

## Bakterielle Virulenzfaktoren

# Die Amerikanische Faulbrut, eine ernsthafte Bedrohung der Honigbiene

ELKE GENERSCH

LÄNDERINSTITUT FÜR BIENENKUNDE, HOHEN NEUENDORF;  
INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE UND TIERSEUCHEN, FU BERLIN

American foulbrood is one of the most devastating honey bee diseases. Although the causative agent, *Paenibacillus larvae*, only kills larval stages, diseased colonies will eventually die from the lack of progeny. Analysis of *P. larvae* virulence mechanisms revealed that *P. larvae* has evolved means to combat microbial competitors, expresses an enzyme able to degrade the peritrophic matrix (a chitin-containing protective layer lining the midgut epithelium), and uses toxins and an S-layer protein to attack and breach the midgut epithelium thereby killing the larva.

DOI: 10.1007/s12268-015-0552-4  
© Springer-Verlag 2015

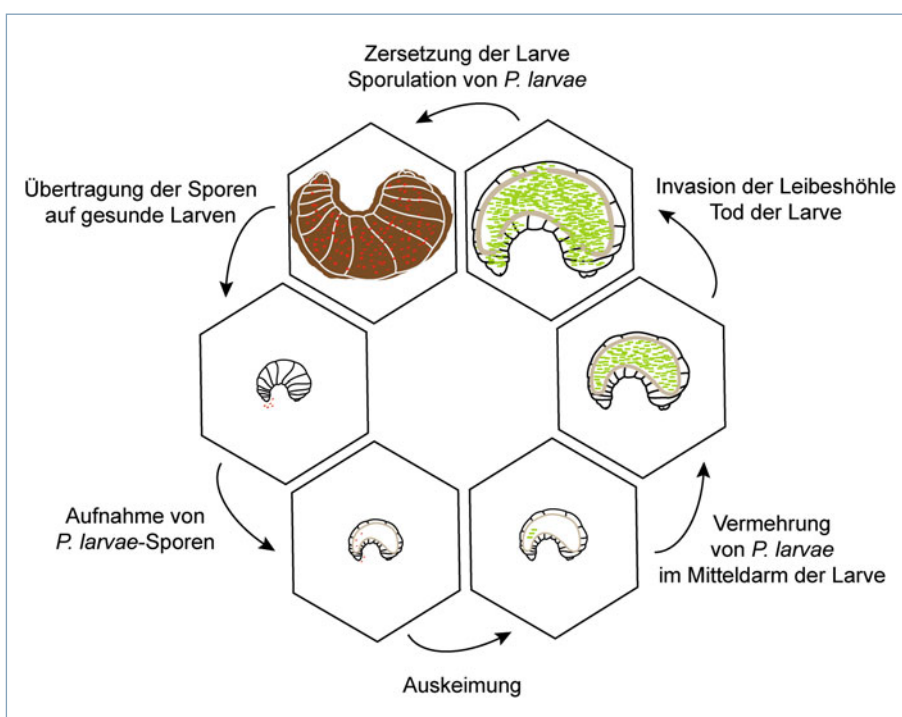
■ Viele Blütenpflanzen sind in ihrer Vermehrung auf die Bestäubung durch Tiere, vor allem Insekten, angewiesen. Um bei landwirtschaftlich genutzten, insektenbestäubten Kulturpflanzen einen hohen Ertrag zu sichern, werden Bienen weltweit als Bestäu-

ber in der Landwirtschaft eingesetzt, da von Imkern gehaltene Bienenvölker relativ einfach zu den jeweiligen Bestäubungskulturen transportiert werden können. Am häufigsten kommt die Westliche Honigbiene (*Apis mellifera*) zum Einsatz. Sie ist dadurch der wich-

tigste Bestäuber in vielen landwirtschaftlichen und natürlichen Ökosystemen. Eine signifikante Reduktion des Bienenbestands könnte zu einer reduzierten Vielfalt bei Wildpflanzen und zu Ernteeinbußen bei Obst, Gemüse, Ölsaaten oder in der Saatgutgewinnung führen. Leider gibt es viele Infektionskrankheiten, die den Honigbienen das Leben schwer machen oder sogar zum Tod von Bienenvölkern führen können. Die Amerikanische Faulbrut der Bienen (AFB) ist eine solche, oftmals tödlich verlaufende Erkrankung der Bienen.

