larve gegen *P. larvae* und andere Bakterienstämme zu testen wurden Platteninhibitionsassays durchgeführt. Hierfür wurden Agarplatten mit verschiedenen Bakterien (Tab. 12, Tab. 14) beimpft und synthetisch hergestellte AMPs der Biene, Abaecin bzw. Hymenoptaecin, in gestanzte Löcher eingefüllt und inkubiert. Lediglich bei Agarplatten beimpft mit *E. coli* DH5 α (gramnegativ) konnte ein Hemmhof nach Inkubation mit 125 μ M Hymenoptaecin beobachtet werden (Abb. 25). Bei allen getesteten grampositiven Bakterien (Tab. 12, Tab. 14), einschließlich *P. larvae* ATCC9545 (ERIC I) und DSM25430 (ERIC II), konnte keine Hemmung des Bakterienwachstums durch Abaecin oder Hymenoptaecin beobachtet werden.

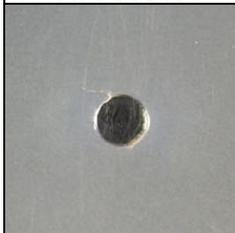
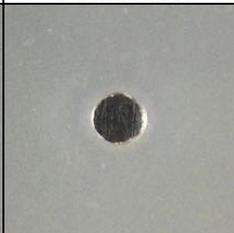
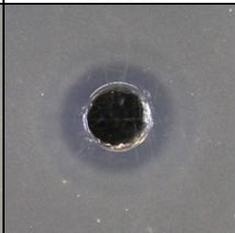
| Hymenoptaecin | | |
|--|--|---|
| <i>P. larvae</i> ATCC9545 | <i>P. larvae</i> DSM25430 | <i>E. coli</i> DH5 α |
|  |  |  |
| - | - | + |

Abb. 25: Platteninhibitionsassay mit Hymenoptaecin gegen verschiedene Bakterien. Agarplatten wurden mit *P. larvae* ATCC9545 (ERIC I), *P. larvae* DSM25430 (ERIC II) oder *E. coli* DH5 α beimpft und Löcher mit einer Pipettenspitze gestanzt. Die gestanzten Löcher wurden mit einem Gemisch aus 125 μ M Hymenoptaecin und Medium befüllt und über 48 h bei 37°C inkubiert. Lediglich beim gramnegativen Bakterium *E. coli* DH5 α konnte ein Hemmhof beobachtet werden.

4. Diskussion

4.1. Rolle von zwei gezeigten Virulenzfaktoren

4.1.1 Das chitinbindende und -abbauende Protein *PICBP49*

Im Jahr 2014 wurde das chitinbindende und -abbauende Protein *PICBP49* als zentraler Virulenzfaktor von *P. larvae* identifiziert, welcher im Bienenlarvendarm die chitinreiche peritrophe Matrix (PM) abbaut (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c). *PICBP49* wird von *P. larvae* Genotyp ERIC I als auch ERIC II exprimiert. Die PM ist die erste Barriere für vegetative *P. larvae* Bakterien, die es zu überwinden gilt, bevor das Darmepithel angegriffen und zerstört werden kann (Yue *et al.*, 2008). Der Abbau der PM ist ein entscheidender Schritt in der Pathogenese einer Infektion mit *P. larvae* und stellt den Übergang von der nicht-invasiven zur invasiven Lebensphase des Erregers dar (Yue *et al.*, 2008). Der genaue Mechanismus des Chitinabbaus durch *PICBP49* ist bis jetzt unklar und beinhaltet Zwischenschritte für die Pathogenese von *P. larvae*, welche Interventionspunkte im Verlauf einer Erkrankung darstellen könnten. Die PM konnte bereits als Ziel für Pathogene identifiziert werden und die Verhinderung des Abbaus als Interventionsmaßnahme wurde diskutiert (Hegedus *et al.*, 2009; Langer & Vinetz, 2001; Terra, 2001). Auch bei Infektionen mit *P. larvae* wurde die PM schon lange als Schutzschicht vermutet (Bamrick, 1964; Bamrick, 1967; Davidson, 1970) und es konnte gezeigt werden, dass die PM bei infizierten Larven fehlt (Yue *et al.*, 2008), wobei der Virulenzfaktor *PICBP49* eine entscheidende Rolle beim Abbau spielt (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c).

Ziel dieser Arbeit war es *PICBP49* weiter zu charakterisieren und damit zusätzliche Details des Abbaus der PM aufzuklären. Strukturelle Gemeinsamkeiten von *PICBP49* mit Mitgliedern der AA10 Familie (Auxiliary Activity Family 10, früher CBM33) lytischer Polysaccharid-Monooxygenasen (LPMOs) konnten bereits gezeigt werden (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c). Diese strukturellen Gemeinsamkeiten zur AA10 Familie legen nahe, dass *PICBP49* das Chitin in der PM auch über einen metallionen-abhängigen oxidativen Mechanismus abbaut, wie dies für weitere Mitglieder dieser Familie gezeigt wurde (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Eines der am besten charakterisierten Proteine von Mitgliedern der AA10 Familie ist CBP21, welches von *Serratia marcescens* sezerniert wird. Dieser gramnegative Bodenkeim wurde für viele Organismen, wie Pflanzen, Reptilien, Insekten und Säugetieren (Flyg *et al.*, 1980; Grimont & Grimont, 1978; Grimont *et al.*, 1979; Hejazi & Falkiner, 1997; Kurz *et al.*, 2003; Mahlen, 2011; Nehme *et al.*, 2007) auch als Pathogen beschrieben. CBP21 könnte also auch beim Abbau der chitinhaltigen PM in Insekten eine

entscheidende Rolle spielen. In *Drosophila melanogaster* konnte bereits gezeigt werden, dass es in Stämmen, in denen ein integrales Protein der PM (*Drosocrystallin*) ausgeschaltet wurde, zu einer erhöhten Permeabilität der PM kommt und eine höhere Anfälligkeit für eine orale Infektion mit *S. marcescens* besteht (Kuraishi *et al.*, 2011). Bei einer oralen Infektion mit *S. marcescens* ist die Integrität der PM also von entscheidender Bedeutung und deren Abbau, wie auch bei PICBP49 von *P. larvae*, vermutlich ein Teil der Pathogenese-strategie des Erregers.

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung von PICBP49 orientierte sich die Klonierung, Aufreinigung sowie weiterführende Assays an der bereits für CBP21 von *S. marcescens* beschriebenen Herangehensweise (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005b). PICBP49 konnte erfolgreich heterolog in *E. coli* (recPICBP49) exprimiert werden (Kap. 2.4.2,3.1). Im Gegensatz zu CBP21 konnte mit dem von Vaaje-Kolstad und Kollegen (2005) beschriebenen Protokoll recPICBP49 nicht in *E. coli* überexprimiert werden. Um für weitere Untersuchungen ausreichend Protein gewinnen zu können, erfolgte eine Adaptation der Kultivierungsbedingungen. Mit größeren Kulturvolumina und Hochdurchsatz-Kultivierung in einem Bioreaktor (LEX-48 High Throuput Bioreactor System, Harbinger Biotechnology and Engineering, Canada) wurde ausreichend Protein gewonnen.

Nach Anpassung des Aufreinigungsprotokolls von CBP21 für recPICBP49 (Kap. 2.5.2) wurde zunächst ein präferiertes Substrat bestimmt (Kap. 3.1.1). Für CBP21 als auch PICBP49 ist bereits bekannt, dass diese in der Lage sind Chitin abzubauen (Aachmann *et al.*, 2012; Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013; Neuendorf *et al.*, 2004; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Als chitinhaltige Substrate sind vor allem α -Chitin aus Krebstieren (Crustacea) und β -Chitin aus dem Schulp von Tintenfischen (Cephalopoden) kommerziell erhältlich. Die Unterschiede der verschiedenen Chitine ergeben sich aus der Anordnung der Grundbausteine. Die Bausteine des Chitins, β -1,4-*N*-Acetylglucosamine (GlcNAc), sind im α -Chitin in antiparallelen Polysaccharidketten angeordnet, hierbei entstehen starke intra- und intermolekulare Bindungen. Im β -Chitin sind die Polysaccharidketten aus GlcNAcs parallel angeordnet, zwischen diesen entstehen eher schwache intramolekulare Bindungen. Das in Insekten vorhandene γ -Chitin, welches kaum kommerziell erhältlich ist, weist jeweils zwei parallele und eine antiparallele Polysaccharidketten auf (Jang *et al.*, 2004; Kurita, 2006).

Für die Bestimmung eines bevorzugten Substrats von chitinbindenden Proteinen (CBPs) wurden meist α -Chitin, β -Chitin und/oder kolloidales Chitin getestet (Chu *et al.*, 2001; Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013; Mehmood *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 1998; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2012). Da bereits gezeigt wurde, dass PICBP49 kolloidales Chitin abbaut (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013) wurden in der vorliegenden Arbeit α -Chitin, β -Chitin sowie Chitin Resin (New England Biolabs) als Substrate getestet. Hierfür erfolgte die Inkubation von recPICBP49 mit den Substraten (Kap. 3.1.1). RecPICBP49 zeigte eine bevorzugte Bindung an β -Chitin, welches das präferierte Substrat zu sein scheint, direkt gefolgt von der Bindung

an α -Chitin (Abb. 12). Diese Ergebnisse decken sich mit der für CBP21 von *S. marcescens* beobachteten bevorzugten Bindung an β -Chitin (Suzuki *et al.*, 1998). Obwohl β -Chitin maritimer Herkunft (Schulp von Tintenfischen, Cephalopoden) ist, scheint es ein bevorzugtes Substrat für CBPs verschiedener Bakterien zu sein (Manjeet *et al.*, 2013; Mehmood *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 1998). Dies liegt vermutlich an der besseren Zugänglichkeit des Substrats (Kurita, 2006; Purushotham *et al.*, 2012). Neben der bevorzugten Bindung an β -Chitin ist die Bindung weiterer Chitine, wie zum Beispiel α -Chitin, nicht ungewöhnlich (Chu *et al.*, 2001; Manjeet *et al.*, 2013; Mehmood *et al.*, 2011; Mekasha *et al.*, 2016; Moser *et al.*, 2008; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2012).

Bei allen getesteten Substraten konnten Doppelbanden beobachtet werden (Abb. 12). Mittels Massenspektrometrie konnte bestätigt werden, dass es sich bei der unteren Bande um recPICBP49 mit N-terminaler CBM33 (AA 10) Domäne, 2 Fibronectin (FN) Typ-III-ähnlichen Domänen handelt, jedoch fehlte die CBM5/12 Domäne. Die CBM5/12 Domäne ist bereits für andere chitinbindende Proteine, wie Cbp50 von *Bacillus thuringiensis* (Mehmood *et al.*, 2011) und LmLPMO10 von *Listeria monocytogenes* (Paspaliari *et al.*, 2015), beschrieben und spielt neben der CBM33 (AA10) Domäne und den FN-III-ähnlichen Domäne eine Rolle bei der Bindung an Chitin (Cantarel *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 2000; Mehmood *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 1994). Der Verlust der CBM5/12 Domäne geschah vermutlich durch suboptimale Aufreinigungs- und/oder Lagerungsbedingungen. Die fehlende CBM5/12 Domäne schien für PICBP49 nur einen geringen Verlust der chitinbindenden Eigenschaften an β -Chitin zu bewirken. Trotz der fehlenden Domäne konnte weiterhin die chitinbindende und -abbauende Wirkung von recPICBP49 in Inkubationsversuchen beobachtet und mittels qualitativer (MALDI-TOF Kap. 2.5.5) und quantitativer (HPLC, Kap. 2.5.6) Methoden belegt werden. Zu beachten ist, dass durch den Verlust der CBM5/12 Domäne die erhaltenen Ergebnisse nur teilweise die chitinbindenden Eigenschaften von PICBP49 wiedergeben. In weiteren Versuchen müssen die Aufreinigungs- und Lagerbedingungen optimiert werden, um den Verlust der CBM5/12 Domäne zu verhindern. Die Gewinnung und Aufreinigung von PICBP49 aus *P. larvae*-Kulturüberstand wäre eine weitere Möglichkeit, um Strukturveränderungen des Proteins zu vermeiden. In ersten Versuchen konnte PICBP49 aus *P. larvae* aufgereinigt werden und trotz einer pH Veränderung, um PICBP49 vom Substrat (Chitin Resin) zu eluieren, konnte ausschließlich eine Bande korrekter Größe in SDS-PAGE-Analysen beobachtet werden (zusätzliche Abb. A4).

Nachdem β -Chitin als präferiertes Substrat für recPICBP49 bestimmt wurde, erfolgte die quantitative und qualitative Untersuchung der oxidierten Abbauprodukte (Kap. 2.5.5, 2.5.6, 3.1.2). Die Quantifizierung erfolgte mittels hydrophiler Interaktionschromatographie beispielhaft am oxidierten Hexamer, welches bereits bei anderen Mitgliedern der AA10 Familie lytischer Polysaccharid-Monooxygenasen (LPMOs) als eines der Hauptabbauprodukte beschrieben wurde (Mekasha *et al.*, 2016; Paspaliari *et al.*, 2015; Vaaje-Kolstad *et*

al., 2012; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Die Menge an oxidiertem Hexamer wurde nach 2 h Inkubation von *recPICBP49* mit β -Chitin im pH-Bereich von pH 6-pH 11 bestimmt (Abb. 13 A). Der Substratumsatz an oxidiertem Hexamer war bei pH 7 signifikant höher als bei allen anderen getesteten pHs. Auch für CBP21 wurde die beste Bindung an β -Chitin bei pH 7 bereits beschrieben (Suzuki *et al.*, 1998). Dieses Ergebnis betont die Ähnlichkeit zu CBP21 und lässt vermuten, dass weitere Ähnlichkeiten beim Abbau von Chitin bestehen. Durch die Auswertung des Substratumsatzes anhand des oxidierten Hexamers wurde nicht der gesamte Substratumsatz durch *recPICBP49* berücksichtigt. In weiteren Versuchen sollte eine Quantifizierung aller oxidierten Produkte erfolgen, um einen vollständigen Eindruck des Substratumsatzes zu erhalten und diesen mit anderen Mitgliedern der AA 10 Familie LPMOs vergleichen zu können. Zur Bestimmung der geeigneten Inkubationszeit erfolgte der Vergleich der umgesetzten Menge an oxidiertem Hexamer über eine Zeit von 6 h. Nach einer Inkubationszeit von 2 h konnte im Vergleich signifikant mehr oxidiertes Hexamer festgestellt werden als nach 0,5 h. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 6 h brachte keine signifikante Erhöhung im Substratumsatz (Abb. 13 B). Abschließend erfolgte die Analyse des Produktprofils von *recPICBP49* nach 2 h Inkubation mit β -Chitin bei pH 7 mittels hydrophiler Interaktionschromatographie. Eine größere Menge geradzahlig oxidierter Produkte (A4ox, A6ox) konnte festgestellt werden (Abb. 14). Das Überwiegen geradzahlig oxidierte Produkte im Produktprofil wurde bereits für mehrere Mitglieder der AA10 Familie berichtet (Mekasha *et al.*, 2016; Nakagawa *et al.*, 2015; Paspaliari *et al.*, 2015; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Dies steht in Zusammenhang mit der doppelten Schraubenachse des kristallinen Substrats, da nur jede zweite Zuckereinheit des Chitins für den Abbau zugänglich ist (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Die Untersuchung der oxidierten Abbauprodukte unterstreichen die Ähnlichkeiten im Substratabbau zu CBP21 und bestärken die Hypothese, dass *PICBP49* Chitin ebenfalls über einen oxidativen, metallionen-abhängigen Mechanismus abbaut.

Neben den Gemeinsamkeiten in der Enzymkinetik ist auch die Expression chitinbindender Proteine (CBPs) während der Kultivierung ein interessanter Aspekt, der weiteren Aufschluss zur Funktion und Wirkungsweise geben kann. Proteine mit ähnlicher Struktur wie *PICBP49*, wie beispielsweise CBP21 von *S. marcescens* (Suzuki *et al.*, 1998; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005b), Chb von *Bacillus amyloliquefaciens* (Chu *et al.*, 2001) und CHB1-3 von *Streptomyces spp.* (Kolbe *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2001; Schnellmann *et al.*, 1994), werden produziert, sobald Chitin während der Kultivierung als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht. Die Expression von *PICBP49* in *P. larvae*-Kulturüberständen dagegen erfolgt kontinuierlich (Garcia-Gonzalez, 2012) und nicht erst wenn ausschließlich Chitin als Kohlenstoffquelle vorhanden ist. Dies wurde bestätigt durch *in vivo* Versuche, die zeigten, dass *PICBP49* bereits zu Beginn einer Infektion im Larvendarm präsent ist und es im Verlauf der Pathogenese einer Infektion mit *P. larvae* zu einer Steigerung der Expression von *PICBP49* kommt (Garcia-Gonzalez, 2012). Nach erfolgter Aufnahme von *P. larvae* Sporen

über das Futter keimen diese im Larvendarm aus. *P. larvae* lebt zunächst als Kommensale vom zuckerhaltigen Larvenfutter (Genersch, 2010; Neuendorf *et al.*, 2004). Es kommt zur massiven Vermehrung der vegetativen Bakterien bis diese den Larvendarm komplett ausfüllen (Yue *et al.*, 2008). Ab einem bestimmten Zeitpunkt kommt es zur Nahrungsknappheit. Eine mögliche weitere Versorgung der Bakterien könnte durch den Abbau der peritrophen Membran (PM) durch *PICBP49* erfolgen (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c), wie dies bereits für chitinbindende und -abbauende Proteine anderer Bakterien beschrieben ist (Bhattacharya *et al.*, 2007; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2012). Neben der möglichen Deckung des Nährstoffbedarfs dient *PICBP49* dem Abbau der chitinhaltigen PM (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c), der ersten Barriere, die es für *P. larvae* zu überwinden gilt. Mit dem Abbau der PM wird *P. larvae* der Übergang in die invasive Lebensphase möglich (Yue *et al.*, 2008) und Virulenzfaktoren (z.B. Toxine für ERIC I, *SplA* für ERIC II) können das unter der PM liegende Darmepithel angreifen. Die kontinuierliche Sezernierung von *PICBP49* ist also in jeder Lebensphase von *P. larvae* von großem Vorteil.

Im Gegensatz zu anderen CBPs dient *PICBP49* nicht nur dazu, das unlösliche Substrat Chitin zugänglich zu machen, wie dies bereits für *CBP21* beschrieben wurde (Suzuki *et al.*, 1998; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005b), sondern auch dem Chitinabbau (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c). Dies ist ungewöhnlich, da für viele Bakterien wie z.B. *E. faecalis*, *L. monocytogenes* oder *S. marcescens* ein System aus CBPs und Chitinasen beschrieben ist (Paspaliari *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 1998; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2012; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005a). Für *P. larvae* dagegen konnten keine funktionellen Chitinasen oder vorgeschalteten Faktoren zur Aktivierung von *PICBP49* gefunden werden (Djukic *et al.*, 2014; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c). *PICBP49* ist strukturell keine Chitinase im klassischen Sinne (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c) und übernimmt im Lebenszyklus von *P. larvae* als unabhängiger Virulenzfaktor der Genotypen ERIC I und ERIC II übergreifende Funktionen.

In dieser Arbeit konnten weitere Parallelen zu Mitgliedern der AA10 Familie LPMOs gezogen werden. Neben der Bestimmung eines bevorzugten Substrates konnten erstmals Substratumsatz und Produktprofil von *PICBP49* genauer untersucht werden. Dies dient als Basis für die weitere Aufklärung des Abbaumechanismus der PM durch *PICBP49* und bringt uns einer Bekämpfungsstrategie der AFB näher.

4.1.2 Das ERIC II-spezifische S-layer Protein *SplA*

Im Verlauf einer Infektion mit *P. larvae* kommt es nach massiver Vermehrung der Bakterienzellen zum Abbau der PM und anschließend zum Angriff des freigelegten Darmepithels (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014c; Yue *et al.*, 2008). Der Angriff des Darmepithels erfolgt bei den *P. larvae* Genotypen ERIC I und ERIC II

auf verschiedene Weise mit Hilfe genotypspezifischer Virulenzfaktoren. Der *P. larvae* Genotyp ERIC I greift mit den Toxinen Plx1 und Plx2 aus der Entfernung des Darmepithels an (Fünfhaus *et al.*, 2013). Dagegen exprimiert der *P. larvae* Genotyp ERIC II das S-layer Protein SplA, welches die Anheftung an die Larvendarmzellen vermittelt (Poppinga *et al.*, 2012). Bisher ist nicht klar, ob es lediglich diese beiden unterschiedlichen Virulenzfaktoren sind, die die Virulenz der Genotypen bestimmen, oder ob Plx1/2 und SplA jeweils nur Zwischenschritte zweier unterschiedlicher, komplex aufgebauter Pathogenesestrategien sind. Anhand der zusätzlichen Expression von SplA in ERIC I sollte untersucht werden, ob durch die zusätzliche Expression eines Virulenzfaktors die Strategie des *P. larvae* Genotyps ERIC II ausgelöst werden kann. Eine Mutante, die sowohl Toxine als auch das S-layer Protein SplA exprimiert, könnte eine Hypervirulenz zeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte SplA erfolgreich im *P. larvae* Genotyp ERIC I und erstmals im *P. larvae* Stamm ATCC9545 heterolog exprimiert werden (Kap. 3.2.1). Der Nachweis der Expression erfolgte mittels PentaHis Alexa Fluor⁴⁸⁸ konjugierter Antikörper fluoreszenzmikroskopisch und orientierte sich an der bereits beschriebenen Manipulation von *P. larvae* (Poppinga, 2012; Poppinga & Genersch, 2012). Das heterolog exprimierte SplA organisierte sich korrekt an der Bakterienoberfläche (Abb. 16). Nachdem eine funktionelle ERIC I+*spA* Mutante konstruiert werden konnte, erfolgte die Untersuchung dieser Mutante im Larveninfektionsversuch (Kap. 3.2.2). Larven infiziert mit dem ERIC I Wildtyp zeigten eine Gesamtmortalität von 63,33 % ± 10,19 %. Im Vergleich dazu zeigten Larven infiziert mit der Mutante ERIC I+*spA* eine Gesamtmortalität von 67,78 % ± 7,78 %. In Larven infiziert mit der konstruierten Mutante ERIC I+*spA* konnte keine gesteigerte Gesamtmortalität festgestellt werden. Die zusätzliche Expression von SplA im Genotyp ERIC I führte nicht zu einer Hypervirulenz der Mutante. Auch die Untersuchung ausgewählter immunrelevanter Gene mittels qPCR zeigte keine signifikante Änderung der Expression in ERIC I+*spA*-infizierten Larven im Vergleich zu Larven der Kontrolle (Kap. 3.3.3, Abb. 24). Eine mögliche Erklärung für die fehlende Hypervirulenz der ERIC I+*spA* Mutante ist, dass SplA und die von SplA vermittelte Adhäsion an das Larvendarmepithel lediglich ein Faktor/Schritt in einer komplexen mehrstufigen Virulenzstrategie ist. Wird lediglich ein Baustein dieser Strategie (hier: SplA) in einem Bakterienstamm exprimiert, der die anderen, bisher noch nicht identifizierten Bausteine nicht besitzt, kommt es zu keiner Änderung der Virulenz, da der zusätzliche Virulenzfaktor nicht genutzt werden kann. Bisher sind die Faktoren, die von *P. larvae* ERIC II im Anschluss an die Adhäsion an das Darmepithel genutzt werden, um die epitheliale Barriere zu überwinden, nicht bekannt. Sollten *P. larvae* ERIC I-Stämme diese Faktoren nicht besitzen, kann die Expression von SplA in diesen Stämmen keine Hypervirulenz verursachen, da die Adhäsion an das Epithel bei der Mutante eine Sackgasse ist. Die beiden Genotypen unterscheiden sich offensichtlich nicht nur in Bezug auf einzelne Virulenzfaktoren sondern auch in Bezug auf ihre Virulenzstrategien.

4.2. Die larvale Immunantwort auf eine Infektion mit *P. larvae*

Die Immunantwort der Larve auf eine Infektion mit *P. larvae* war bereits Gegenstand vieler Studien. Neben transkriptionellen Veränderungen von Immuneffektoren (Evans, 2004; Evans *et al.*, 2006; Evans & Lopez, 2004) und Genen der Immunsignalwege wurden ganze Transkriptomanalysen durchgeführt (Cornman *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurden auch auf Ebene des Proteoms vergleichende Studien durchgeführt, in denen die Hämolymphe infizierter Larven mit einer nicht-infizierten Kontrolle verglichen wurde (Chan *et al.*, 2009). Obwohl viele Studien mit Fokus auf die Immunantwort der Larve durchgeführt worden sind, bauen die Erkenntnisse nicht aufeinander auf und widersprechen sich sogar. In allen Studien erfolgte zwar eine Infektion von Larven mit *P. larvae*, aber deren Erfolg wurde nie überprüft. Darüber hinaus fehlen in diesen Studien jegliche Informationen zum infizierenden *P. larvae* Genotyp, welcher nie genauer erwähnt oder bestimmt wurde. Nachträglich Rückschlüsse auf den verwendeten Genotyp anhand von Krankheitsverlauf, Koloniemorphologie oder anderer genotypspezifischer Merkmale sind nicht möglich, da diese Informationen in den erwähnten Studien nicht weiter ausgeführt wurden.

Basierend auf den bereits beschriebenen verschiedenen Pathogenese Strategien der *P. larvae* Genotypen ERIC I und ERIC II (Ashiralieva & Genersch, 2006; Djukic *et al.*, 2014; Fünfhaus *et al.*, 2009; Fünfhaus & Genersch, 2012; Fünfhaus *et al.*, 2013; Genersch *et al.*, 2005; Genersch *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2008) liegt die Hypothese nahe, dass der infizierende Genotyp die Immunantwort der Larve beeinflusst. Um diese Hypothese zu untersuchen erfolgte in dieser Arbeit eine vergleichende Transkriptomanalyse von ERIC I-infizierten Larven im Vergleich zu einer nicht-infizierten Kontrolle (experimentelle Gruppe I) und von ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zu einer nicht-infizierten Kontrolle (experimentelle Gruppe II).

4.2.1 Untersuchung immunrelevanter Gene in *A. mellifera* während einer Infektion mit *P. larvae*

Aufgrund der signifikant höheren Anzahl von DEGs in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle II (Abb. 21C) lag die Vermutung nahe, dass der infizierende *P. larvae* Genotyp einen Einfluss auf die Immunantwort der Larve hat. Um diese Hypothese zu überprüfen, erfolgte die gezielte Untersuchung immunrelevanter Gene. Es erfolgte die Unterscheidung zwischen intermediären Signalkomponenten der verschiedenen Signalwege und Effektoren wie antimikrobiellen Peptiden (AMPs) (Abb. 22). Von insgesamt 11.014 untersuchten Genen konnten 107 den Signalwegen Toll, Imd/JNK, JAK/STAT, Apoptose, RNAi oder der Ebene

der antimikrobiellen Effektoren zugeordnet werden (Kap. 8.2, Tab. Z3). Für einen Teil der betrachteten Gene ist die Funktion in *A. mellifera* noch nicht beschrieben, in diesen Fällen wurde nach homologen Genen in *Drosophila* gesucht, um auf die mögliche Funktion in *A. mellifera* zu schließen.

In der vorliegenden Studie waren auf Ebene der intermediären Signalkomponenten nur wenige Gene differentiell exprimiert (Abb. 22). Im Apoptose-Signalweg waren in ERIC II-infizierten Larven insgesamt drei Gene im Vergleich zur Kontrolle II signifikant reguliert. Die Homologe des *death-associated protein 1* und *caspase 1* waren signifikant hochreguliert. Im Gegensatz dazu war der *apoptosis inducing factor (aif)*, welcher bei der Initiierung eines Caspase-unabhängigen Apoptose-Signalwegs beteiligt ist, signifikant herunterreguliert. Im RNAi-Signalweg war das Gen *tudor-sn protein (tudor-sn)* in beiden experimentellen Gruppen signifikant herunterreguliert. In *Drosophila* wurde *tudor-sn* als Untereinheit des RISC Enzyms bereits beschrieben, welcher der Herunterregulation der Genexpression dient (Caudy *et al.*, 2003). Dagegen war *fmr1 (fragile X mental retardation syndrome-related protein 1)* ausschließlich in ERIC I-infizierten Larven signifikant herunterreguliert. In *Drosophila* konnte eine Interaktion von Fmr1 mit Dicer, einer weiteren essentiellen Komponente des RNAi-Signalwegs und Aktivator des RISC Enzyms, bereits gezeigt werden (Ishizuka *et al.*, 2002) und eine ähnliche Rolle von *fmr1* im RNAi-Signalweg von *A. mellifera* ist wahrscheinlich. Im JAK/STAT-Signalweg konnte keine differentielle Regulierung der intermediären Signalkomponenten festgestellt werden. Dies ist nicht weiter überraschend, da auch in anderen Studien mit *A. mellifera* keine differentielle Regulierung festgestellt werden konnte (Doublet *et al.*, 2017).

Unter den Genen des Toll-Signalwegs war die *serine protease 14 (sp14)* in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle II signifikant hochreguliert. *Sp14* weist strukturelle Gemeinsamkeiten zu *snake* in *Drosophila* auf und neben der Beteiligung an der frühen embryonalen Entwicklung und der Nahrungsverwertung wurde die Beteiligung in der Immunantwort beschrieben (Evans *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2006). Das Gen *pgrp-s2 (peptidoglycan recognition protein s2)* war ebenfalls nur in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle II signifikant hochreguliert. Das Mitwirken von *pgrp-s2* und *sp14* im Toll-Signalweg sowie eine positive Korrelation der Expression zusammen mit einigen AMPs wurde bereits beschrieben (Doublet *et al.*, 2017; Evans *et al.*, 2006) und konnte mit dieser Studie weiter bestätigt werden. Von den drei orthologen Genen für den NF- κ B Inhibitor Cactus war ausschließlich *cactus 2* in beiden experimentellen Gruppen signifikant hochreguliert (Abb. 26). Die Hochregulierung des Orthologs *cactus 1* und eine geringfügige Änderung der Expression des Orthologs *cactus 2* wurde bereits in *A. mellifera* Larven nach oraler Infektion mit *P. larvae* beobachtet, jedoch wurde die Funktion in *A. mellifera* noch nicht weiter untersucht (Evans *et al.*, 2006). In Versuchen mit *Drosophila* konnte bei Infektionen mit *Micrococcus luteus* (grampositives Bakterium) und *Beauveria bassiana* (Pilz)

eine dreifache Hochregulierung von *cactus* festgestellt werden (Irving *et al.*, 2001). Die Hochregulierung des NF- κ B Inhibitors Cactus trägt zum Beenden der Expression immunrelevanter Gene bei (Hillyer, 2016). Die Immunantwort ist für den Wirt immer kostspielig und eine engmaschige, ressourcenschonende Regulierung notwendig (Buchon *et al.*, 2014). Aufgrund der wichtigen regulatorischen Aufgabe in der Immunantwort von *Drosophila* ist es naheliegend, dass *cactus* in *A. mellifera* eine ähnliche Aufgabe erfüllt. Für keines der beiden Homologe für Dorsal (*dl*, *dl-2*), dem Transaktivator der AMP Genexpression, konnte eine transkriptionelle Regulierung beobachtet werden (Abb. 22). Dies geht einher mit bereits veröffentlichten Versuchen mit *A. mellifera* (Evans *et al.*, 2006).

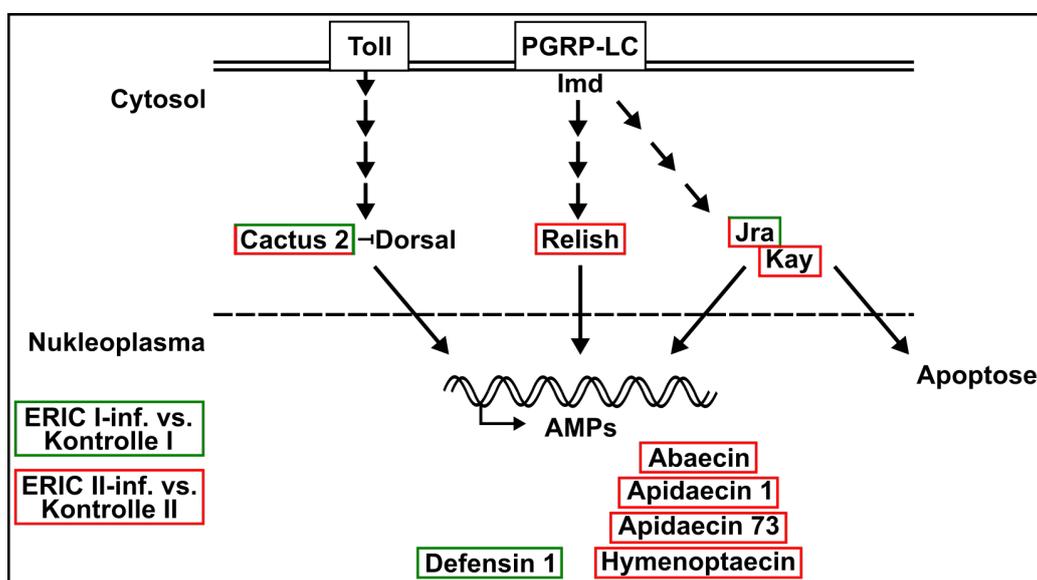


Abb. 26: Übersicht der signifikant hochregulierten Gene des Toll- und Imd-Signalwegs. Im Toll-Signalweg (siehe auch Kap. 1.3, Abb. 22) konnte die signifikant gesteigerte Expression eines Homologs des NF- κ B Inhibitors Cactus sowohl in ERIC I-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle I, als auch in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle II beobachtet werden. Für keines der Homologe für Dorsal, den Transaktivator der AMP-Genexpression, konnte eine transkriptionelle Regulierung festgestellt werden. Im Imd-Signalweg konnte eine gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors Relish sowie Jra und Kay in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle II festgestellt werden. Auf Ebene der antimikrobiellen Effektoren waren die AMPs Abaecin, Apidaecin 1, Apidaecin 73 und Hymenoptaecin in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle II signifikant mehr exprimiert. Das AMP Defensin 1 war in ERIC I-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle I signifikant stärker exprimiert. Gene die in ERIC I-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle I signifikant hochreguliert waren sind grün eingrahmt. Gene die in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle II signifikant hochreguliert waren sind rot eingrahmt. Genen die in beiden experimentellen Gruppen signifikant hochreguliert waren, werden rot-grün eingrahmt.

Im Imd/JNK-Signalweg waren ebenfalls nur wenige intermediäre Signalkomponenten reguliert. Der Transkriptionsfaktor *relish* war signifikant in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle hochreguliert (Abb. 22). In *Drosophila* ist bereits bekannt, dass *relish* die Transkription aller wichtigen AMPs induziert. Die gemeinsame Aktivierung des Imd-Signalwegs und Toll-Signalwegs durch verschiedene Bakterien und Pilze sowie die dadurch gesteigerte Expression antimikrobieller Effektoren und anderer immunrelevanter Gene konnte bereits in verschiedenen Studien mit *Drosophila* gezeigt werden (De Gregorio *et al.*, 2002; Dushay *et al.*, 1996; Hultmark, 2003; Lemaitre *et al.*, 1996). Die Aktivierung beider Signalwege ermöglicht *Drosophila* eine spezifische Reaktionen auf verschiedene Pathogene (Georgel *et al.*, 2001; Han & Ip, 1999; Hedengren *et al.*, 1999; Lemaitre *et al.*, 1996; Leulier *et al.*, 2000). Für *A. mellifera* liegen unterschiedliche Ergebnisse zur Regulierung von *relish* vor. Bei Infektion von *A. mellifera* mit Viren konnte eine Hochregulierung von *relish* und die gesteigerte Expression von AMPs beobachtet werden (Doublet *et al.*, 2017). Dagegen wurde bei Infektionen von *A. mellifera* Larven mit *P. larvae* keine nennenswerte differentielle Regulierung von *relish*, aber eine gesteigerte Expression von AMPs bereits gezeigt (Evans *et al.*, 2006). Eine Erklärung für diese gegensätzlichen Ergebnisse könnte sein, dass in der Studie von Evans und Kollegen (2006) weder die Infektion mit *P. larvae* überprüft, noch der *P. larvae* Genotyp weiter berücksichtigt wurde. In der vorliegenden Studie konnte die gesteigerte Expression von *relish* in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle und die signifikant gesteigerten Expression von vier AMPs beobachtet werden. Es konnte wie in *Drosophila* eine Aktivierung des Imd- und Toll-Signalwegs festgestellt werden.

Kayak (*kay*), Homolog des humanen Protoonkogens *c-Fos*, war in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle II signifikant hochreguliert (Abb. 22). In *Drosophila* konnte bereits eine entscheidende Rolle für *kayak* bei der Wundheilung gezeigt werden (Rämet *et al.*, 2002). *Kayak* kann seine regulatorische Funktion als Teil des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1 in Verbindung mit *jra* oder auch unabhängig von *jra* ausführen (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997). Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Expression in Honigbienenlarven infiziert mit *P. larvae* ERIC II könnte in der Pathogenese-strategie liegen (siehe auch Kap. 4.2.3). *P. larvae* ERIC II adhärirt über das S-layer Protein SplA direkt an das Darmepithel und schädigt dieses, entweder allein oder unter Mithilfe weiterer unbekannter Faktoren. Durch den schnelleren Krankheitsverlauf von *P. larvae* ERIC II sowie die direkte Schädigung des Darmepithels könnte in der Larve eine Kaskade zur Wundheilung ausgelöst werden, welche aber nicht erfolgreich ist und nur weitere Ressourcen verbraucht.

Jra (*Jun-related antigen*, *d-jun* Homolog) war in beiden experimentellen Gruppen signifikant hochreguliert (Abb. 22, Abb. 26). In Versuchen mit *Drosophila* konnte eine erhöhte Expression von *d-jun* nach Infektion bereits gezeigt und eine gemeinsame Regulierung von Imd- und JNK-Signalweg belegt werden. Obwohl dieses Gen nicht zu den klassischen

immunregulierenden Genen gezählt wird, könnte es doch eine immunrelevante Aufgabe erfüllen (Boutros *et al.*, 2002; De Gregorio *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004). Dies muss jedoch in weiteren Studien noch genauer untersucht werden.

Neben der Expression von AMPs konnte kürzlich eine weitere Funktion des Imd-Signalwegs in *Drosophila* aufgezeigt werden: die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere im Darm. Das Ablösen von Enterozyten bei Infektion wird durch den Imd-Signalweg, unabhängig von Apoptose durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), kontrolliert. Das Zusammenwirken der AMP-Produktion und die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere ermöglicht eine intestinale antibakterielle Antwort im Darm (Buchon *et al.*, 2009; Zhai *et al.*, 2018). Die beobachtete stärkere Aktivierung des Imd-Signalwegs in ERIC II-infizierten Larven (Abb. 22) bestärkt die Vermutung einer stärkeren Schädigung des Larvendarmepithels durch die direkte Anheftung von *P. larvae* ERIC II mit Hilfe des S-layer Proteins. Die Larve könnte durch die gesteigerte Expression von Genen des Imd-Signalwegs neben der Produktion von AMPs versuchen, die epitheliale Barriere aufrechtzuerhalten.

Die Änderung der Expression von Genen kodierend für intermediäre Signalkomponenten aller betrachteten Signalwege war in beiden experimentellen Gruppen verhältnismäßig gering und meist einheitlich, was vermuten lässt, dass diese Komponenten bei einer Infektion eher nicht transkriptionell reguliert werden. Die Regulierung erfolgt hier vermutlich über Phosphorylierung, wie dies bereits in *Drosophila* gezeigt werden konnte (Broderick *et al.*, 2009; Drier *et al.*, 1999).

Im Gegensatz dazu ist die transkriptionelle Regulierung der antimikrobiellen Effektoren bekannt und hier konnten wesentlich mehr Änderungen in der Genexpression im Vergleich der Gruppen infiziert mit *P. larvae* ERIC I bzw. ERIC II zur jeweiligen nicht-infizierten Kontrolle beobachtet werden (siehe Kap. 3.3.2, Abb. 22). In ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle waren die Transkripte der AMPs *abaecin*, *apidaecin 1*, *apidaecin 73* sowie *hymenoptaecin* signifikant hochreguliert. In ERIC I-infizierten Larven konnte eine signifikante Hochregulierung von *defensin 1* und *lysozyme 3* im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

Die Regulierung der Expression der AMPs in dieser Studie geschieht hauptsächlich über den Imd/JNK-Signalweg. Insgesamt waren mehr AMPs in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle signifikant hochreguliert, als in ERIC I-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle I. Dies weist auf eine stärkere Immunantwort in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle hin. Mit Ausnahme von *defensin 1* werden je nach infizierendem Genotyp verschiedene AMPs angesprochen. Dies bekräftigt die Hypothese, dass in Abhängigkeit vom infizierenden *P. larvae* Genotyp (ERIC I oder ERIC II), unterschiedliche Immunreaktionen in der Larve ausgelöst werden.