### Amerikanische Faulbrut der Bienen und *Paenibacillus larvae*

Die AFB ist eine anzeigepflichtige Tierseuche, die überall auf der Welt vorkommt. Mit 200 bis 300 Ausbrüchen pro Jahr allein in Deutschland richtet sie großen wirtschaftlichen Schaden in der Bienenhaltung an. Die AFB wird von dem Gram-positiven sporenbildenden Bakterium *Paenibacillus larvae* verursacht [1]. Die Sporen dieses Bakteriums sind ausschließlich für Bienenlarven und auch für diese nur in den ersten 36 Stunden nach dem Eischlupf infektiös. Infizierte Bienenlarven sterben und werden von *P. larvae* vollständig zu einer fadenziehenden Masse zersetzt. Die in dieser Masse befindlichen Bakterien gehen in die Sporenform über, und die Masse trocknet zum Faulbrutschorf ein. Dieser enthält Milliarden von *P. larvae*-Sporen, die die Ausbreitung der AFB im Volk und zwischen Völkern gewährleisten (Abb. 1). Der Verlust der Brut und damit der Nachkommen führt schließlich zum Zusammenbruch des ganzen Volks.



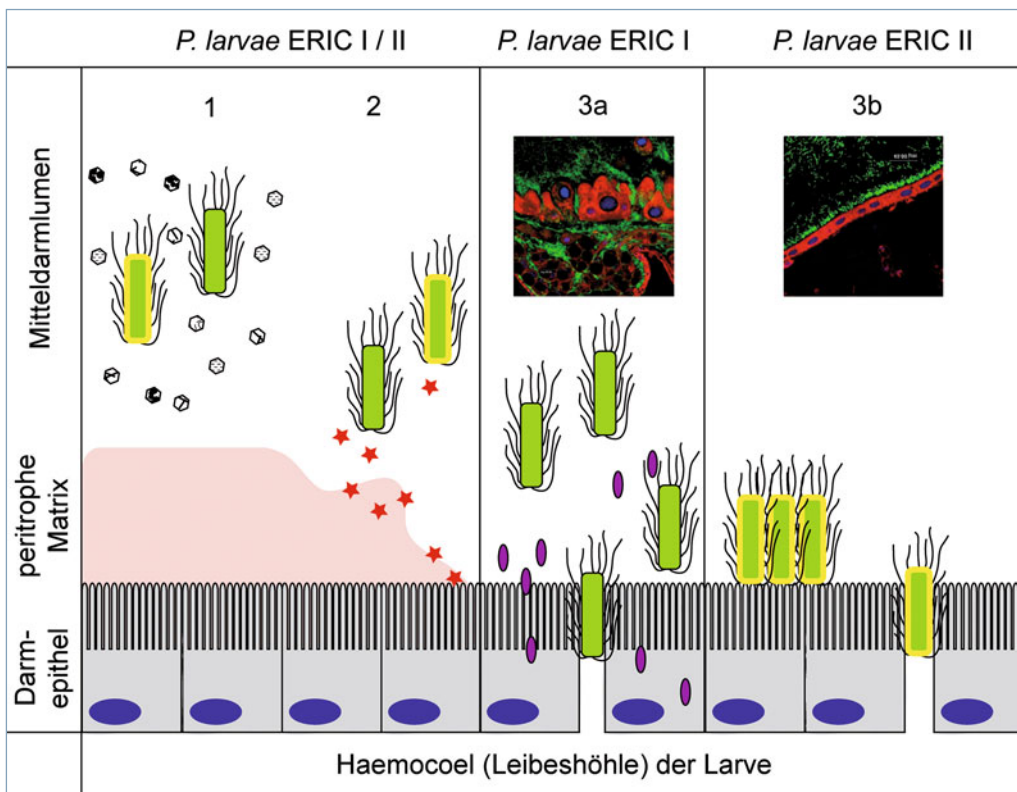
◀ **Abb. 1:** Deskriptive Pathogenese der Amerikanischen Faulbrut in Larven. Nach Aufnahme der Sporen keimt *Paenibacillus larvae* im Darm der Larve aus. Die vegetativen Bakterien vermehren sich zunächst massiv im Darmlumen. Die invasive Phase beginnt mit der Zerstörung der peritrophen Matrix. Durch die Überwindung des Darmepithels wandern die Bakterien in das Haemocoel der Larve ein und zersetzen den Kadaver, bevor sie erneut sporulieren.

Die Spezies *P. larvae* wird mithilfe der *repetitive element PCR* (rep-PCR) unter Verwendung von *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC)-Primern in vier verschiedene Genotypen (ERIC I–IV) eingeteilt, die sich u. a. in ihrer Virulenz unterscheiden [1]. Diese vier Genotypen wurden kürzlich auch über eine MLST (*multilocus sequence typing*)-Analyse von fast 300 weltweit gesammelten Isolaten bestätigt: Obwohl mit dem neu etablierten MLST-Schema insgesamt 21 Sequenztypen (ST) differenziert werden konnten, bilden die ST der Genotypen ERIC I, ERIC II und ERIC III/IV jeweils eigene Gruppen [2]. Es bestätigte sich, dass in den letzten Jahrzehnten nur noch die beiden Genotypen ERIC I und II regelmäßig bei AFB-Ausbrüchen auf der ganzen Welt isoliert wurden. In unseren Untersuchungen zur molekularen Pathogenese der AFB haben wir uns daher hauptsächlich auf diese beiden praktisch bedeutsamen *P. larvae*-Genotypen beschränkt.