Die Expression antimikrobieller Effektoren als Teil der Immunantwort der Larve war bereits Gegenstand verschiedener Studien. Der Vergleich dieser Studien untereinander sowie mit der vorliegenden Arbeit zeigen einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede auf.

Die Expression der AMPs Abaecin und Defensin 1 wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht (Evans, 2004; Evans *et al.*, 2006; Evans & Lopez, 2004; Krongdang *et al.*, 2018). Je nach Studie konnte für Abaecin zu bestimmten Zeitpunkten eine Regulierung beobachtet werden (Evans, 2004; Evans *et al.*, 2006; Krongdang *et al.*, 2018). Für *defensin 1* konnte zunächst kein signifikanter Unterschied in der Expression beobachtet werden (Evans, 2004; Evans & Lopez, 2004). Dies änderte sich mit den im Jahr 2006 veröffentlichten Daten derselben Arbeitsgruppe, in denen neben *abaecin* und *defensin 1*, auch *apidaecin* und *hymenoptaecin* als signifikant hochreguliert gezeigt werden konnten (Evans *et al.*, 2006). Diese AMPs wurden in einer aktuelleren Studie ebenfalls als differentiell reguliert beschrieben (Krongdang *et al.*, 2018). Zu verschiedenen Zeitpunkten waren *defensin*, *abaecin* und *hymenoptaecin* signifikant in ERIC I-infizierten Larven hochreguliert. *Apidaecin* war in dieser Studie lediglich 6 h nach Infektion signifikant hochreguliert. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Hochregulierung von *abaecin*, der *apidaecine 1 & 73* und *hymenoptaecin* in *P. larvae* ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle beobachtet werden. Dagegen wurde in *P. larvae* ERIC I-infizierten Larven *defensin 1* im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle signifikant hochreguliert.

Im Gegensatz zu Evans und Kollegen (2006) konnte in der vorliegenden Arbeit kaum eine Regulierung intermediärer Signalkomponenten festgestellt werden. Zusätzlich geben Evans und Kollegen keine genaueren Angaben zur Einordnung der Genexpressionswerte als hoch- bzw. herunterreguliert. In der beigefügten Tabelle ist nur eine Orientierung (hoch- bzw. herunterreguliert) angegeben. Außerdem erfolgt die Normalisierung der gemessenen Genexpression gegen lediglich ein Referenzgen.

In einer Studie von Cornman und Kollegen (2013) konnte in infizierten Larven drei Tage nach Infektion mit *P. larvae* mittels RNA-Seq ebenfalls eine signifikante Hochregulierung von *defensin 1*, nicht aber *abaecin* gezeigt werden. Außerdem konnte eine gesteigerte Expression von Apidaecin und Hymenoptaecin beobachtet werden. Es werden keine weiteren Informationen zu intermediären Signalkomponenten oder deren Regulierung gegeben. In einer weiteren umfassenden Studie erfolgte der Vergleich der Proteome *P. larvae* infizierter Honigbienenlarven und einer Kontrollgruppe (Chan *et al.*, 2009). Chan und Kollegen untersuchten die Hämolymphe vier Tage nach Infektion mit *P. larvae* und konnten eine signifikante Steigerung der Expression von *hymenoptaecin* und *lysozyme* zeigen. Es konnten keine Veränderungen der Expression von *abaecin* oder *defensin* im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle beobachtet werden.

Die Ergebnisse der aufgeführten Studien erscheinen gegensätzlich, trotzdem gibt es Übereinstimmungen mit den RNA-Seq Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Nach einer

Infektion mit *P. larvae* kommt es in allen Studien zu einer gesteigerten Expression von AMPs. In der vorliegenden Studie werden nach einer Infektion mit dem *P. larvae* Genotyp ERIC II vier von zehn AMPs signifikant hochreguliert. Bei einer Infektion mit dem *P. larvae* Genotyp ERIC I werden nur zwei von zehn Antimikrobiellen Effektoren signifikant hochreguliert. Die gesteigert Expression der AMPs im Vergleich zur jeweiligen nicht-infizierten Kontrollgruppe zeigt die Aktivierung des Immunsystems der Honigbienenlarve nach Infektion mit *P. larvae*, wobei eine stärkere Reaktion in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten war. Darüber hinaus werden verschiedene Kombinationen von AMPs bei Infektion mit den verschiedenen *P. larvae* Genotypen gesteigert exprimiert. Dies deckt sich mit Untersuchungen, in denen bereits gezeigt werden konnte, dass AMPs in Kombination wesentlich wirksamer sind (Rahnamaeian *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016). Rahnamaian und Kollegen (2015) konnten zeigen, dass porenbildende glycinreiche AMPs wie Hymenoptaecin die Wirkung von intrazellulär wirksamen prolinreichen AMPs wie Abaecin potenzierten. Die gemeinsame Expression von AMPs für die eine funktionelle Interaktion gezeigt werden konnte (Rahnamaeian *et al.*, 2015), wurde in der vorliegenden Studie bestätigt. In der vorliegenden Arbeit konnte in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant gesteigerte Expression von Abaecin und Hymenoptaecin gezeigt werden. Auch andere prolinreiche AMPs wie die Apidaecine waren signifikant hochreguliert. Die unterschiedliche Anzahl differentiell exprimierter sowie immunrelevanter Gene und die gesteigerte Expression verschiedener AMPs bekräftigen die Hypothese einer unterschiedlichen Immunantwort je nach infizierendem *P. larvae* Genotypen (ERIC I oder ERIC II).

Um die vorliegenden Ergebnisse und bereits publizierten Daten besser einordnen zu können, muss der Studienaufbau, die Methodik und die Wahl der auszuwertenden Proben beachtet werden. In Evans *et al.* (2006) werden detaillierte Informationen zur Expression intermediärer Signalkomponenten sowie AMPs gegeben. Diese Untersuchungen wurden jedoch mittels qPCR durchgeführt und es liegen keine RNA-Seq-Daten für einen Vergleich mit den RNA-Seq-Daten aus dieser Studie vor. Auch die Studie von Krongdang und Kollegen (2018) untersuchte die Expression ausgewählter AMPs mittels qPCR nach 6 h, 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach Infektion mit *P. larvae*. Die differentiell exprimierten AMPs konnten in der vorliegenden Arbeit zu einem späteren Zeitpunkt (3 d p.i.) ebenfalls beobachtet werden, jedoch gab es auch in dieser Studie keine RNA-Seq-Daten für einen Vergleich.

Die von Cornman und Kollegen (2013) veröffentlichte Studie ist eine der wenigen Arbeiten, welche ebenfalls eine RNA-Seq-Analyse *P. larvae*-infizierter Honigbienenlarven durchführte. Ein Vergleich mit den in dieser Studie erhobenen Daten ist aufgrund des ähnlichen Studiendesigns teilweise möglich. Eine gesteigerte Expression von AMPs konnte auch hier gezeigt werden. Der übergreifende Vergleich verschiedener Zeitpunkte (48 h, 72 h) nach

Infektion mit *P. larvae* mit verschiedenen Verfahren (RNA-Seq, qPCR) ist differenziert zu betrachten. Eine interne Kontrolle, die in die Auswertung miteinbezogen werden könnte, wurde nicht weiter erwähnt. Darüber hinaus ist die Verwendung zweier verschiedener *P. larvae* Aufbereitungen aus verschiedenen Jahren von verschiedenen Kolonien ohne Bestimmung des *P. larvae* Genotyps als äußerst kritisch zu bewerten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beiden verwendeten *P. larvae* Aufbereitungen um verschiedene *P. larvae* Genotypen handelte. Darüber hinaus wurde der Erfolg der Infektion mit *P. larvae* nicht untersucht und nähere Informationen zum infizierenden Genotyp wurden nicht gegeben. Hinzu kommt die Verwendung von Larven aus zwei verschiedenen Kolonien und aus zwei nicht aufeinander folgenden Jahren mit sehr unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten innerhalb der Jahre (Mai / September).

In der vorliegenden Studie wurde ein anderes Protokoll zur Aufreinigung der RNA sowie für die Sequenzierung genutzt. Darüber hinaus unterschied sich die bioinformatische Analyse der Sequenzierungsdaten in der vorliegenden Studie stark von der von Cornman *et al.* (2013) und erschwert somit einen direkten Vergleich. Chan und Kollegen wählten in ihrer Studie zur Untersuchung der Immunantwort die Hämolymphe von Honigbienenlarven nach Infektion mit *P. larvae* (Chan *et al.*, 2009). Ein direkter Vergleich mit der vorliegenden Arbeit ist nicht möglich, da hier keine Hämolymphe sondern ganze Larven für die Aufbereitung von RNA verwendet wurden. Ein Vergleich mittels bioinformatischer Analysen bestimmter, unterschiedlich exprimierter Gene war darüber hinaus nicht möglich, da eine Auflistung der Expressionswerte der einzelnen Gene von Chan und Kollegen nicht zur Verfügung steht.

Trotz aller aufgeführten Unterschiede konnte die erhöhte Expression verschiedener AMPs in allen Studien, inklusive der vorliegenden Arbeit, beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle dieser AMPs in der Immunantwort der Honigbienenlarve. Allerdings widersprechen sich die Ergebnisse teilweise. Eine Ursache hierfür könnte die Tatsache sein, dass in den aufgeführten Studien der infizierende *P. larvae* Genotyp nie berücksichtigt wurde. Mit dieser Vernachlässigung wurde den bereits gezeigten unterschiedlichen Virulenzfaktoren und den daraus resultierenden unterschiedlichen Pathogenesestrategien von *P. larvae* keine Rechnung getragen, was ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein könnte.

4.2.2 Immunantwort in individuellen Larven

Das Ziel dieser Arbeit war die weitere Aufklärung molekularer Details der Pathogen-Wirt-Interaktion zwischen *P. larvae* und der Honigbienenlarve. Da die bisher veröffentlichten Studien zur Immunantwort der Larve nach Infektion mit *P. larvae* widersprüchlich sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Immunantwort vom infizierenden Genotyp beeinflusst wird.

Um die Immunantwort der Larve zu untersuchen, erfolgte in dieser Studie zunächst der Vergleich von mit *P. larvae* infizierten Larven, infiziert mit den verschiedenen Genotypen ERIC I bzw. ERIC II, mit jeweils einer nicht-infizierten Kontrollgruppe mittels RNA-Seq. Mit der Untersuchung der erstellten Poolproben sollte ein Überblick darüber gewonnen werden, wie die Immunantwort bei einer Infektion mit *P. larvae* beeinflusst wird. RNA-Seq-Analysen werden meist mit Poolproben durchgeführt, da so ein durchschnittliches Genexpressionsprofil einer Kohorte erstellt und kosteneffektiv gearbeitet werden kann. Durch diese Herangehensweise geht die biologische Information des Individuums verloren (dos Santos *et al.*, 2015). Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der RNA-Seq-Analyse durch Poolproben und die Berechnung von Mittelwerten der Genexpression beeinflusst wurden, erfolgte die Überprüfung der Genexpression in individuellen Larven mittels qPCR. Wenn die Hypothese einer genotypspezifischen Immunantwort der Larve zutreffend ist, sollte in individuellen Larven mittels qPCR ähnliche Expression ausgewählter Gene zu beobachten sein. Insgesamt wurden sieben Gene in je neun Larven (drei aus jedem biologischen Replikat, Abb. 9), in drei technischen Replikaten mittels qPCR untersucht. Auf Ebene der intermediären Signalkomponenten wurden die Gene *myD88* und *dorsal 1* untersucht sowie auf Ebene der Effektoren *abaecin*, *apidaecin 73*, *apisimin*, *defensin 1* und *hymenoptaecin*. Wie auch in der RNA-Seq-Analyse (Tab. 16) konnte mittels qPCR keine Änderung der Expression von *myD88* und *dorsal 1* beobachtet werden. In ERIC I-infizierten Larven konnte lediglich *defensin 1* als signifikant hochreguliert im Vergleich zur Kontrolle I bestimmt werden. In ERIC II-infizierten Larven waren *abaecin*, *apidaecin 73*, *hymenoptaecin* sowie *defensin 1* signifikant hochreguliert im Vergleich zur Kontrolle II (Abb. 23). Larven die mit *P. larvae* ERIC II-infiziert wurden zeigten also eine stärkere Immunreaktion. Die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse der RNA-Seq-Daten konnten somit in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden. Eine Verzerrung der Ergebnisse durch die Berechnung oder die eingesetzten Poolproben ist somit unwahrscheinlich (siehe auch Tab. 16, zusätzliche Abb. A2). Die hohe Anzahl untersuchter Larven aus drei biologischen Replikaten sowie die übereinstimmenden Ergebnisse aus zwei verschiedenen Experimenten stärkt zusätzlich die Verlässlichkeit der erhobenen Daten. Die mittels qPCR bestätigte differentielle Expression der verschiedenen AMPs stimmt mit bereits veröffentlichten Ergebnissen überein. Evans und Kollegen konnten bereits eine gesteigerte Expression von Abaecin, Apidaecin, Defensin 1 und Hymenoptaecin beobachten (Evans *et al.*, 2006). In der bereits beschriebenen Studie von Cornman *et al.* (2013) war Apidaecin zu verschiedenen Zeitpunkten signifikant stärker exprimiert. Einige Ergebnisse widersprechen sich jedoch mit früheren Beobachtungen. Für *defensin 1* beispielsweise war zunächst keine unterschiedliche Regulierung beobachtet worden (Evans, 2004; Evans & Lopez, 2004) und für *abaecin* nur zu bestimmten Zeitpunkten (Evans, 2004; Evans *et al.*, 2006). Der verwendete *P. larvae* Genotyp wurden in den erwähnten Studien nie berücksichtigt. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die

unterschiedlichen Ergebnisse. Darüber hinaus ist der Erfolg der künstlichen Infektion mit *P. larvae* nie weiter untersucht worden.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie erfolgte die Infektion von *A. mellifera* Larven mit *P. larvae* Genotyp ERIC I (Krongdang *et al.*, 2018). Wie in der vorliegenden Studie konnte eine signifikante gesteigerte Expression von *defensin 1* (6 h, 24 h, 48 h p.i.) beobachtet werden. Zusätzlich waren *abaecin*, *apidaecin* und *hymenoptaecin* zu verschiedenen Zeitpunkten ebenfalls gesteigert exprimiert. Ein Vergleich mit diesen Daten ist nur bedingt möglich, da der Verlauf der Infektion von dem bereits publizierten Verlauf einer ERIC I-Infektion abweicht (Genersch *et al.*, 2005; Genersch *et al.*, 2006). Krongdang und Kollegen (2018) führten Infektionsversuche mit *P. larvae* über lediglich 11 Tage nach Infektion anstatt üblicher 14 Tage durch. Für den *P. larvae* Genotyp ERIC I ist bekannt, dass alle infizierten Larven über einen Zeitraum von 12 Tagen p.i. sterben. Zusätzlich erreicht die Mortalität der Kontrollgruppe am 11. Tag p.i. einen Wert von 20%. Für Larveninfektionsversuche sollte eine Kontrollmortalität von unter 20% angestrebt werden (Crailsheim *et al.*, 2013). Es ist sehr wahrscheinlich, dass am Tag 12 p.i. weitere Larven versterben und damit die Kontrollmortalität über 20 % liegen würde, wodurch die Auswertung der durchgeführten Versuche nicht den anerkannten wissenschaftlichen Standards entsprechen würde (Crailsheim *et al.*, 2013). Auch der Gesundheitsstatus der Völker aus denen die Larven entnommen wurden, blieb unbeschrieben. Die vorliegende Arbeit kann dagegen durch Überprüfung des Erfolgs der Infektion mit *P. larvae* sowie der differenzierten Untersuchung von Larven infiziert mit *P. larvae* ERIC I bzw. ERIC II (siehe auch Kap. 2.7) weiteren Aufschluss zur Immunantwort der Larve geben.

Auf Grund der unterschiedlichen Krankheitsverläufe der *P. larvae* Genotypen ERIC I und ERIC II befinden sich infizierte Larven in unterschiedlichen weit fortgeschrittenen Stadien der Pathogenese. Die untersuchten Larven wurden an Tag drei nach Infektion entnommen und können im Falle einer Infektion mit *P. larvae* ERIC I über weitere neun Tage bzw. bei einer Infektion mit *P. larvae* ERIC II über weitere drei Tage sterben. Die Larven sind an Tag drei nach Infektion also in unterschiedlichen Stadien der Pathogenese und somit mehr oder weniger moribund. Die unterschiedliche Geschwindigkeit der Krankheitsverläufe könnte eine mögliche Erklärung für die beobachtete unterschiedliche Expression von AMPs sowie die unterschiedlichen Expressionsniveaus in den individuellen Larven eines biologischen Replikats, sein. Um auszuschließen, dass die beobachteten Ergebnisse damit begründet werden können, dass ERIC II-infizierte Larven weiter im Krankheitsverlauf fortgeschritten waren und deswegen eine stärkere Immunantwort zeigten, sollten in zukünftigen Studien weitere Zeitpunkte untersucht werden.

4.2.3 Pathogenesestrategien der *P. larvae* Genotypen ERIC I und ERIC II

In den letzten Jahren konnten große Fortschritte zum Verständnis der molekularen Pathogenese von *P. larvae* erzielt und verschiedene Virulenzfaktoren identifiziert und charakterisiert werden (Fünfhaus *et al.*, 2013; Poppinga *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Aufschluss über weitere Details der Pathogen-Wirt-Interaktion zwischen *P. larvae* und *A. mellifera*, welche dazu beitragen genauer zu verstehen wie *P. larvae* erfolgreich das Immunsystem der Larve überstehen kann. Im Rahmen dieser Studie erfolgte die Untersuchung der Immunantwort von Honigbienenlarven nach Infektion mit *P. larvae*, um zu untersuchen ob der infizierende *P. larvae* Genotyp einen Einfluss auf die Immunantwort hat. Die Unterschiede in der Immunantwort der Larve könnten durch die verschiedenen Pathogenesestrategien, bedingt durch die genotypspezifischen Virulenzfaktoren (Djukic *et al.*, 2014; Fünfhaus *et al.*, 2013; Poppinga *et al.*, 2012) oder durch die unterschiedlichen Krankheitsverläufe der beiden *P. larvae* Genotypen entstehen. Der *P. larvae* Genotyp ERIC I benötigt zwölf Tage, um alle infizierten Larven zu töten. Im Gegensatz dazu tötet *P. larvae* ERIC II in nur sieben Tage alle infizierten Larven. Mit *P. larvae* ERIC II-infizierte Larven sterben somit schneller und zeigen einen beschleunigten Krankheitsverlauf (Genersch *et al.*, 2005; Rauch *et al.*, 2009). In Übereinstimmung mit dem schnelleren Krankheitsverlauf konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden, dass ERIC II-infizierten Larven schneller sterben als ERIC I-infizierte Larven und im Vergleich zur Kontrolle insgesamt mehr Gene differentiell exprimiert waren (Abb. 21). Darüber hinaus waren in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle II mehr als doppelt so viele Immungene signifikant differentiell exprimiert (Abb. 22), was besonders auf Ebene der antimikrobiellen Effektoren deutlich wurde. In ERIC II-infizierten Larven waren im Vergleich zur Kontrolle II insgesamt vier AMPs signifikant hochreguliert. In ERIC I-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle I konnten lediglich zwei AMPs als signifikant hochreguliert bestimmt werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine unterschiedliche Immunantwort der Larve, abhängig vom infizierenden *P. larvae* Genotyp, schließen.

Die beobachtete Immunantwort in *P. larvae* ERIC I-infizierten Larven lässt sich über die Pathogenesestrategie mittels genotypspezifischer Virulenzfaktoren erklären. *P. larvae* ERIC I exprimiert zwei genotypspezifische AB-Toxine (Fünfhaus *et al.*, 2013), welche nach Abbau der PM den Angriff des Larvendarmepithels aus der Distanz ermöglichen. Durch den Angriff von *P. larvae* ERIC I auf das Larvendarmepithel aus der Entfernung und fehlendem direkten Kontakt, kann das Immunsystem der Larve das Pathogen nicht erkennen und folglich kommt es zu keiner gesteigerten Genexpression. Diese Vermutung wird durch die in dieser Studie beobachtete geringere Immunantwort in ERIC I-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle bestätigt. Ein Grund für die starke Immunantwort in ERIC II-infizierten Larven könnte das S-layer Protein SplA sein (Poppinga *et al.*, 2012). Die zunächst aufgestellte Vermutung es könnte dazu beitragen *P. larvae* ERIC II vor dem Immunsystem der Larve zu maskieren, wie

dies in S-layer exprimierenden Bakterien in Vertebraten gezeigt wurde (Konstantinov *et al.*, 2008; Sekot *et al.*, 2011), konnte mit der in dieser Studie gezeigten, stärkeren Immunantwort bei ERIC II-infizierten Larven widerlegt werden. Für Invertebraten lagen diesbezüglich bis jetzt keine Daten vor. Die vorliegende Studie ist die erste Untersuchung an Invertebraten mit einem so umfassenden Datensatz. Bei einer erfolgreichen Maskierung von *P. larvae* ERIC II durch SplA wäre mit einer geringeren Immunantwort in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle zu rechnen gewesen. Die vorliegende Studie legt nun nahe, dass *P. larvae* SplA es den Bakterien eher nicht ermöglicht die Immunantwort der Larven durch eine Maskierung zu unterlaufen. Die beobachtete stärkere Immunantwort in ERIC II-infizierten Larven hängt vermutlich mit der bereits gezeigten Anheftung durch SplA an das Larvendarmepithel (Poppinga *et al.*, 2012) zusammen. Durch die direkte Anheftung an das Larvendarmepithel wird das Pathogen *P. larvae* vom Immunsystem der Honigbienenlarve erkannt und eine starke lokale Immunantwort ausgelöst. Wird das S-layer Protein nicht exprimiert, wie im getesteten Knockout DSM25430 Δ spA, kommt es zum signifikanten Abfall der Adhäsion an Darmzellen (Poppinga *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Immunantwort von DSM25430 Δ spA im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle I und es konnte gezeigt werden, dass bei fehlender Expression von SplA eine Immunantwort ausgelöst wird, die ähnlich der in ERIC I-infizierten Larven ist (siehe Kap. 3.3.3, Abb. 23, Abb. 24). Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass die durch das ERIC II-spezifische SplA vermittelte Adhäsion an das Darmepithel, einen Einfluss auf die Immunantwort hat. Weitere Faktoren sind jedoch notwendig, um die gesamte Pathogenese Strategie auszulösen. Mit der vorliegenden Arbeit konnte also gezeigt werden, dass die Expression eines einzelnen Virulenzfaktors, hier SplA, nicht die Strategie des *P. larvae* Genotyps ERIC II auslösen kann (Kap. 3.2.2, 3.3.3, Abb 23, Abb. 24). Vielmehr ist die Expression von SplA und die von SplA vermittelte Anheftung an das Larvendarmepithel, ein Teil einer komplexeren Virulenzstrategie. Dies wird weiter durch die Ergebnisse der Larveninfektionsversuche mit der Mutante ERIC I+spA bestätigt (Kap. 3.2.2), in denen bei Expression von SplA in ERIC I keine Hypervirulenz beobachtet werden konnte. Auch die Untersuchung der Expression ausgewählter immunrelevanter Gene mittels qPCR zeigte in ERIC I+spA-infizierten Larven im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle keine unterschiedliche Regulation (Abb. 24). Zusammenfassend ist die Expression eines einzelnen Bausteins (z.B. SplA) einer Pathogenese Strategie nicht ausreichend, um die komplette Pathogenese Strategie von *P. larvae* ERIC II auszulösen.

Ein weiterer entscheidender Unterschied zwischen den *P. larvae* Genotypen ist der Krankheitsverlauf. Bei einer typischen Infektion von Larven mit *P. larvae* ERIC II sterben alle infizierten Larven innerhalb von sieben Tagen. Im Gegensatz dazu sterben mit *P. larvae* ERIC I-infizierte Larven über einen Zeitraum von zwölf Tagen. Alle Larven für diese Studie wurden an Tag drei nach Infektion entnommen. Dieser Zeitpunkt wurde bereits in anderen

Studien untersucht (Evans, 2004; Evans *et al.*, 2006) und so konnten die Ergebnisse dieser Studie mit den bereits publizierten Daten verglichen werden. Darüber hinaus wurde Tag drei nach Infektion gewählt, da ein Großteil der Larven unabhängig vom infizierenden Genotyp hier noch lebendig sind (Abb. 4). Die an Tag drei nach Infektion entnommenen Larven können also in unterschiedlichen Stadien und damit mehr oder weniger moribund sein. Es ist naheliegend, dass moribunde Larven stärker von einer Infektion mit *P. larvae* betroffen sind und eine starke Immunreaktion zeigen oder aber zu geschwächt sind, um überhaupt noch eine Immunantwort auszulösen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine wesentlich stärkere Immunantwort in ERIC II-infizierten Larven im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Um abzuklären, dass dieses Ergebnis auf dem infizierenden Genotyp beruht und nicht auf dem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf, sollten in zukünftigen Untersuchungen Larven zu anderen Zeitpunkten untersucht werden.

4.2.4 Immunantwort von *A. mellifera* und die Überwindungsstrategie von *P. larvae*

Die Immunantwort von Insekten beruht auf verschiedenen Signalwegen, welche durch bestimmte Zellwandkomponenten eindringender Pathogene (grampositive Bakterien, gramnegative Bakterien, Pilze) ausgelöst werden (Abb. 2). Zunächst wurde eine abgegrenzte und geradlinige Auslösung der einzelnen Signalwege angenommen. Die in den Zellwänden von grampositiven Bakterien vorkommenden Peptidoglykane vom Lys-DAP-Typ sowie die in den Zellwänden von Hefen und Pilzen enthaltenen β -Glykane lösen demnach den Toll-Signalweg aus. Die Zellwände von gramnegativen Bakterien sowie *Bacilli* und *Paenibacilli* weisen Peptidoglykane vom meso-DAP-Typ in den Zellwänden auf, was zur Aktivierung des Imd-Signalwegs führt (Kaneko *et al.*, 2004; Lemaitre & Hoffmann, 2007; Leulier *et al.*, 2003). Je mehr Details über die einzelnen Schritte der Signalwege bekannt werden, desto mehr werden auch Verbindungen zwischen den einzelnen Signalwegen aufgedeckt (Broderick *et al.*, 2009). Das hier verwendete Modell der Pathogen-Wirt-Interaktion von *P. larvae* und *A. mellifera* bietet die seltene Möglichkeit zu untersuchen, wie zwei verschiedene Genotypen eines Erregers die Immunantwort des Wirts beeinflussen können und so weitere Details der Immunantwort des Wirts, aber auch der Pathogenesestrategie des Erregers aufklären. Honigbienenlarven infizieren sich über die orale Aufnahme von sporenhaltigem Futter mit *P. larvae*. Nachdem die Sporen im Larvendarm ausgekeimt sind, besiedeln vegetative *P. larvae* Bakterienzellen den Darm. Von diesem Zeitpunkt an versorgt die Honigbienenlarve über aufgenommenes Futter nicht nur sich selbst, sondern auch das Pathogen *P. larvae*. Obwohl *P. larvae* zu diesem Zeitpunkt als Kommensale im Darm lebt, konnte in verschiedenen Studien bereits gezeigt werden, dass die Larve Zeichen von Entkräftung und Mangelernährung aufweist (Chan *et al.*, 2009; Hertlein *et al.*, 2014). Ab einem bestimmten Zeitpunkt wechselt *P. larvae* von der nicht-

invasiven in die invasive Lebensphase. Die Details und die einzelnen Schritte zum Übergang von einer Phase in die nächste sind noch nicht bekannt. Bevor das Darmepithel mit den genotypspezifischen Virulenzfaktoren Plx1/Plx2 (ERIC I) bzw. SplA (ERIC II) angegriffen werden kann, muss zunächst die peritrophe Matrix, eine chitinreiche Schutzschicht des Darmepithels, abgebaut werden. Dies geschieht durch den Virulenzfaktor PICBP49, welcher vom *P. larvae* Genotyp ERIC I als auch ERIC II exprimiert wird. Weitere Details zum Abbau von Chitin durch PICBP49 konnten im Rahmen dieser Studie aufgedeckt werden (Kap.3.1). Um sich gegen das Pathogen zu wehren, löst die Larve eine lokale Immunantwort aus, welche zu einer erhöhten Expression von AMPs führt. In der vorliegenden Arbeit konnten signifikant mehr differentiell regulierte Gene in ERIC II-infizierten Larven festgestellt werden (Abb. 21). Bei den untersuchten immunrelevanten Genen konnten ebenfalls mehr signifikant differentiell exprimierte Gene in der experimentellen Gruppe II festgestellt werden (Abb. 22). Trotz der Expression verschiedener AMPs bei einer Infektion mit *P. larvae* ERIC I als auch *P. larvae* ERIC II, gelingt es der *A. mellifera*-Larve nicht *P. larvae* effektiv zu bekämpfen und ein Fortschreiten der Infektion zu verhindern. Die Wirkung von Bienen-AMPs wurde bereits gegen *P. larvae* getestet (Khilnani, 2015), jedoch wurden hier die verschiedenen *P. larvae* Genotypen nicht weiter berücksichtigt. In der vorliegenden Arbeit konnte in ersten Platteninhibitionsversuchen keine Hemmung von *P. larvae* ERIC I bzw. ERIC II durch die einzelnen AMPs Abaecin oder Hymenoptaecin beobachtet werden (Abb. 25). In weiteren Versuchen sollten verschiedene Kombinationen von AMPs sowie verschiedene Konzentrationen getestet werden, da dies eher der natürlichen Immunantwort der Larve entspricht (Rahnamaeian *et al.*, 2015). Außerdem sollten neben den Platteninhibitionstests weitere sensitivere Verfahren, wie ein 96-Loch-Platten Assay, genutzt werden um eine mögliche Hemmung von *P. larvae* genauer zu untersuchen (Khilnani, 2015).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Larven nach Infektion mit *P. larvae* ERIC II eine stärkere Immunantwort im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen, als nach Infektion mit *P. larvae* ERIC I im Vergleich zur Kontrolle. Bereits bekannt ist, dass bei einer *P. larvae* ERIC II-Infektion die infizierten Larven schneller sterben als bei einer *P. larvae* ERIC I-Infektion (Genersch *et al.*, 2005; Genersch *et al.*, 2006). Die individuelle Immunantwort scheint also auch einen Einfluss auf die Mortalität der Larven zu haben. In *Drosophila* konnte bereits gezeigt werden, dass eine Immunantwort immer mit energetischen Kosten für den Wirt verbunden ist, da Ressourcen von anderen physiologischen Prozessen abgezogen werden müssen (Buchon *et al.*, 2014). Das Auslösen einer exzessiven Immunantwort würde zu Ungunsten des Individuums ausfallen (Paredes *et al.*, 2011). Eine Immunantwort ist also immer kostspielig und könnte auch bei einer Infektion mit *P. larvae* zum schnelleren Tod der Honigbienenlarve beitragen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Honigbiene bis jetzt noch keine effiziente Strategie gegen *P. larvae* entwickelt hat, was bei der Anpassungsfähigkeit dieses Erregers

äußert schwierig erscheint. Diese Anpassungsfähigkeit wiederum macht *P. larvae* zu einem äußerst interessanten und erforschenswerten Bakterium. Hinzu kommt, dass durch die Haltung in menschlicher Obhut eine Weiterentwicklung der Abwehrmechanismen von *A. mellifera* verhindert wird und daher weiter nach effektiven Behandlungsstrategien der AFB gesucht werden muss.

5. Zusammenfassung

Weitere Aufklärung molekularer Details zur Pathogen-Wirt-Beziehung im Verlauf der Pathogenese einer Infektion von Bienenlarven mit *Paenibacillus larvae*

Eine der verheerendsten weltweit verbreiteten Erkrankungen der Honigbiene ist die durch *Paenibacillus larvae* verursachte Amerikanische Faulbrut (AFB), welche ausschließlich die Brut schädigt. Honigbienenlarven infizieren sich über sporenhaltiges Futter und nach Auskeimung der Sporen lebt *P. larvae* zunächst kommensal im Larvendarm, wo er sich massiv vermehrt. *P. larvae* baut die peritrophe Membran ab und geht ab einem bestimmten Zeitpunkt in die invasive Lebensphase über und greift das Darmepithel der Larve an. Nach dem Durchbruch des Darmepithels kommt es mit dem Übertritt von *P. larvae* in das Hämocoel zu einer generalisierten Infektion und zum Tod der Larve. Ziel der vorliegenden Arbeit war die weitere Aufklärung molekularer Details der Wirt-Pathogen-Interaktion im Verlauf der Pathogenese einer Infektion von Bienenlarven mit *P. larvae*. Dazu erfolgte die weitere Untersuchung zweier bereits gezeigter Virulenzfaktoren: das von den *P. larvae* Genotypen ERIC I und ERIC II produzierte PICBP49 sowie das ERIC II-spezifische S-layer Protein SplA.

Zunächst erfolgte die weitere Charakterisierung von PICBP49, einem Virulenzfaktor mit chitinbindender und -abbauender Aktivität. Dieser allgemeine Virulenzfaktor wird sowohl vom *P. larvae* Genotyp ERIC I als auch dem Genotyp ERIC II genutzt, um die peritrophe Membran (PM) abzubauen. Da der Abbau der PM den Übergang von der nicht-invasiven zur invasiven Lebensphase von *P. larvae* markiert und PICBP49 von beiden *P. larvae* Genotypen sezerniert wird, könnte dies ein möglicher Interventionspunkt in der Bekämpfung der AFB sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Gemeinsamkeiten von PICBP49 und CBP21 von *Serratia marcescens*, einem bereits beschriebenen Mitglied der AA10 Familie lytischer Polysaccharid-Monooxygenasen (LPMOs), gezeigt werden. Hierfür wurde *cbp49* erstmals erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert und in funktionellen Assays weiter biochemisch charakterisiert. Neben der Substratpräferenz für β -Chitin konnten die besten Substratumsätze bei zweistündiger Inkubation bei pH 7 beobachtet werden. Diese Ergebnisse sowie das erstmals gezeigte Produktprofil von PICBP49 weisen viele Gemeinsamkeiten mit CBP21 auf. Die Vermutung, dass PICBP49 Chitin wie CBP21 ebenfalls über einen metallionen-abhängigen oxidativen Mechanismus abbaut, konnte weiter bekräftigt werden und die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben die Rahmenbedingungen für vertiefende Studien.

Das ERIC II-spezifische S-layer Protein SplA wurde im Rahmen dieser Arbeit in dem natürlicherweise SplA-defizienten ERIC I Stamm ATCC9545 exprimiert. Die heterologe Expression konnte *in vivo* mit Fluoreszenzfarbstoff markierten monoklonalen Antikörpern und

Fluoreszenzmikroskopie erfolgreich nachgewiesen werden. In Larveninfektionsversuchen mit der ERIC I+*spA* Mutante konnte keine Hypervirulenz im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Die Klonierung eines einzelnen Virulenzfaktors reicht demnach nicht aus, um die Pathogenesestrategie von *P. larvae* ERIC II auszulösen. Es sind also vermutlich noch weitere unbekannte Faktoren notwendig, um die komplexe Pathogenesestrategie auszulösen.

Die Untersuchung der Immunantwort der Larve bei Infektion mit *P. larvae* war bereits Gegenstand einiger Studien und führte meist zu widersprüchlichen Ergebnissen. Der Einfluss des infizierenden *P. larvae* Genotyps wurde dabei nicht weiter beachtet. Durch die in dieser Studie durchgeführte vergleichende Transkriptomanalyse mittels RNA-Seq konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit den *P. larvae* Genotypen ERIC I bzw. ERIC II drei Tage nach Infektion zu einer veränderten Expression immunrelevanter Gene führt. Die gesteigerte Expression antimikrobieller Peptide (AMPs) trat besonders hervor. Je nach infizierendem *P. larvae* Genotyp wurde eine unterschiedliche Kombination von AMPs signifikant exprimiert. Außerdem konnte eine stärkere Immunantwort in ERIC II-infizierten Larven festgestellt werden, was die vermutete Maskierung von *P. larvae* ERIC II durch das S-layer Protein widerlegt. Diese Ergebnisse weisen stark auf eine genotypspezifische Immunantwort der Larve hin. Obwohl Insekten kein adaptives Immunsystem besitzen, konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass nicht nur die Spezies des Pathogens, sondern auch der infizierende Genotyp von entscheidender Bedeutung ist und die Immunantwort des Wirts maßgeblich beeinflusst. Bei der weiteren Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktionen zwischen der Bienenlarve und *P. larvae* muss der infizierende Genotyp des Pathogens ebenfalls berücksichtigt werden.

In einem weiteren Experiment konnte die Analyse der Expression ausgewählter Immungene in individuellen Larven, die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse der RNA-Seq-Daten bestätigten. Neben der Expression unterschiedlicher AMPs, je nach infizierendem Genotyp, konnte eine stärkere Immunreaktion in ERIC II-infizierten Larven bestätigt werden. Da ERIC II-infizierte Larven innerhalb kürzester Zeit versterben und eine stärkere Immunreaktion aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass die aufgebrauchte kostspielige Immunantwort am vorzeitigen Tod der Larve beteiligt sein könnte.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit der allgemeine Virulenzfaktor PICBP49 weiter biochemisch charakterisiert sowie die Pathogenesestrategie von *P. larvae* ERIC II durch die heterologe Expression von *SpA* in *P. larvae* ERIC I weiter untersucht. Darüber hinaus wurde die Immunantwort der Larve untersucht und es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Spezies des Pathogens, sondern auch dessen Genotyp entscheidend für die Immunantwort des Wirts sind. Diese Ergebnisse erweitern das Verständnis molekularer Details der Pathogen-Wirt-Interaktion zwischen *P. larvae* und der Honigbienenlarve.

6. Summary

Further elucidation of molecular details of the host-pathogen interaction during pathogenesis of an infection of bee larvae with *Paenibacillus larvae*

One of the most devastating diseases of honey bees worldwide is the epizootic American Foulbrood (AFB) caused by *Paenibacillus larvae*, which exclusively damages the brood. Honey bee larvae become infected by ingesting spore contaminated food. After germination of the spores in the midgut lumen, *P. larvae* follows a non-invasive, commensal lifestyle and vegetative bacteria start to massively proliferate. After degradation of the peritrophic membrane *P. larvae* switches to an invasive, destructive lifestyle and attacks the midgut epithelium of the larva. After breaching the midgut epithelium, *P. larvae* enters the hemocoel leading to a generalized infection and the death of the host. The aim of this thesis was the further elucidation of molecular details of the host-pathogen interaction during pathogenesis of an infection of bee larvae with *P. larvae*. For this purpose two confirmed virulence factors were further investigated: PICBP49 secreted by *P. larvae* genotypes ERIC I and ERIC II, as well as the ERIC II specific S-layer protein SplA.

At first a further characterization of PICBP49, a virulence factor with chitin-binding and -degrading activity, was performed. This general virulence factor is used by *P. larvae* genotypes ERIC I and ERIC II to degrade the peritrophic membrane (PM). Since the degradation of the PM marks the transition from non-invasive to invasive lifestyle and PICBP49 is secreted from both *P. larvae* genotypes, this could be a possible intervention point in the control of AFB. In context of this work additional similarities of PICBP49 and CBP21 of *Serratia marcescens*, a well described member of the AA10 family of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs), could be demonstrated. Therefore *cbp49* was successfully expressed in *E. coli* and assays were performed to further functionally and biochemically characterize PICBP49. Besides the preference for β -chitin as substrate, the best substrate turnover was achieved after two hours of incubation at pH 7. These results and the first product profile of PICBP49 illustrate many similarities with CBP21. The assumption that PICBP49 degrades chitin substrates like CBP21 over a metal ion-dependent, oxidative mechanism could be sustained and the results of this work describe basic parameters for future in-depth studies.

In this study the ERIC II-specific S-layer Protein SplA was expressed in the naturally SplA-deficient ERIC I strain ATCC9545. The heterologous expression could be verified *in vivo* by fluorescence-labelled monoclonal antibodies and fluorescence microscopy. In exposure bioassays with the ERIC I+*spIA* mutant no hyper-virulence in comparison with the wild type could be detected. Cloning of only one virulence factor is not sufficient to initiate the

complete pathogenetic strategy of *P. larvae* ERIC II. Additional not yet known factors are presumably necessary to trigger the complex pathogenetic strategy.

The investigation of the immune response of larva during an infection with *P. larvae* was already subject of several studies with contradicting results. The influence of the infecting *P. larvae* genotype has been utterly neglected. Through the comparative transcriptome analysis, via RNA-Seq, it could be demonstrated that an infection of larvae with the different *P. larvae* genotypes ERIC I or ERIC II, results in a change of expression of immune-relevant genes three days after infection. The increased expression of antimicrobial peptides (AMPs) was outstanding. Depending on the infecting *P. larvae* genotype different combinations of AMPs were expressed. Furthermore a stronger immune response was observed in ERIC II-infected larvae and the assumed masking of *P. larvae* ERIC II through the S-layer protein could be rejected. These results point to a genotype-specific immune response of larvae to a *P. larvae* infection. Although insects are devoid of an adaptive immune system, in the present study it could be demonstrated that not solely the species of the pathogen, but also the infecting genotype is a crucial factor and has profound influence on the host immune response. Further investigations of the host-pathogen interaction of honey bee larvae and *P. larvae* need to consider the infecting genotype of the pathogen.

In an additional experiment the expression of selected immune-relevant genes was analysed in individual larvae and the results of the comparative transcriptome analysis could be verified. In addition to the expression of different AMPs, depending on the infecting genotype, a stronger immune response in ERIC II-infected larvae could be approved. Since ERIC II-infected larvae die within a very short time and mount a stronger immune response, it seems likely that the costly immune response contributes to the premature death of the larva.

Taken together in this thesis the general virulence factor *PICBP49* was further biochemically characterized. In addition the investigation of the pathogenetic strategy of *P. larvae* ERIC II was advanced through the heterologous expression of SplA in *P. larvae* ERIC I. Furthermore the immune response of the larva was analysed and it could be demonstrated that not only the pathogen species, but also the genotype is crucial for the host immune response. These results broaden our understanding of host-pathogen interaction of honey bee larvae and *P. larvae*.

7. Literaturverzeichnis

Aachmann FL, Sørli M, Skjåk-Bræk G, Eijsink VGH, Vaaje-Kolstad G (2012) NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 18779–18784

Aizen M, Garibaldi L, Cunningham S, Klein A (2008) Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Curr Biol* **18**: 1572-1575

Aizen MA, Harder LD (2009) The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Curr Biol* **19**: 915-918

Alippi AM, Lopez AC, Aguilar OM (2004) A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American Foulbrood of honey bees, at the subspecies level. *Lett Appl Microbiol* **39**: 25-33

Antunez K, Piccini C, Castro-Sowinski S, Rosado AS, Seldin L, Zunino P (2007) Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Veterinary microbiology* **124**: 178-183

Ash C, Priest FG, Collins MD (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**: 253-260

Ashhurst DE (1982) *The Structure and Development of Insect Connective Tissues*, London.

Ashiralieva A, Genersch E (2006) Reclassification, genotypes, and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees - a review. *Apidologie* **37**: 411-420

Bailey L, Ball BV (1991) *Honey Bee Pathology*, New York, London: Academic Press.

Bamrick J-F (1964) Resistance to American foulbrood in honey bees. V. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae. *J Insect Pathol* **6**: 284-304

Bamrick J-F (1967) Resistance to American foulbrood in honey bees. VI. Spore germination in larvae of different ages. *J Invertebr Pathol* **9**: 30-34

Barbehenn RV (2001) Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Arch Insect Biochem Physiol* **47**: 86-99

Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG (2004) Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 373-402

Beveridge TJ, Pouwels PH, Sára M, Kotiranta A, Lounatmaa K, Kari K, Kerosuo E, Haapasalo M, Egelseer EM, Schocher I, Sleytr UB, Morelli L, Callegari M-L, Nomellini JF, Bingle WH, Smit J, Leibovitz E, Lemaire M, Miras I, Salamiou S, Béguin P, Ohayon H, Gounon P, Matuschek M, Sahm K, Bahl H, Grogono-Thomas R, Dworkin J, Blaser MJ,

- Woodland RM, Newell DG, Kessel M, Koval SF (1997) Functions of S-layers. *FEMS Microbiol Rev* **20**: 99-149
- Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK (2007) Bacterial Chitinases: Properties and Potential *Crit Rev Biotechnol* **27**: 21-28
- Billikova K, Hanes J, Nordhoff E, Saenger W, Klaudiny J, Simuth J (2002) Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS Lett* **528**: 125-129
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2**: 907
- Bosco-Drayon V, Poidevin M, Boneca IG, Narbonne-Reveau K, Royet J, Charroux B (2012) Peptidoglycan sensing by the receptor PGRP-LE in the *Drosophila* gut induces immune responses to infectious bacteria and tolerance to microbiota. *Cell Host Microbe* **12**: 153-165
- Boutros M, Agaisse H, Perrimon N (2002) Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Developmental cell* **3**: 711-722
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L (2016) Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* **34**: 525
- Britannica TEoE. (1998) Honey bee. *Encyclopaedia Britannica*. Encyclopaedia Britannica, inc.
- Broderick NA, Welchman DP, Lemaitre B (2009) Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. In *Insect Infection and Immunity: Evolution, Ecology, and Mechanisms.*, Rolff J. SER (ed), 2, pp 13-33. Oxford University Press; 2009.
- Buchon N, Broderick NA, Poidevin M, Pradervand S, Lemaitre B (2009) *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host Microbe* **5**: 200-211
- Buchon N, Silverman N, Cherry S (2014) Immunity in *Drosophila melanogaster* — from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol* **14**: 796
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res* **37**: D233-238
- Carpusca I, Jank T, Aktories K (2006) *Bacillus sphaericus* mosquitocidal toxin (MTX) and pierisin: the enigmatic offspring from the family of ADP-ribosyltransferases. *Molecular microbiology* **62**: 621–630
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Tempst P (1993) Functional and Chemical Characterization of Hymenoptaecin, an Antibacterial Polypeptide That Is Infection-Inducible in the Honeybee (*Apis-Mellifera*). *J Biol Chem* **268**: 7044-7054
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J* **8**: 2387-2391
- Casteels P, Ampe C, Riviere L, Vandamme J, Elicone C, Fleming M, Jacobs F, Tempst P (1990) Isolation and Characterization of Abaecin, a Major Antibacterial Response Peptide in the Honeybee (*Apis-Mellifera*). *Eur J Biochem* **187**: 381-386

- Casteels-Josson K, Zhang W, Capaci T, Casteels P, Tempst P (1994) Acute Transcriptional Response of the Honeybee Peptide-Antibiotics Gene Repertoire and Required Posttranslational Conversion of the Precursor Structures. *J Biol Chem* **269**: 28569-28575
- Caudy A, Ketting R, Hammond S, Denli A, Bathoorn A, Tops B, Silva J, Myers M, Hannon G, Plasterk R (2003) A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* **425**: 411
- Chan QW, Melathopoulos AP, Pernal SF, Foster LJ (2009) The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC Genomics* **10**: 387
- Charroux B, Royet J (2010) *Drosophila* immune response From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. *Fly* **4**: 40-47
- Chu HH, Hoang V, Hofemeister J, Schrempp H (2001) A *Bacillus amyloliquefaciens* ChbB protein binds beta- and alpha-chitin and has homologues in related strains. *Microbiology (Reading, England)* **147**: 1793-1803
- Cornman RS, Lopez D, Evans JD (2013) Transcriptional response of honey bee larvae infected with the bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS One* **8**: e65424
- Crailsheim K, Brodschneider R, Aupinel P, Behrens D, Genersch E, Vollmann J, Riessberger-Gallé U (2013) Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. *J Apicult Res* **52**: 1-15
- Davidson EW (1970) Ultrastructure of peritrophic membrane development in larvae of the worker honey bee (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* **15**: 451-454
- De Gregorio E, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B (2001) Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12590-12595
- De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B (2002) The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J* **21**: 2568-2579
- Descamps T, De Smet L, Stragier P, De Vos P, de Graaf DC (2016) Multiple Locus Variable number of tandem repeat Analysis: A molecular genotyping tool for *Paenibacillus larvae*. *Microb Biotechnol* **9**: 772-781
- Djukic M, Brzuszkiewicz E, Fünfhaus A, Voss J, Gollnow K, Poppinga L, Liesegang H, Garcia-Gonzalez E, Genersch E, Daniel R (2014) How to kill the honey bee larva: Genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PLoS One* **9**: e90914
- dos Santos G, Schroeder AJ, Goodman JL, Strelets VB, Crosby MA, Thurmond J, Emmert DB, Gelbart WM, FlyBase C (2015) FlyBase: introduction of the *Drosophila melanogaster* Release 6 reference genome assembly and large-scale migration of genome annotations. *Nucleic Acids Res* **43**: D690-697
- Doublet V, Poeschl Y, Gogol-Döring A, Alaux C, Annoscia D, Aurori C, Barribeau SM, Bedoya-Reina OC, Brown MJF, Bull JC, Flenniken ML, Galbraith DA, Genersch E, Gisder S, Grosse I, Holt HL, Hultmark D, Lattorff HMG, Le Conte Y, Manfredini F, McMahon DP, Moritz RFA, Nazzi F, Niño EL, Nowick K, van Rij RP, Paxton RJ, Grozinger CM (2017) Unity in

- defence: honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics* **18**: 207
- Drier EA, Huang LH, Steward R (1999) Nuclear import of the *Drosophila* Rel protein Dorsal is regulated by phosphorylation. *Genes Dev* **13**: 556-568
- Dushay MS, Asling B, Hultmark D (1996) Origins of immunity: *Relish*, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10343-10347
- Ebeling J, Fünfhaus A, Knispel H, Krska D, Ravulapalli R, Heney KA, Lugo MR, Merrill AR, Genersch E (2017) Characterization of the toxin Plx2A, a RhoA-targeting ADP-ribosyltransferase produced by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Environ Microbiol* **19**: 5100-5116
- Ebeling J, Knispel H, Hertlein G, Fünfhaus A, Genersch E (2016) Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Applied microbiology and biotechnology* **100**: 7387-7395
- Elsik CG, Worley KC, Bennett AK, Beye M, Camara F, Childers CP, de Graaf DC, Debyser G, Deng J, Devreese B, Elhaik E, Evans JD, Foster LJ, Graur D, Guigo R, teams Hp, Hoff KJ, Holder ME, Hudson ME, Hunt GJ, Jiang H, Joshi V, Khetani RS, Kosarev P, Kovar CL, Ma J, Maleszka R, Moritz RF, Munoz-Torres MC, Murphy TD, Muzny DM, Newsham IF, Reese JT, Robertson HM, Robinson GE, Rueppell O, Solovyev V, Stanke M, Stolle E, Tsuruda JM, Vaerenbergh MV, Waterhouse RM, Weaver DB, Whitfield CW, Wu Y, Zdobnov EM, Zhang L, Zhu D, Gibbs RA, Honey Bee Genome Sequencing C (2014) Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics* **15**: 86
- Evans JD (2003) Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* **83**: 46-50
- Evans JD (2004) Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* **85**: 105-111
- Evans JD (2006) Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *J Invertebr Pathol* **93**: 135-139
- Evans JD, Armstrong TN (2006) Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecol* **6**: 4
- Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* **15**: 645-656
- Evans JD, Lopez DL (2004) Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera : Apidae). *J Econ Entomol* **97**: 752-756
- Evans JD, Pettis JS (2005) Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. *Evolution* **59**: 2270-2274
- Evans JD, Spivak M (2010) Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**: S62-72
- Fagan RP, Fairweather NF (2014) Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat Rev Microbiol* **12**: 211-222

Fan Y, Saito T, Isogai A (2008) Preparation of Chitin Nanofibers from Squid Pen β -Chitin by Simple Mechanical Treatment under Acid Conditions. *Biomacromolecules* **9**: 1919-1923

Flyg C, Kenne K, Boman HG (1980) Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: Phageresistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J Gen Microbiol* **120**: 173-181

Foley E, O'Farrell PH (2003) Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev* **17**: 115-125

Fries I, Camazine S (2001) Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honeybee epidemiology. *Apidologie* **32**: 199-214

Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T, Kobayashi K (1990) A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J Biol Chem* **265**: 11333-11337

Fünfhaus A, Ashiralieva A, Borriss R, Genersch E (2009) Use of suppression subtractive hybridization to identify genetic differences between differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American Foulbrood of honeybees. *Environ Microbiol Rep* **1**: 240-250

Fünfhaus A, Genersch E (2012) Proteome analysis of *Paenibacillus larvae* reveals the existence of a putative S-layer protein. *Environ Microbiol Rep* **4**: 194-202

Fünfhaus A, Poppinga L, Genersch E (2013) Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *Environ Microbiol* **15**: 2951–2965

Garcia-Gonzalez E (2012) Unravelling Pathogenic Molecular Mechanisms of *Paenibacillus larvae* Dr. rer. nat. Thesis, Mathematische-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt University Berlin, Berlin, Deutschland

Garcia-Gonzalez E, Genersch E (2013) Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *Paenibacillus larvae*, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. *Environ Microbiol* **15**: 2894-2901

Garcia-Gonzalez E, Müller S, Enslé P, Süssmuth RD, Genersch E (2014a) Elucidation of sevadicin, a novel non-ribosomal peptide secondary metabolite produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *Environ Microbiol* **16**: 1297-1309

Garcia-Gonzalez E, Müller S, Hertlein G, Heid N, Süssmuth RD, Genersch E (2014b) Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *Microbiologyopen* **3**: 642-656

Garcia-Gonzalez E, Poppinga L, Fünfhaus A, Hertlein G, Hedtke K, Jakubowska A, Genersch E (2014c) *Paenibacillus larvae* chitin-degrading protein PICBP49 is a key virulence factor in American Foulbrood of honey bees. *PLoS pathogens* **10**: e1004284

Gendrin M, Welchman DP, Poidevin M, Herve M, Lemaitre B (2009) Long-Range Activation of Systemic Immunity through Peptidoglycan Diffusion in *Drosophila*. *PLoS pathogens* **5**

Genersch E (2007) *Paenibacillus larvae* and American foulbrood in honeybees. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **120**: 26-33

Genersch E (2010) American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* **103**: S10-S19

Genersch E (2012) Mehr Kontrolle im Seuchenfall. *Deutsches Bienen-Journal*: 8-9

Genersch E, Ashiralieva A, Fries I (2005) Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the causative agent of American foulbrood disease in honey bees. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7551-7555

Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I (2006) Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 501-511

Genersch E, Otten C (2003) The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie* **34**: 195-206

Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JYH, Zhang J (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**: R80

Georgel P, Naitza S, Kappler C, Ferrandon D, Zachary D, Swimmer C, Kopczynski C, Duyk G, Reichhart JM, Hoffmann JA (2001) *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Developmental cell* **1**: 503-514

Gregorc A, Bowen ID (1998) Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Cell Biol Int* **22**: 137-144

Grimont PAD, Grimont F (1978) The genus *Serratia* *Annu Rev Microbiol* **32**: 221-248

Grimont PAD, Grimont F, Lysenko O (1979) Species and biotype identification of *Serratia* strains associated with insects. *Curr Microbiol* **2**: 139-142

Grozinger CM, Robinson GE (2015) The power and promise of applying genomics to honey bee health. *Curr Opin Insect Sci* **10**: 124-132

Han ZS, Ip YT (1999) Interaction and Specificity of Rel-related Proteins in Regulating *Drosophila* Immunity Gene Expression. *J Biol Chem* **274**: 21355-21361

Hasemann L (1961) How long can spores of American foulbrood live? *Am Bee J* **101**: 298-299

Hashimoto M, Ikegami T, Seino S, Ohuchi N, Fukada H, Sugiyama J, Shirakawa M, Watanabe T (2000) Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *Journal of bacteriology* **182**: 3045-3054

Hedengren M, Asling B, Dushay MS, Ando I, Ekengren S, Wihlborg M, Hultmark D (1999) *Relish*, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Molecular cell* **4**: 827-837

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U (2009) New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol* **54**: 285-302

Hejazi A, Falkiner FR (1997) *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol* **46**: 903-912

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* **8**: R19

Hertlein G, Müller S, Garcia-Gonzalez E, Poppinga L, Süssmuth RD, Genersch E (2014) Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS One* **9**: e108272

Hertlein G, Seiffert M, Gensel S, Garcia-Gonzalez E, Ebeling J, Skobalj R, Kuthning A, Süssmuth RD, Genersch E (2016) Biological Role of Paenilarvins, Iturin-Like Lipopeptide Secondary Metabolites Produced by the Honey Bee Pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS One* **11**: e0164656

Heyndrickx M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Janssen P, Kersters K, De Vos P, Logan NA, Ali N, Berkeley RC (1996) Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International journal of systematic bacteriology* **46**: 270-279

Hillyer JF (2016) Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and comparative immunology* **58**: 102-118

Hitchcock J.D., Stoner A., Wilson W.T., D.M. M (1979) Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honeybee larvae of various ages (Hymenoptera: Apidae). *J Kans Entomol Soc* **52**: 238-246

Honigverordnung. Honigverordnung vom 16. Januar 2004 (BGBl. I S. 92), die zuletzt durch Artikel 10 der Verordnung vom 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272) geändert worden ist. In Bundesgesetzblatt (ed.).

Hornitzky M (1998) The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. *J Apicult Res* **37**: 267-271

Hultmark D (2003) *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol* **15**: 12-19

Irving P, Troxler L, Heuer TS, Belvin M, Kopczynski C, Reichhart J-M, Hoffmann JA, Hetru C (2001) A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15119-15124

Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H (2002) A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* **16**: 2497-2508

Jang M-K, Kong B-G, Jeong Y-I, Lee CH, Nah J-W (2004) Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *J of Polym Sci A Polym Chem* **42**: 3423-3432

Jefferson JM, Dolstad HA, Sivalingam MD, Snow JW (2013) Barrier Immune Effectors Are Maintained during Transition from Nurse to Forager in the Honey Bee. *PLoS One* **8**: e54097

- Jimenez DR, Gilliam M (1990) Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. *Cell Tissue Res* **261**: 431-443
- Julian GS, Bulla LA, Jr. (1971) Physiology of sporeforming bacteria associated with insects. IV. Glucose catabolism in *Bacillus* larvae. *Journal of bacteriology* **108**: 828-834
- Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K (2017) KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* **45**: D353-D361
- Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* **28**: 27-30
- Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M (2016) KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* **44**: D457-462
- Kaneko T, Goldman WE, Mellroth P, Steiner H, Fukase K, Kusumoto S, Harley W, Fox A, Golenbock D, Silverman N (2004) Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* **20**: 637-649
- Katznelson H (1950) *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *J Bacteriol* **59**: 153-155
- Khilnani JC (2015) The Effects of Honeybee (*Apis mellifera*) Antimicrobial Peptides on *Paenibacillus larvae*. Master of Science Thesis, University of Nevada, Las Vegas, UNLV Theses, Dissertations, Professional Papers, and Capstones.
- Klaudiny J, Albert S, Bachanova K, Kopernicky J, Simuth J (2005) Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 11-22
- Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc B* **274**: 303-313
- Kolbe S, Fischer S, Becirevic A, Hinz P, Schrempf H (1998) The *Streptomyces reticuli* alpha-chitin-binding protein CHB2 and its gene. *Microbiology (Reading, England)* **144 (Pt 5)**: 1291-1297
- Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Bruijns SCM, Singh SK, Valence F, Molle D, Lortal S, Altermann E, Klaenhammer TR, van Kooyk Y (2008) S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 19474-19479
- Krongdang S, Evans JD, Chen Y, Mookhploy W, Chantawannakul P (2018) Comparative susceptibility and immune responses of Asian and European honey bees to the American foulbrood pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Insect science*: 1-12
- Krska D, Ravulapalli R, Fieldhouse RJ, Lugo MR, Merrill AR (2015) C3larvin toxin, an ADP-ribosyltransferase from *Paenibacillus larvae*. *J Biol Chem* **290**: 1639-1653
- Kuraishi T, Binggeli O, Opota O, Buchon N, Lemaitre B (2011) Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 15966-15971

- Kurita K (2006) Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Mar Biotechnol (NY)* **8**: 203
- Kurz CL, Chauvet S, Andrès E, Aurouze M, Vallet I, Michel GPF, Uh M, Celli J, Filloux A, de Bentzmann S, Steinmetz I, Hoffmann JA, Finlay BB, Gorvel J-P, Ferrandon D, Ewbank JJ (2003) Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by *in vivo* screening. *EMBO J* **22**: 1451-1460
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Langer RC, Vinetz JM (2001) Plasmodium ookinete-secreted chitinase and parasite penetration of the mosquito peritrophic matrix. *Trends Parasitol* **17**: 269-272
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)* **23**: 2947-2948
- Lehane MJ (1997) Peritrophic matrix structure and formation. *Ann Rev Entomol* **42**: 525-550
- Lemaitre B, Hoffmann J (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* **25**: 697-743
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973-983
- Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu J-H, Caroff M, Lee W-J, Mengin-Lecreux D, Lemaitre B (2003) The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol* **4**: 478
- Leulier F, Rodriguez A, Khush RS, Abrams JM, Lemaitre B (2000) The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist Gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep* **1**: 353-358
- Lindström A (2008) Distribution of *Paenibacillus larvae* spores among adult honey bees (*Apis mellifera*) and the relationship with clinical symptoms of American foulbrood. *Microb Ecol* **56**: 253-259
- Lodesani M, Costa M (2005) Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues. *Bee World* **86**: 102-109
- Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* **42**: D490-495
- Loose JSM, Forsberg Z, Fraaije MW, Eijsink VGH, Vaaje-Kolstad G (2014) A rapid quantitative activity assay shows that the *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA is an active lytic polysaccharide monoxygenase. *FEBS Lett* **588**: 3435-3440
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550
- Mahlen SD (2011) *Serratia* Infections: from Military Experiments to Current Practice. *Clin Microbiol Rev* **24**: 755-+

- Mandel M, Higa A (1970) Calcium-Dependent Bacteriophage DNA Infection. *J Mol Biol* **53**: 159-&
- Manjeet K, Purushotham P, Neeraja C, Podile AR (2013) Bacterial chitin binding proteins show differential substrate binding and synergy with chitinases. *Microbiol Res* **168**: 461-468
- Martel AC, Zeggane S, Drajnudel P, Faucon JP, Aubert M (2006) Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Addit Contam* **23**: 265-273
- Mehmood MA, Xiao X, Hafeez FY, Gai YB, Wang FP (2011) Molecular characterization of the modular chitin binding protein Cbp50 from *Bacillus thuringiensis* serovar konkukian. *Antononie Van Leeuwenhoek* **100**: 445-453
- Mekasha S, Forsberg Z, Dalhus B, Bacik JP, Choudhary S, Schmidt-Dannert C, Vaaje-Kolstad G, Eijsink VG (2016) Structural and functional characterization of a small chitin-active lytic polysaccharide monoxygenase domain of a multi-modular chitinase from *Jonesia denitrificans*. *FEBS Lett* **590**: 34-42
- Miyagi T, Peng CY, Chuang RY, Mussen EC, Spivak MS, Doi RH (2000) Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *J Invertebr Pathol* **75**: 95-96
- Morrissey BJ, Helgason T, Poppinga L, Funfhaus A, Genersch E, Budge GE (2015) Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. *Environ Microbiol* **17**: 1414-1424
- Morse RA, Calderon NW (2000) The value of honey bee pollination in the United States. *Bee Culture* **128**: 1-15
- Moser F, Irwin D, Chen S, Wilson DB (2008) Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8. *Biotechnol Bioeng* **100**
- Murray KD, Aronstein KA (2008) Transformation of the Gram-positive honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*, by electroporation. *J Microbiol Meth* **75**: 325-328
- Mussen EC (2000) Antibiotic-resistant American foulbrood. *Am Bee J* **140**: 300-301
- Nakagawa YS, Kudo M, Loose JSM, Ishikawa T, Totani K, Eijsink VGH, Vaaje-Kolstad G (2015) A small lytic polysaccharide monoxygenase from *Streptomyces griseus* targeting α - and β -chitin. *FEBS J* **282**: 1065-1079
- Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y (2000) Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* **4**: 423-430
- Nehme NT, Liegeois S, Kele B, Giammarinaro P, Pradel E, Hoffmann JA, Ewbank JJ, Ferrandon D (2007) A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS pathogens* **3**: e173
- Neuendorf S, Hedtke K, Tangen G, Genersch E (2004) Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology (Reading, England)* **150**: 2381-2390
- Neyen C, Lemaître B (2016) Sensing Gram-negative bacteria: a phylogenetic perspective. *Curr Opin Immunol* **38**: 8-17

- Ohe Wvd (2003) Control of American Foulbrood by using alternatively eradication method and artificial swarms. *Apiacta* **38**: 137–139
- Oldroyd BP (2007) What's Killing American Honey Bees? *PLOS Biology* **5**: e168
- Paredes JC, Welchman DP, Poidevin M, Lemaitre B (2011) Negative regulation by amidase PGRPs shapes the *Drosophila* antibacterial response and protects the fly from innocuous infection. *Immunity* **35**: 770-779
- Park JM, Brady H, Ruocco MG, Sun H, Williams D, Lee SJ, Kato T, Jr., Richards N, Chan K, Mercurio F, Karin M, Wasserman SA (2004) Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* **18**: 584-594
- Paspaliari DK, Loose JSM, Larsen MH, Vaaje-Kolstad G (2015) *Listeria monocytogenes* has a functional chitinolytic system and an active lytic polysaccharide monoxygenase. *FEBS J* **282**: 921-936
- Peng CYS, Mussen EC, Fong A, Montague MA, Tyler T (1992) Effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared *in vitro*. *J Invertebr Pathol* **60**: 127-133
- Pernal SF, Albright RL, Melathopoulos AP (2008) Evaluation of the shaking technique for the economic management of American foulbrood disease of honey bees (Hymenoptera : *Apidae*). *J Econ Entomol* **101**: 1095-1104
- Peters M, Kilwinski J, Beringhoff A, Reckling D, Genersch E (2006) American foulbrood of the honey bee: Occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia). *J Vet Med B* **53**: 100-104
- Peters W (1992) *Peritrophic Membranes*, Berlin: Springer.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Piccini C, Zunino P (2001) American foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline. *J Invertebr Pathol* **78**: 176-177
- Poppinga L (2012) Unterschiede in der Pathogenese der Amerikanischen Faulbrut bei Honigbienen: Entwicklung molekularer Werkzeuge und funktionelle Charakterisierung von Virulenzfaktoren. Dr. rer. nat. Thesis, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin, Berlin
- Poppinga L, Genersch E (2012) Heterologous expression of green fluorescent protein in *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. *J Appl Microbiol* **112**: 430-435
- Poppinga L, Genersch E (2015) Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae. *Curr Opin Insect Sci* **10**: 29-36
- Poppinga L, Janesch B, Fünfhaus A, Sekot G, Garcia-Gonzalez E, Hertlein G, Hedtke K, Schäffer C, Genersch E (2012) Identification and functional analysis of the S-layer protein SplA of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. *PLoS pathogens* **8**: e1002716

- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* **25**: 345-353
- Potts SG, Imperatriz-Fonseca V, Ngo HT, Aizen MA, Biesmeijer JC, Breeze TD, Dicks LV, Garibaldi LA, Hill R, Settele J, Vanbergen AJ (2016) Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature* **540**: 220
- Purushotham P, Arun PVPS, Prakash JSS, Podile AR (2012) Chitin Binding Proteins Act Synergistically with Chitinases in *Serratia proteamaculans* 568. *PLOS One* **7**: e36714
- R Development Core Team. (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rahnamaeian M, Cytryńska M, Zdybicka-Barabas A, Dobszlaff K, Wiesner J, Twyman RM, Zuchner T, Sadd BM, Regoes RR, Schmid-Hempel P, Vilcinskas A (2015) Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **282**
- Rämet M, Lanot R, Zachary D, Manfruelli P (2002) JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol* **241**: 145-156
- Rauch S, Ashiralieva A, Hedtke K, Genersch E (2009) Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees. *Appl Environ Microbiol* **75**: 3344-3347
- Richards AG, Richards PA (1977) The peritrophic membranes of insects. *Annu Rev Entomol* **22**: 219-240
- Riesgo-Escovar JR, Hafen E (1997) Common and distinct roles of DFos and DJun during *Drosophila* development. *Science* **278**: 669-672
- Royet J, Dziarski R (2007) Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat Rev Microbiol* **5**: 264
- Saito A, Miyashita K, Biukovic G, Schrepf H (2001) Characteristics of a *Streptomyces coelicolor* A3(2) extracellular protein targeting chitin and chitosan. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1268-1273
- Schäfer MO, Genersch E, Fünfhaus A, Poppinga L, Formella N, Bettin B, Karger A (2014) Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Veterinary microbiology* **170**: 291-297
- Schleifer KH, Kandler O (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews* **36**: 407-477
- Schnellmann J, Zeltins A, Blaak H, Schrepf H (1994) The novel lectin-like protein CHB1 is encoded by a chitin-inducible *Streptomyces olivaceoviridis* gene and binds specifically to crystalline alpha-chitin of fungi and other organisms. *Molecular microbiology* **13**: 807-819
- Sekot G, Posch G, Messner P, Matejka M, Rausch-Fan X, Andrukhov O, Schäffer C (2011) Potential of the *Tannerella forsythia* S-layer to delay the immune response. *J Dent Res* **90**: 109-114

- Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Nakamura LK, Komagata K (1997) Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdolanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *International journal of systematic bacteriology* **47**: 289-298
- Sleytr UB, Egelseer EM, Ilk N, Pum D, Schuster B (2007a) S-Layers as a basic building block in a molecular construction kit. *FEBS J* **274**: 323-334
- Sleytr UB, Huber C, Ilk N, Pum D, Schuster B, Egelseer EM (2007b) S-layers as a tool kit for nanobiotechnological applications. *FEMS Microbiol Lett* **267**: 131-144
- Soneson C, Love MI, Robinson MD (2015) Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res* **4**: 1521
- Spivak M, Reuter GS (2001) Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* **32**: 555-565
- Spivak MG, M. (1998) Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Part I. Hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. *Bee World* **79**: 124-134
- Spivak MS, Gilliam M (1998) Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Part II. Studies on the hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. *Bee World* **79**: 169-186
- Steffan-Dewenter I, Munzenberg U, Burger C, Thies C, Tschardt T (2002) Scale-dependent effects of landscape context on three pollinator guilds. *Ecology* **83**: 1421-1432
- Steffan-Dewenter I, Potts SG, Packer L (2005) Pollinator diversity and crop pollination services are at risk. *Trends Ecol Evol* **20**: 651-652; author reply 652-653
- Sturtevant AP (1932) Relation of commercial honey to the spread of American foulbrood. *J Agr Res* **45**: 257-285
- Suzuki K, Suzuki M, Taiyoji M, Nikaidou N, Watanabe T (1998) Chitin binding protein (CBP21) in the culture supernatant of *Serratia marcescens* 2170. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **62**: 128-135
- Tarr HLA (1937) Studies on American foulbrood of bees. I. The relative pathogenicity of vegetative cells and endospores of *Bacillus larvae* for the brood of the bee. *Ann Appl Biol* **24**: 377-384
- Terra WR (2001) The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol* **47**: 47-61
- TSN-Tiergesundheitsjahresberichte F. (2008-2012) Jahresberichte vom Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI). Friedrich-Loeffler-Institut.
- Vaaje-Kolstad G, Bohle LA, Gaseidnes S, Dalhus B, Bjoras M, Mathiesen G, Eijsink VG (2012) Characterization of the chitinolytic machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and high-resolution structure of its oxidative CBM33 enzyme. *J Mol Biol* **416**: 239-254

- Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, van Aalten DM, Synstad B, Eijsink VG (2005a) The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem* **280**: 28492-28497
- Vaaje-Kolstad G, Houston DR, Riemen AH, Eijsink VG, van Aalten DM (2005b) Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. *J Biol Chem* **280**: 11313-11319
- Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, H. Z, Sørli M, Eijsink VGH (2010) An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* **330**: 219-222
- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* **5**: 25-40
- VO (EG) 470/2009. Verordnung (EG) Nr. 470/2009 des europäischen Parlaments und des Rates vom 6. Mai 2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates und zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates (Text von Bedeutung für den EWR). VO EG 470/2009. Amtsblatt der europäischen Union, pp. L152/111-L152/122.
- VO (EU) 37/2010. Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Text von Bedeutung für den EWR). In EU (ed.), VO EU 37/2010. Amtsblatt der Europäischen Union, DE, pp. L15/11-L15/72.
- Watanabe T, Ito Y, Yamada T, Hashimoto M, Sekine S, Tanaka H (1994) The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation. *Journal of bacteriology* **176**: 4465-4472
- Waterhouse DF (1957) Digestion in Insects. *Annu Rev Entomol* **2**: 1-18
- Weinstock GM, Robinson GE, Gibbs RA, Worley KC, Evans JD, Maleszka R, Robertson HM, Weaver DB, Beye M, Bork P, Elsik CG, Hartfelder K, Hunt GJ, Zdobnov EM, Amdam GV, Bitondi MMG, Collins AM, Cristino AS, Lattorff HMG, Lobo CH, Moritz RFA, Nunes FMF, Page RE, Simoes ZLP, Wheeler D, Carninci P, Fukuda S, Hayashizaki Y, Kai C, Kawai J, Sakazume N, Sasaki D, Tagami M, Albert S, Baggerman G, Beggs KT, Bloch G, Cazzamali G, Cohen M, Drapeau MD, Eisenhardt D, Emore C, Ewing MA, Fahrbach SE, Foret S, Grimmekhuijzen CJP, Hauser F, Hummon AB, Huybrechts J, Jones AK, Kadowaki T, Kaplan N, Kucharski R, Lebouille G, Linial M, Littleton JT, Mercer AR, Richmond TA, Rodriguez-Zas SL, Rubin EB, Sattelle DB, Schlipalius D, Schoofs L, Shemesh Y, Sweedler JV, Velarde R, Verleyen P, Vierstraete E, Williamson MR, Ament SA, Brown SJ, Corona M, Dearden PK, Dunn WA, Elekonich MM, Fujiyuki T, Gattermeier I, Gempe T, Hasselmann M, Kadowaki T, Kage E, Kamikouchi A, Kubo T, Kucharski R, Kunieda T, Lorenzen MD, Milshina NV, Morioka M, Ohashi K, Overbeek R, Ross CA, Schioett M, Shippy T, Takeuchi H, Toth AL, Willis JH, Wilson MJ, Gordon KHJ, Letunic I, Hackett K, Peterson J, Felsenfeld A, Guyer M, Solignac M, Agarwala R, Cornuet JM, Monnerot M, Mouguel F, Reese JT, Vautrin D, Gillespie JJ, Cannone JJ, Gutell RR, Johnston JS, Eisen MB, Iyer VN, Iyer V, Kosarev P, Mackey AJ, Solovyev V, Souvorov A, Aronstein KA, Bilikova K, Chen YP, Clark AG, Decanini LI, Gelbart WM, Hetru C, Hultmark D, Imler JL, Jiang HB, Kanost M, Kimura K, Lazzaro BP, Lopez DL, Simuth J, Thompson GJ, Zou Z, De Jong P, Sodergren E, Csuros M, Milosavljevic

A, Osoegawa K, Richards S, Shu CL, Duret L, Elhaik E, Graur D, Anzola JM, Campbell KS, Childs KL, Collinge D, Crosby MA, Dickens CM, Grametes LS, Grozinger CM, Jones PL, Jorda M, Ling X, Matthews BB, Miller J, Mizzen C, Peinado MA, Reid JG, Russo SM, Schroeder AJ, St Pierre SE, Wang Y, Zhou PL, Jiang HY, Kitts P, Ruef B, Venkatraman A, Zhang L, Aquino-Perez G, Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Sheppard WS, Smith DR, Suarez AV, Tsutsui ND, Wei XH, Wheeler D, Havlak P, Li BS, Liu Y, Sodergren E, Jolivet A, Lee S, Nazareth LV, Pu LL, Thorn R, Stolc V, Newman T, Samanta M, Tongprasit WA, Claudianos C, Berenbaum MR, Biswas S, de Graaf DC, Feyereisen R, Johnson RM, Oakeshott JG, Ranson H, Schuler MA, Muzny D, Chacko J, Davis C, Dinh H, Gill R, Hernandez J, Hines S, Hume J, Jackson L, Kovar C, Lewis L, Miner G, Morgan M, Nguyen N, Okwuonu G, Paul H, Santibanez J, Savery G, Svatek A, Villasana D, Wright R, Consort HGS (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**: 931-949

White GF (1906) The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. *USDA, Bureau of Entomology, Technical Series* **14**: 1-50

Whitten MM, Shiao SH, Levashina EA (2006) Mosquito midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology. *Parasite Immunol* **28**: 121-130

Wilson EO (1975) *Sociobiology: The Abridged Edition*, Cambridge, Massachusetts and London, England: The Belknap Press of Harvard University Press.

Wilson WT (1971) Resistance to American foulbrood in honey bees. XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. *J Invertebr Pathol* **17**: 247-255

Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH, Starks PT (2009) Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annu Rev Entomol* **54**: 405-423

Woodrow AW (1942) Susceptibility of honeybee larvae to individual inoculations with spores of *Bacillus larvae*. *J Econ Entomol* **35**: 892-895

Woodrow AW, Holst EC (1942) The mechanism of colony resistance to American foulbrood. *J Econ Entomol* **35**: 327-330

Yu G, Baeder DY, Regoes RR, Rolff J (2016) Combination Effects of Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 1717-1724

Yue D, Nordhoff M, Wieler LH, Genersch E (2008) Fluorescence *in situ*-hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol* **10**: 1612-1620

Zaidman-Remy A, Herve M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, Blanot D, Oh BH, Ueda R, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B (2006) The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity* **24**: 463-473

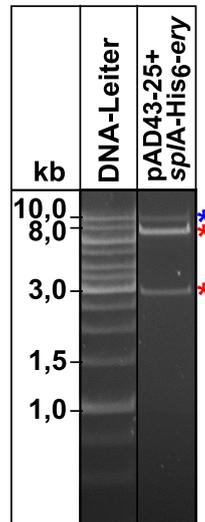
Zarschler K, Janesch B, Zayni S, Schaffer C, Messner P (2009) Construction of a gene knockout system for application in *Paenibacillus alvei* CCM 2051T, exemplified by the S-layer glycan biosynthesis initiation enzyme WsfP. *Appl Environ Microbiol* **75**: 3077-3085

Zhai Z, Boquete JP, Lemaitre B (2018) Cell-Specific Imd-NF-kappaB Responses Enable Simultaneous Antibacterial Immunity and Intestinal Epithelial Cell Shedding upon Bacterial Infection. *Immunity* **48**: 897-910 e897

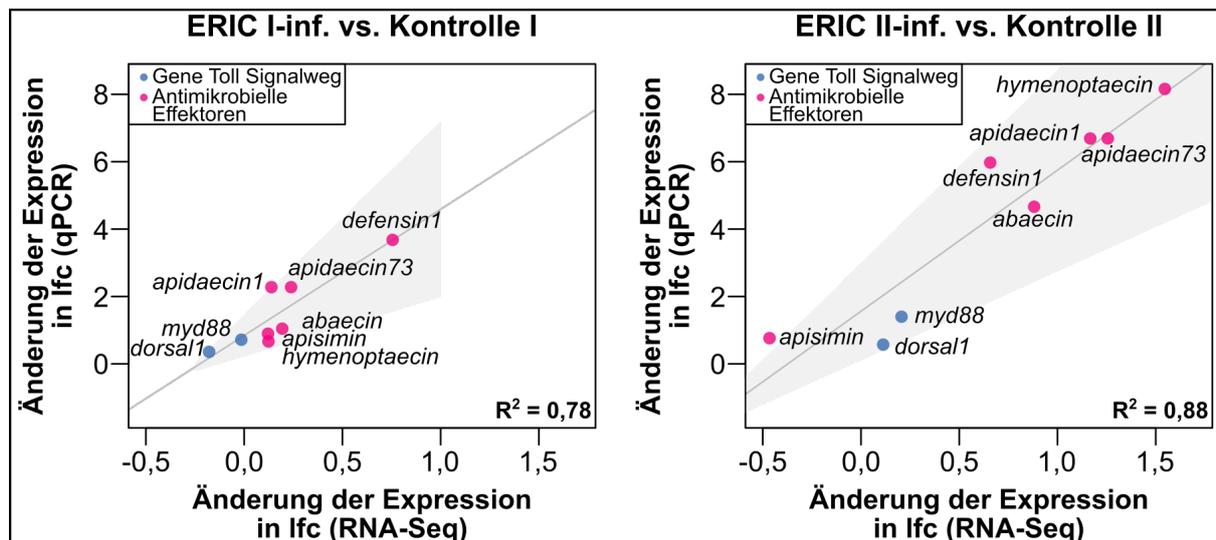
Zou Z, Lopez DL, Kanost MR, Evans JD, Jiang HB (2006) Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Mol Biol* **15**: 603-614

8. Anhang

8.1. Zusätzliche Abbildungen

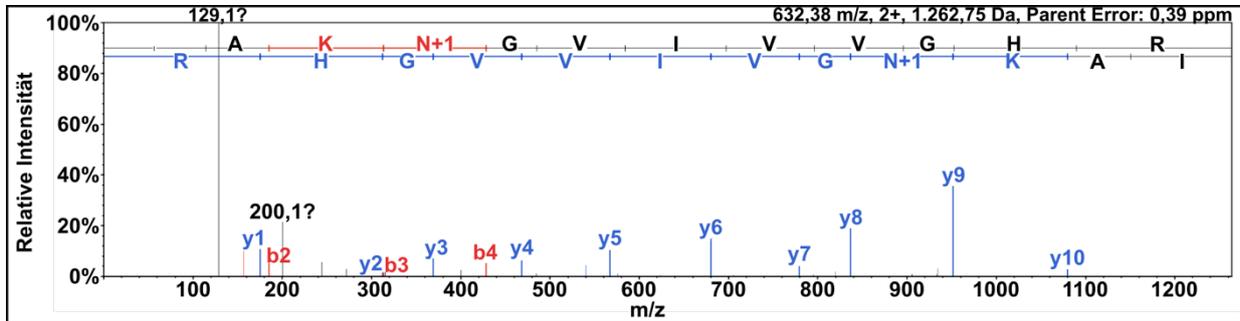


Zusätzliche Abbildung A 1: Erfolgreiche Klonierung von *sp/A-His₆* in den Vektor pAD43-25-ery. Der Restriktionsenzymverdau mit den Enzymen *Xba*I und *Sph*I und anschließender Auftrennung des Verdau mittels Gelelektrophorese zeigte 2 Banden korrekter Größe. Die mit einem roten Stern markierten Banden entsprechen dem inserierten *sp/A* (3051bp) und dem Plasmidrückgrat (8020 bp). Bei der obersten Bande bei ca. 10,0 kb (blauer Stern) handelt es sich um nicht verdauten Vektor.



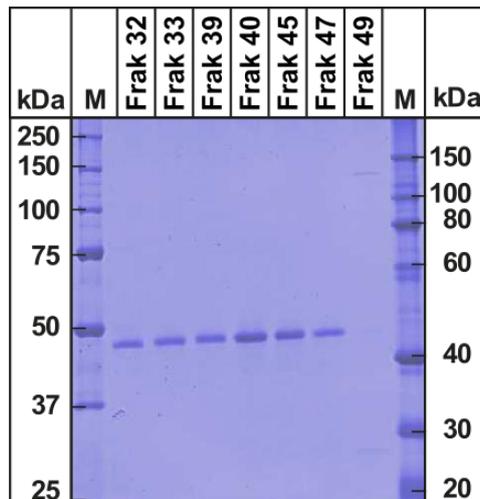
Zusätzliche Abbildung A 2: Änderung der Expression ausgewählter Gene aus der qPCR und der RNA-Seq-Analyse. Dargestellt sind die Änderungen der Expression in lfc (log₂fold change) für sechs ausgewählte Gene untersucht mittels qPCR (y-Achse) und RNA-Seq (x-Achse). Das

Konfidenzintervall für das Konfidenzniveau von 95% ist grau unterlegt. Der R^2 -Wert des entsprechenden linearen Modells ist in der rechten unteren Ecke angegeben.



| | |
|-------------------|--|
| Sequence coverage | |
| Protein | chitin-binding protein 49 [<i>Paenibacillus larvae</i>] |
| Accession | gi 402172923 |
| Prob | 100% |
| %Spec | 1,6% |
| #Pep | 45 |
| #Unique | 67 |
| #Spec | 96 |
| %Cov | 74% |
| m.w. | 49 kDa |

Zusätzliche Abbildung A 3: MS-Orbitrap Spektrum und Sequenzanalyse der unteren Bande des recPICBP49. Bei der unteren Bande handelt es sich um recPICBP49 mit N-terminaler CBM33 Domäne und 2 FN-III-Domänen, die C-terminale CBM5/12 Domäne fehlt jedoch (vgl. Abb. 12).



Zusätzliche Abbildung A 4: SDS-PAGE Analyse von Äkta-Fractionen nach Aufreinigung von *P. larvae* Überständen über Chitin Resin (NEB) mittels Affinitätschromatographie. Auf der Höhe von 49 kDa ist lediglich eine Bande detektierbar. PICBP49 liegt in der natürlichen Form mit 4 Domänen vor. M = Marker

8.2. Zusätzliche Tabellen

Tab. Z1: Zugeordnete Fragmentanzahlen der RNA-Seq Poolproben

| | Probe | zugeordnete Fragmentanzahl (gesamt) | mehrfach zugeordnete Fragmentanzahlen | eindeutig zugeordnete Fragmentanzahlen |
|-----------------------------|-------------|---|---|--|
| Experimentelle Gruppe I | ATCC9545 d | 7065046 | 260922 | 6804124 |
| | ATCC9545 e | 7822669 | 282969 | 7539700 |
| | ATCC9545 f | 6871163 | 290035 | 65811264 6581128 |
| | Kontrolle d | 8998898 | 301434 | 8697464 |
| | Kontrolle e | 9331242 | 321118 | 9010124 |
| | Kontrolle f | 8959696 | 309968 | 8649728 |
| Experimentelle Gruppe II | DSM25430 d | 3743951 | 168923 | 3575028 |
| | DSM25430 e | 7110330 | 283836 | 6826494 |
| | DSM25430 f | 9573386 | 328610 | 9244776 |
| | Kontrolle d | 9019846 | 312664 | 8707182 |
| | Kontrolle e | 8520775 | 295760 | 8225015 |
| | Kontrolle f | 9805112 | 332929 | 9472183 |

Tab. Z2: Anzahl differentiell exprimierter Gene (DEGs) in den experimentellen Gruppen. Die Sortierung der DEGs in extrem hochregulierte Gene ("++", $lfc > 1$), hochregulierte Gene ("+", $0 < lfc < 1$), herunterregulierte Gene ("-", $-1 < lfc < 0$) und extrem herunterregulierte Gene ("--", $lfc < -1$). Die Vergleich der Anzahl der DEGs erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test (Homogenitätstest).

| | $lfc > 1$ ++ | $0 < lfc < 1$ + | $(-1) < lfc < 0$ - | $lfc < (-1)$ -- |
|---|-----------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| Experimentelle Gruppe I (ERIC I-inf. vs. nicht-inf. Kontrolle I) | 9 | 102 | 91 | 3 |
| Experimentelle Gruppe II (ERIC II-inf. vs. nicht-inf. Kontrolle II) | 40 | 127 | 134 | 10 |
| Chi-Quadrat-Test (p -Wert) | | *** 0,0007832 | | ** 0,001191 |

Tab. Z3: DESeq2-Werte von Genen mit Zuordnung zu Signalwegen.

| gene | ERIC I vs. control I | | | ERIC II vs. control II | | | pathway | ID | gene ID | BEEBASE ID | name_gff | description |
|------------------|----------------------|-----------------|--------|------------------------|-----------------|--------|---------|------------|---------|---------------------------|----------|---|
| | base Mean | log2Fold Change | padj | base Mean | log2Fold Change | padj | | | | | | |
| gene10328_412536 | 56,62 | 0,09 | 0,8681 | 56,62 | 0,04 | 0,9668 | Toll | gene 10328 | 412536 | GB17012 | serpin-1 | serine protease inhibitor 1 |
| gene1279_725154 | 353,87 | 0,45 | 0,1509 | 353,87 | 0,72 | 0,0111 | Toll | gene 1279 | 725154 | GB14044 | SP14 | serine protease 14 myeloid differentiation primary response factor 88 |
| gene2252_413194 | 233,34 | -0,01 | 0,9795 | 233,34 | 0,21 | 0,6693 | Toll | gene 2252 | 413194 | GB12344 | Myd88 | TNF-receptor-associated factor 6 |
| gene237_551819 | 86,82 | -0,28 | 0,4472 | 86,82 | -0,13 | 0,8370 | Toll | gene 237 | 551819 | GB10539 | Traf6 | toll like receptor 1 |
| gene2929_412703 | 465,51 | -0,01 | 0,9916 | 465,51 | 0,14 | 0,8486 | Toll | gene 2929 | 412703 | GB18520 | Toll-1 | NF-kappa-B inhibitor cactus 1 |
| gene3079_725124 | 349,29 | 0,22 | 0,6237 | 349,29 | 0,34 | 0,5149 | Toll | gene 3079 | 725124 | GB10655 | cact1 | NF-kappa-B inhibitor cactus 2 |
| gene3108_411012 | 446,70 | 0,66 | 0,0304 | 446,70 | 0,65 | 0,0284 | Toll | gene 3108 | 411012 | GB13520 | cact2 | |
| gene3119_406086 | 446,25 | -0,18 | 0,6618 | 446,25 | 0,11 | 0,8609 | Toll | gene 3119 | 406086 | GB19066, GB19537, GB30211 | DI | dorsal |
| gene3365_552594 | 883,67 | 0,14 | 0,6828 | 883,67 | 0,12 | 0,8201 | Toll | gene 3365 | 552594 | GB13677 | cactin | cactin protein |
| gene4970_411712 | 5,06 | 0,44 | NA | 5,06 | 0,28 | NA | Toll | gene 4970 | 411712 | GB18032 | DI-2 | dorsal-2 |
| gene5221_725368 | 286,61 | -0,30 | 0,3435 | 286,61 | -0,18 | 0,7083 | Toll | gene 5221 | 725368 | GB15684 | tub | tube protein |
| gene5227_552034 | 342,65 | -0,01 | 0,9835 | 342,65 | -0,01 | 0,9873 | Toll | gene 5227 | 552034 | GB17961 | Tollip | toll interacting protein |
| gene5890_727472 | 109,97 | 0,10 | 0,8672 | 109,97 | 0,41 | 0,4876 | Toll | gene 5890 | 727472 | GB17879 | PGRP-S3 | peptidoglycan recognition protein S3 |
| gene6386_552778 | 172,53 | 0,00 | 0,9980 | 172,53 | -0,02 | 0,9788 | Toll | gene 6386 | 552778 | GB11883 | cact3 | NF-kappa-B inhibitor cactus 3 |

Tab. Z3: DESeq2-Werte von Genen mit Zuordnung zu Signalwegen.

| gene | ERIC I vs. control I | | | ERIC II vs. control II | | | pathway | ID | gene ID | BEEBASE ID | name_gff | description |
|------------------|----------------------|-----------------|--------|------------------------|-----------------|--------|---------|------------|---------|------------|-----------|---------------------------------------|
| | base Mean | log2Fold Change | padj | base Mean | log2Fold Change | padj | | | | | | |
| gene6568_413749 | 2871,97 | 0,13 | 0,6475 | 2871,97 | 0,26 | 0,4012 | Toll | gene 6568 | 413749 | GB19582 | serpin-5 | serine protease inhibitor 5 |
| gene6581_410229 | 141,69 | 0,52 | 0,1831 | 141,69 | 0,34 | 0,5414 | Toll | gene 6581 | 410229 | GB17781 | Toll-6 | toll like receptor 6 |
| gene6583_410231 | 58,40 | -0,04 | 0,9558 | 58,40 | -0,04 | 0,9668 | Toll | gene 6583 | 410231 | GB10640 | Toll-8 | toll like receptor 8 |
| gene6630_410235 | 47,38 | 0,01 | 0,9910 | 47,38 | 0,07 | 0,9433 | Toll | gene 6630 | 410235 | GB16299 | Toll-10 | toll like receptor 10 |
| gene7612_408317 | 119,34 | -0,07 | 0,9208 | 119,34 | -0,39 | 0,5223 | Toll | gene 7612 | 408317 | GB13812 | spz6 | spatzle 6 |
| gene7617_409070 | 808,88 | -0,13 | 0,6180 | 808,88 | -0,18 | 0,5645 | Toll | gene 7617 | 409070 | GB16970 | Pli | pellino |
| gene8074_725353 | 181,69 | -0,06 | 0,9131 | 181,69 | 0,14 | 0,8421 | Toll | gene 8074 | 725353 | GB11869 | spz2 | spatzle 2 |
| gene8106_551608 | 211,58 | -0,08 | 0,8752 | 211,58 | -0,05 | 0,9515 | Toll | gene 8106 | 551608 | GB16397 | pelle | serine/threonine-protein kinase pelle |
| gene8573_725158 | 55,57 | 0,11 | 0,8625 | 55,57 | -0,17 | 0,8341 | Toll | gene 8573 | 725158 | GB15371 | PGRP-S1 | peptidoglycan recognition protein S1 |
| gene8574_412484 | 83,71 | 0,39 | 0,3147 | 83,71 | 0,89 | 0,0064 | Toll | gene 8574 | 412484 | GB19301 | Pgrp-s2 | peptidoglycan recognition protein S2 |
| gene9395_724250 | 50,59 | 0,06 | 0,9185 | 50,59 | 0,20 | 0,7850 | Toll | gene 9395 | 724250 | GB17927 | SP10 | serine protease 10 |
| gene9565_726698 | 263,19 | -0,07 | 0,8272 | 263,19 | -0,20 | 0,5509 | Toll | gene 9565 | 726698 | GB15640 | SP13 | serine protease 13 |
| gene9835_552646 | 228,34 | 0,01 | 0,9894 | 228,34 | -0,23 | 0,5547 | Toll | gene 9835 | 552646 | GB19492 | LOC552646 | K(lysine) acetyltransferase 2A |
| gene10115_552062 | 100,69 | 0,11 | 0,8210 | 100,69 | -0,11 | 0,8759 | RNAi | gene 10115 | 552062 | GB12654 | AGO1 | argonaute 1 |
| gene1104_726766 | 393,42 | -0,20 | 0,4107 | 393,42 | 0,26 | 0,3814 | RNAi | gene 1104 | 726766 | GB15170 | LOC726766 | endoribonuclease Dicer-like |
| gene1350_725388 | 316,96 | -0,17 | 0,5016 | 316,96 | -0,22 | 0,4809 | RNAi | gene 1350 | 725388 | GB15508 | armi | armitage |

Tab. Z3: DESeq2-Werte von Genen mit Zuordnung zu Signalwegen.

| gene | ERIC I vs. control I | | | ERIC II vs. control II | | | pathway | ID | gene ID | BEEBASE ID | name_gff | description |
|-----------------|----------------------|-----------------|--------|------------------------|-----------------|--------|---------|-----------|---------|------------|-----------|---|
| | base Mean | log2Fold Change | padj | base Mean | log2Fold Change | padj | | | | | | |
| gene2125_410968 | 225,60 | -0,10 | 0,7527 | 225,60 | 0,15 | 0,6909 | RNAi | gene 2125 | 410968 | GB12740 | drosha | drosha protein |
| gene2158_408762 | 148,03 | -0,31 | 0,4294 | 148,03 | 0,15 | 0,8214 | RNAi | gene 2158 | 408762 | GB12617 | Pimet | piRNA methyltransferase |
| gene3533_727113 | 172,21 | -0,41 | 0,2244 | 172,21 | -0,38 | 0,3682 | RNAi | gene 3533 | 727113 | GB13563 | spn-E | spindle E |
| gene3617_552127 | 229,18 | -0,33 | 0,3462 | 229,18 | -0,13 | 0,8388 | RNAi | gene 3617 | 552127 | GB11966 | Dcr-1 | endoribonuclease Dicer-1 |
| gene4746_409410 | 15092,75 | -0,21 | 0,3532 | 15092,75 | -0,31 | 0,1737 | RNAi | gene 4746 | 409410 | GB14907 | LOC409410 | uncharacterized LOC409410 |
| gene4933_552259 | 3299,55 | -0,62 | 0,0008 | 3299,55 | -0,61 | 0,0002 | RNAi | gene 4933 | 552259 | GB12860 | Tudor-SN | tudor-SN protein |
| gene5409_414009 | 95,47 | 0,38 | 0,3794 | 95,47 | -0,10 | 0,9097 | RNAi | gene 5409 | 414009 | GB18188 | LOC414009 | microprocessor complex subunit DGCR8-like |
| gene5744_409557 | 181,08 | 0,05 | 0,9209 | 181,08 | 0,36 | 0,3852 | RNAi | gene 5744 | 409557 | GB17844 | mael | maelstrom |
| gene6870_411577 | 662,91 | -0,13 | 0,7014 | 662,91 | 0,48 | 0,0835 | RNAi | gene 6870 | 411577 | GB15464 | AGO2 | argonaute 2 |
| gene724_409093 | 3148,59 | 0,19 | 0,3557 | 3148,59 | -0,04 | 0,9181 | RNAi | gene 724 | 409093 | GB10259 | Chro | chromator |
| gene8218_410395 | 1302,25 | -0,02 | 0,9529 | 1302,25 | -0,21 | 0,5315 | RNAi | gene 8218 | 410395 | GB11864 | LOC410395 | chromobox protein homolog 1-like |
| gene8744_726768 | 1539,11 | -0,17 | 0,4107 | 1539,11 | -0,16 | 0,5944 | RNAi | gene 8744 | 726768 | GB15283 | LOC726768 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17 |
| gene8782_412313 | 420,63 | 0,00 | 0,9988 | 420,63 | 0,07 | 0,8955 | RNAi | gene 8782 | 412313 | GB11852 | DDX17 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17 |
| gene9123_410561 | 120,20 | -0,15 | 0,7552 | 120,20 | -0,14 | 0,8440 | RNAi | gene 9123 | 410561 | GB13061 | zuc | zucchini |
| gene9741_410580 | 802,03 | -0,46 | 0,0392 | 802,03 | -0,37 | 0,1204 | RNAi | gene 9741 | 410580 | GB13449 | Fmr1 | fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 |

Tab. Z3: DESeq2-Werte von Genen mit Zuordnung zu Signalwegen.

| gene | ERIC I vs. control I | | | ERIC II vs. control II | | | pathway | ID | gene ID | BEEBASE ID | name_gff | description |
|----------------------|----------------------|-----------------|--------|------------------------|-----------------|--------|----------|---------------|---------|------------|-----------|---|
| | base Mean | log2Fold Change | padj | base Mean | log2Fold Change | padj | | | | | | |
| gene10000_4 12529 | 374,94 | -0,31 | 0,2334 | 374,94 | -0,33 | 0,2704 | Jak/STAT | gene 10000 | 412529 | GB10063 | csw | tyrosine-protein phosphatase corkscrew |
| gene10111_4 13980 | 110,24 | -0,50 | 0,2334 | 110,24 | -0,32 | 0,6028 | Jak/STAT | gene 10111 | 413980 | GB18789 | TEPA | thiolester-containing protein A |
| gene10367_ 551140 | 345,98 | 0,01 | 0,9786 | 345,98 | 0,06 | 0,8892 | Jak/STAT | gene 10367 | 551140 | GB12395 | Stam | signal transducing adaptor molecule |
| gene1038_ 408577 | 826,20 | 0,17 | 0,6013 | 826,20 | -0,10 | 0,8440 | Jak/STAT | gene 1038 | 408577 | GB10673 | LOC408577 | phosphatidylinositol 3 kinase 21B ortholog |
| gene10693_ 413772 | 117,53 | -0,32 | 0,4169 | 117,53 | 0,28 | 0,5996 | Jak/STAT | gene 10693 | 413772 | GB13951 | Socs7 | suppressor of cytokine signaling 7 |
| gene1477_ 412008 | 49,71 | -0,63 | 0,1013 | 49,71 | -0,02 | 0,9789 | Jak/STAT | gene 1477 | 412008 | GB13001 | Spred | sprouty-related protein with EVH-1 domain |
| gene3310_ 551174 | 352,35 | 0,13 | 0,6997 | 352,35 | 0,10 | 0,8440 | Jak/STAT | gene 3310 | 551174 | GB18362 | D-PIAS | protein inhibitor of activated STAT |
| gene3615_ 726002 | 441,88 | -0,02 | 0,9610 | 441,88 | 0,06 | 0,9036 | Jak/STAT | gene 3615 | 726002 | GB16422 | hop | hopscotch |
| gene4537_ 726883 | 302,69 | 0,01 | 0,9795 | 302,69 | -0,02 | 0,9756 | Jak/STAT | gene 4537 | 726883 | GB11563 | TEPB | thiolester-containing protein B |
| gene4947_ 408926 | 1451,49 | 0,04 | 0,9440 | 1451,49 | 0,09 | 0,8877 | Jak/STAT | gene 4947 | 408926 | GB12605 | TEP7 | thiolester-containing protein 7 |
| gene5417_ 413183 | 279,43 | -0,20 | 0,6570 | 279,43 | -0,03 | 0,9717 | Jak/STAT | gene 5417 | 413183 | GB14028 | CycD | cyclin D |
| gene7771_ 413430 | 331,37 | -0,26 | 0,2961 | 331,37 | -0,09 | 0,8486 | Jak/STAT | gene 7771 | 413430 | GB15685 | Akt1 | RAC serine/threonine- protein kinase |
| gene7864_ 551500 | 422,27 | -0,19 | 0,4626 | 422,27 | -0,04 | 0,9313 | Jak/STAT | gene 7864 | 551500 | GB19635 | LOC551500 | phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform-like |
| gene804_ 552036 | 429,41 | -0,42 | 0,1166 | 429,41 | -0,16 | 0,7334 | Jak/STAT | gene 804 | 552036 | GB18949 | Socs-5 | suppressor of cytokine signaling 5 |
| gene8142_ 552718 | 685,61 | -0,06 | 0,8826 | 685,61 | 0,05 | 0,9368 | Jak/STAT | gene 8142 | 552718 | GB13686 | Sos | son of sevenless |

Tab. Z3: DESeq2-Werte von Genen mit Zuordnung zu Signalwegen.

| gene | ERIC I vs. control I | | | ERIC II vs. control II | | | pathway | ID | gene ID | BEEBASE ID | name_gff | description |
|---------------------|----------------------|-----------------|--------|------------------------|-----------------|--------|----------|-------------|-----------|------------|--------------|---|
| | base Mean | log2Fold Change | padj | base Mean | log2Fold Change | padj | | | | | | |
| gene8816_550857 | 621,51 | -0,47 | 0,1057 | 621,51 | -0,33 | 0,3876 | Jak/STAT | gene 8816 | 550857 | GB15989 | drk | downstream of receptor kinase |
| gene883_411982 | 212,25 | -0,02 | 0,9669 | 212,25 | -0,20 | 0,6978 | Jak/STAT | gene 883 | 411982 | GB16551 | LOC411982 | e3 ubiquitin-protein ligase CBL-B-like signal-transducer and activator of transcription protein at 92E ortholog |
| gene9654_413742 | 527,91 | -0,12 | 0,7950 | 527,91 | -0,04 | 0,9546 | Jak/STAT | gene 9654 | 413742 | GB18923 | STAT92E-like | activator of transcription protein at 92E ortholog |
| gene9949_725117 | 373,66 | -0,31 | 0,3226 | 373,66 | -0,11 | 0,8572 | Jak/STAT | gene 9949 | 725117 | GB12262 | sty | |
| gene10405_100577690 | 71,43 | -0,04 | 0,9393 | 71,43 | 0,19 | 0,7312 | Imd/JNK | gene 10405 | 100577690 | | LOC100577690 | uncharacterized LOC100577690 |
| gene10643_413809 | 284,19 | -0,46 | 0,0709 | 284,19 | -0,31 | 0,3550 | Imd/JNK | gene 10643 | 413809 | GB14664 | Tak1 | TGF-beta activated kinase 1 inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta |
| gene1413_550741 | 70,92 | -0,31 | 0,4669 | 70,92 | -0,37 | 0,4840 | Imd/JNK | gene 1413 | 550741 | GB15273 | ird5 | |
| gene2080_409286 | 625,80 | 0,30 | 0,3564 | 625,80 | 0,15 | 0,7791 | Imd/JNK | gene 2080 | 409286 | GB16401 | bsk | JNK MAP kinase basket |
| gene2098_413389 | 435,00 | 0,07 | 0,8035 | 435,00 | 0,19 | 0,5616 | Imd/JNK | gene 2098 | 413389 | GB17167 | hem | HEM-protein |
| gene3431_724169 | 35,38 | 0,05 | 0,9380 | 35,38 | 0,90 | 0,0249 | Imd/JNK | gene 3431 | 724169 | GB12212 | Kay | |
| gene3962_100302584 | 190,93 | 0,53 | 0,1224 | 190,93 | 0,18 | 0,7691 | Imd/JNK | gene 3962 | 100302584 | | Imd | |
| gene4578_724930 | 84,13 | 0,01 | 0,9937 | 84,13 | 0,14 | 0,8609 | Imd/JNK | gene 4578 | 724930 | GB17683 | LOC724930 | caspase-10-like peptidoglycan recognition protein LC |
| gene5006_408924 | 157,36 | 0,40 | 0,2555 | 157,36 | 0,00 | 0,9997 | Imd/JNK | gene 5006 | 408924 | GB17188 | PGRP-LC | |
| gene6366_726289 | 1972,85 | 0,83 | 0,0260 | 1972,85 | 0,97 | 0,0036 | Imd/JNK | gene 6366 | 726289 | GB12004 | Jra | |
| gene8016_552247 | 897,13 | 0,08 | 0,7856 | 897,13 | 0,46 | 0,0165 | Imd/JNK | gene 552247 | | GB13742 | Rel | NF-kappaB transcription |

Tab. Z3: DESeq2-Werte von Genen mit Zuordnung zu Signalwegen.

| gene | ERIC I vs. control I | | | ERIC II vs. control II | | | pathway | ID | gene ID | BEEBASE ID | name_gff | description |
|--------------------|----------------------|-----------------|--------|------------------------|-----------------|--------|-----------|------------|-----------|------------|--------------|---|
| | base Mean | log2Fold Change | padj | base Mean | log2Fold Change | padj | | | | | | |
| 552247 | | | | | | | | 8016 | | | | factor relish |
| gene842_413374 | 233,31 | -0,04 | 0,9249 | 233,31 | 0,04 | 0,9486 | lmd/JNK | gene 842 | 413374 | GB11057 | lap2 | inhibitor of apoptosis 2 |
| gene8623_724728 | 706,48 | 0,19 | 0,5787 | 706,48 | 0,11 | 0,8424 | lmd/JNK | gene 8623 | 724728 | GB17106 | IKKgamma | inhibitor of kappaB kinase gamma |
| gene9178_726947 | 496,38 | 0,35 | 0,3867 | 496,38 | 0,27 | 0,6341 | lmd/JNK | gene 9178 | 726947 | GB18650 | Tab | Tak1-binding protein |
| gene10106_726620 | 3292,68 | -0,29 | 0,2381 | 3292,68 | -0,31 | 0,2808 | apoptosis | gene 10106 | 726620 | | LOC726620 | transcription factor BTF3 homolog 4-like |
| gene10731_412235 | 173,84 | -0,58 | 0,0992 | 173,84 | -0,01 | 0,9885 | apoptosis | gene 10731 | 412235 | GB19042 | LOC412235 | caspase-1-like |
| gene1643_100578356 | 64,46 | -0,77 | 0,0530 | 64,46 | -0,49 | 0,3280 | apoptosis | gene 1643 | 100578356 | | LOC100578356 | apoptotic protease-activating factor 1-like |
| gene1650_726899 | 177,42 | -0,18 | 0,6896 | 177,42 | -0,18 | 0,7782 | apoptosis | gene 1650 | 726899 | GB12440 | LOC726899 | e3 ubiquitin-protein ligase IAP-3-like |
| gene2233_408754 | 166,92 | -0,14 | 0,6871 | 166,92 | -0,14 | 0,7759 | apoptosis | gene 2233 | 408754 | GB10394 | LOC408754 | TNF receptor-associated factor 4-like |
| gene2510_411613 | 137,33 | -0,03 | 0,9590 | 137,33 | 0,19 | 0,7671 | apoptosis | gene 2510 | 411613 | GB18455 | LOC411613 | buffy |
| gene304_412212 | 1708,30 | -0,26 | 0,1607 | 1708,30 | -0,40 | 0,0203 | apoptosis | gene 304 | 412212 | GB16024 | AIF | apoptosis inducing factor death-associated protein 1-like |
| gene3142_408918 | 2862,59 | 0,47 | 0,0561 | 2862,59 | 0,59 | 0,0077 | apoptosis | gene 3142 | 408918 | GB16354 | LOC408918 | 1-like |
| gene3609_411115 | 2075,00 | 0,21 | 0,4710 | 2075,00 | 0,14 | 0,7544 | apoptosis | gene 3609 | 411115 | GB15652 | LOC411115 | baculoviral IAP repeat-containing protein 6-like |
| gene3664_408844 | 1199,36 | 0,03 | 0,9641 | 1199,36 | 0,52 | 0,1737 | apoptosis | gene 3664 | 408844 | GB19901 | puc | puckered |
| gene3886_411381 | 210,46 | -0,56 | 0,0966 | 210,46 | -0,53 | 0,1686 | apoptosis | gene 3886 | 411381 | GB16450 | LOC411381 | caspase-like |
| gene3969_409728 | 29270,28 | 0,35 | 0,0644 | 29270,28 | 0,07 | 0,8440 | apoptosis | gene 3969 | 409728 | GB11132 | RpS5a | |

Tab. Z3: DESeq2-Werte von Genen mit Zuordnung zu Signalwegen.

| gene | ERIC I vs. control I | | | ERIC II vs. control II | | | pathway | ID | gene ID | BEEBASE ID | name_gff | description |
|--------------------|----------------------|-----------------|--------|------------------------|-----------------|--------|-----------|------------|-----------|------------|--------------|--|
| | base Mean | log2Fold Change | padj | base Mean | log2Fold Change | padj | | | | | | |
| gene8312_100576819 | 70,61 | -0,47 | 0,2766 | 70,61 | -0,12 | 0,8934 | apoptosis | gene 8312 | 100576819 | | LOC100576819 | caspase-2-like |
| gene9189_100576402 | 264,67 | -0,39 | 0,2519 | 264,67 | -0,16 | 0,7872 | apoptosis | gene 9189 | 100576402 | | LOC100576402 | serine/threonine-protein kinase atr-like |
| gene9420_100577122 | 196,83 | 0,01 | 0,9918 | 196,83 | -0,14 | 0,8440 | apoptosis | gene 9420 | 100577122 | | LOC100577122 | tumor protein p73-like |
| gene9609_408521 | 223,76 | 0,56 | 0,1149 | 223,76 | 0,46 | 0,2772 | apoptosis | gene 9609 | 408521 | GB17328 | Mblk-1 | transcription factor mblk-1-like |
| gene10035_406140 | 583,61 | 0,14 | 0,7552 | 583,61 | 1,17 | 0,0000 | effector | gene 10035 | 406140 | GB13473 | Apid1 | apidaecin 1 |
| gene10123_409663 | 2925,38 | 0,68 | 0,0009 | 2925,38 | 0,19 | 0,5623 | effector | gene 10123 | 409663 | GB19988 | Lys-3 | lysozyme 3 |
| gene4022_406142 | 1312,81 | 0,12 | 0,8009 | 1312,81 | 1,55 | 0,0000 | effector | gene 4022 | 406142 | GB17538 | LOC406142 | hymenoptaecin |
| gene4329_406143 | 619,42 | 0,76 | 0,0240 | 619,42 | 0,66 | 0,0516 | effector | gene 4329 | 406143 | GB19392 | Def1 | defensin 1 |
| gene4452_406093 | 43,91 | 0,12 | 0,8129 | 43,91 | -0,47 | 0,3024 | effector | gene 4452 | 406093 | GB19468 | LOC406093 | apisimin |
| gene7069_406144 | 56,46 | 0,19 | 0,6304 | 56,46 | 0,88 | 0,0018 | effector | gene 7069 | 406144 | GB18323 | LOC406144 | abaecin |
| gene8533_725110 | 1243,10 | 0,02 | 0,9606 | 1243,10 | -0,02 | 0,9703 | effector | gene 8533 | 725110 | GB10231 | Lys-1 | lysozyme 1 |
| gene8534_724899 | 119,32 | -0,01 | 0,9830 | 119,32 | 0,27 | 0,6595 | effector | gene 8534 | 724899 | GB15106 | Lys-2 | lysozyme 2 |
| gene8853_406155 | 227,66 | 0,14 | 0,8009 | 227,66 | 0,23 | 0,7347 | effector | gene 8853 | 406155 | GB18313 | PPO | phenoloxidase subunit A3 |
| gene9879_406115 | 440,86 | 0,24 | NA | 440,86 | 1,26 | 0,0000 | effector | gene 9879 | 406115 | | Apid73 | apidaecin |
| gene9986_413397 | 0,07 | 0,00 | NA | 0,07 | -0,01 | NA | effector | gene 9986 | 413397 | GB10036 | Def2 | defensin 2 |

Publikationen

Fünfhaus A., Göbel J., Ebeling J., **Knispel H.**, Genersch E. (2018) Questions, problems, and solutions in the diagnosis of American Foulbrood. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, angenommen

Fünfhaus A., Göbel J., Ebeling J., **Knispel H.**, Garcia-Gonzalez E., Genersch E. (2018) Swarming motility and biofilm formation of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American Foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*). *Scientific reports* 8: 8840

Ebeling J., Fünfhaus A., **Knispel H.**, Krska D., Ravulapalli R., Heney K.A., Lugo M.R., Merrill A.R., Genersch E. (2017) Characterization of the toxin Plx2A, a RhoA-targeting ADP-ribosyltransferase produced by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Environ Microbiol* 19: 5100-5116

Ebeling J., **Knispel H.**, Hertlein G., Fünfhaus A., Genersch E. (2016) Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Appl Microbiol Biotechnol* 100: 7387-7395

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz besonders bei meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Elke Genersch für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Vielen Dank für das Vertrauen, die Geduld und die Freiheiten, die mir zur Bearbeitung gelassen wurde. Vielen Dank für die Unterstützung die mir zuteil wurde, die Möglichkeit gutes wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen und die Ermöglichung einen Teil meines Projektes an der Norwegian University of Life Sciences in Ås/Norwegen bearbeiten zu können. Die Bearbeitung dieses Projektes hat mich in wissenschaftlicher und persönlicher Hinsicht enorm weitergebracht und geprägt.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bedanke ich mich für die finanzielle Förderung (Sachbeihilfe GE 1365/1-2).

Dr. Yvonne Pöschl danke ich für die Einführung in die Bioinformatik und die Sequenzanalyse. Vielen Dank für die Geduld beim Erklären einzelner Berechnungen, Plots, zahlreichen Telefonkonferenzen sowie der Beantwortung hunderter Emails.

Der gesamten AG Genersch möchte ich für die zauberhafte Zusammenarbeit, ein anregendes Arbeitsumfeld und eine lehrreiche Zeit danken. Vielen Dank, dass ich mich immer mit Fragen an euch wenden durfte und ihr euer Wissen mit mir geteilt habt! Dr. Gillian Hertlein, Dr. Lena Poppinga und Dr. Eva Garcia-Gonzalez möchte ich für die Einführung in die Laborarbeit danken. Vielen Dank für eure Geduld. Dr. Gillian Hertlein danke ich für ihre wissenschaftliche Expertise, die Einführung in die Planung von Experimenten, die geduldige Einweisung in bioinformatische und statistische Analysen, ihre Denkanstöße sowie guten Worte, wenn mal wieder etwas nicht geklappt hat oder mich der Mut verlies. Danke für unsere gemeinsamen Stunden im Büro, Labor, am Telefon mit Servicehotlines und auch außerhalb des LIBs. Unsere 'Was wäre, wenn eigentlich alles ganz anders wäre?'-Gespräche werde ich immer in guter Erinnerung behalten. Dr. Lena Poppinga danke ich für ihre Einführung in die Geheimnisse des Klonierens, der Fluoreszenzmikroskopie, fürs Händchenhalten während meiner ersten PCR und ihrer inneren Ruhe, wenn ich sie brauchte. Dr. Eva Garcia-Gonzalez danke ich für die fachlichen und politischen Diskussionen sowie die schönen Stunden im Labor und außerhalb. Danke für deine Begeisterung für chitinbindende Proteine und ihre Aufreinigung mit der du mich angesteckt hast. Dr. Sebastian Gisder möchte ich danken für die zahlreichen Erklärungen von wissenschaftlichen Sachverhalten, methodischen Details und auch nicht ganz so wissenschaftlichen Fragestellungen. Danke für die detektivische Arbeit bei so manchem technischem Problem. Dr. Anne Fünfhaus möchte ich danken für die gemeinsame Zeit die wir mit Proteinaufreinigung verbracht haben. Danke für deine Unterstützung auch über Ländergrenzen hinweg, für die aufmunternden Worte,

deine innere Ruhe und natürlich die Einweisung in die Nutzung des Wochenkalenders. Dr. Nadine Möckel möchte ich für die gute Zusammenarbeit und den Erfahrungsaustausch bezüglich Primerdesign und Analyse in qbase danken. Dr. Julia Ebeling möchte ich danken für die gemeinsame Zeit und die tolle Zusammenarbeit, die wir während unserer Doktorandenzeit verbracht haben. Danke für die legendären Sommer in denen die Larven uns zahlenmäßig so hoch überlegen waren und (fast) alles parallel lief. Josefine Göbel und Lennart Horchler möchte ich für Schwung und die neuen Sichtweisen danken, die sie mitgebracht haben. Bei Kati Hedtke, Theresa Wroblewski und Marie Schwetz möchte ich mich für die Unterstützung im Labor und bei Bestellungen sowie Kostenaufstellungen bedanken. Ein besonderes Dankeschön gilt Andrea Jäkisch und Marion Schröder für das Sammeln unzähliger Bienenlarven für die Infektionsversuche und die bereitwillige Beratung bei imkerlichen Fragen.

I would also like to thank Prof. Gustav Vaaje-Kolstad for the opportunity to work on my project in in the lab of the PEP group and for sharing his experience with chitin-binding proteins. Special thanks to Dr. Jennifer Loose for all the help according to purification methods, storage, incubation assays and technical help with any kind of devices. Furthermore I would like to thank Dr. Zarah Forsberg, Dr. Bastien Bisarro, Dr. Sophanit Mekasha and Dr. Aniko Varnai for the time together in and outside the lab. A special thanks goes to Durdica Marosevic my office partner in Norway and for her warm welcoming nature.

Ein großer Dank gilt meinen Freunden, die mich auf diesem Weg begleitet haben. Jedes eurer Worte, Emails, Textnachrichten oder Briefe haben ihren Teil zum Vollenden dieser Arbeit beigetragen. Meiner Freundin Wenke möchte ich für ihre unerschütterliche Art, aufmunternden Worte und zahlreichen Notfallpläne danken. Meiner Freundin Jelena möchte ich für ihr Interesse, den Erfahrungsaustausch und ihrer positiven Energie danken mit der sie mich versorgt hat.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken. Danke für eure Liebe und euer Verständnis in dieser Zeit ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Meiner Mutter Birgit möchte ich für die aufmunternden Gespräche zu jeder Zeit und die survival-Päckchen danken. Meinem Vater Olaf und meiner Stiefmutter Jana möchte ich für ihre offenen Ohren und den Ausgleich danken den sie mir gegeben haben. Meinen Geschwistern Sophie und Lorenz möchte ich für ihren Beistand, ihre guten Worte sowie zahlreichen stimmungsaufhellenden Ablenkungsmanöver danken. Meiner Oma Giesela und meinem Opa Ullrich danke ich für beständiges Interesse an meiner Arbeit, ihre aufmunternden Worte und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Karsten meinem Freund und Partner in jeder Lebenslage. Danke, dass du zu jeder Zeit für mich da warst, mir den Rücken stärkst und auf den ich mich immer verlassen kann! Danke für deine Geduld und die Fähigkeit mir andere Blickwinkel aufzuzeigen.

Finanzierungsquellen

Diese Arbeit wurde finanziert durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen der Sachbeihilfe GE 1365/1-2. Es besteht kein Interessenkonflikt durch die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, Henriette Knispel, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel "Weitere Aufklärung molekularer Details zur Pathogen-Wirt-Beziehung im Verlauf der Pathogenese einer Infektion von Bienenlarven mit *Paenibacillus larvae*" selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 25.09.2019

Henriette Knispel



9 783967 290103

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-010-3