### **CBP49 – ein zentraler Virulenzfaktor von *Paenibacillus larvae***

Junge Larven infizieren sich mit dem Erreger, indem sie Sporen-kontaminiertes Futter aufnehmen. Nach dem Auskeimen der Sporen im Mitteldarm der Larve vermehren sich die vegetativen Bakterien zunächst massiv im Darmlumen, ohne dass eine Schädigung des Darmepithels erkennbar ist [3]. Während dieser nicht-invasiven Phase der Infektion dient den Bakterien hauptsächlich das Larvenfutter als Nahrungsquelle. Für die Beseitigung eventuell konkurrierender Bakterien oder Pilze aus dem normalen Mikrobiom der Larven synthetisiert *P. larvae* mehrere antimikrobiell wirksame Substanzen, mit denen sich die Nische ‚Larvendarm‘ offenbar sehr erfolgreich gegen Nahrungskonkurrenten verteidigen lässt [4–6]. Die invasive Phase, in deren Verlauf *P. larvae* in die Leibeshöhle der Larve eindringt und die Larve tötet und zersetzt, beginnt mit dem Abbau der Chitin-haltigen peritrophen Matrix (PM), die als Barriere gegenüber Pathogenen und Parasiten dient. In Larven, die mit *P. larvae* infiziert sind, kann in histologischen Präparaten teilweise ein vollständiger Abbau der PM beobachtet werden. Da *P. larvae* in der Lage ist, Chitin, den Hauptbestandteil der PM, zu verstoffwechseln [7], lag der Schluss nahe, dass die PM von *P. larvae* gezielt zerstört wird, um diese mechanische Immunbarriere der Larven zu überwinden und den Angriff auf das Epithel zu ermöglichen.

Für die Degradation der PM sezerniert *P. larvae* ein Chitin-bindendes und -abbauendes Protein (PICBP49) [8]. Die Identifizierung von PICBP49 gelang über einen Chitin-Bindungsas-



▲ **Abb. 2:** Modell zur molekularen Pathogenese der Amerikanischen Faulbrut. *Paenibacillus larvae* (grün) sezerniert im Darm von Bienenlarven antimikrobiell wirksame Substanzen (1, Sechsecke) und PICBP49 (2, Sterne), um mikrobielle Konkurrenten auszuschalten und die peritrophe Matrix (rosa) abzubauen (2). *P. larvae* ERIC I greift die Zellen (hellgrau mit blauen Kernen) mit Toxinen (lila Ellipsen) an (3.1). *P. larvae* ERIC II heftet sich mithilfe der S-layer (gelbe Umrandung) an das Darmepithel an (3.2). Die Bakterien überwinden anschließend das Darmepithel auf dem parazellulären Weg, indem sie die Zellzwischenräume nutzen und an den Zellen vorbeiziehen. Die in 3A und 3B gezeigten mikroskopischen Aufnahmen stammen von Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen infizierter Larven (rot: Darmepithelzellen; blau: Zellkerne; grün: *P. larvae*) [3]. In 3.1a sind abgerundete Epithelzellen, die sich dadurch öffnenden Zellzwischenräume und der Übergang von *P. larvae* in das Haemocoel der Larven zu erkennen. 3.2b verdeutlicht die Anheftung von *P. larvae* an das Darmepithel.

say und eine anschließende massenspektrometrische Analyse des isolierten Proteins. Die Protein- und Gensequenzen klassifizierten PICBP49 als neues Mitglied einer zu den *lytic polysaccharide monoxygenases* (LPMO) gehörenden Familie von Enzymen, den *auxiliary activities 10* (AA10), die kristallines Chitin über eine Kupfer-abhängige oxidative Reaktion abbauen [9]. Entscheidend für die funktionelle Charakterisierung von PICBP49 als Schlüsselfaktor der AFB-Pathogenese war das von uns entwickelte Protokoll zur genetischen Manipulation von *P. larvae* [10], das es uns ermöglichte, CBP49-Geninaktivierungsmutanten ( $\Delta cbp$ ) zu konstruieren und in Larvenassays im Vergleich zum Wildtyp (Wt) zu testen. Diese Assays ergaben, dass die PM nur in den mit *P. larvae* Wt infizierten Larven degradiert wird, nicht aber in den mit *P. larvae*  $\Delta cbp$  infizierten [8]. Weitere Versuche zeigten, dass PICBP49 auch entscheidend für die Virulenz von *P. larvae* ist. Dieselbe Spo-

renkonzentration, die etwa 80 Prozent der mit *P. larvae* Wt infizierten Larven tötet, tötet lediglich drei bis vier Prozent der Larven, wenn die Geninaktivierungsmutante *P. larvae*  $\Delta cbp$  zur Infektion eingesetzt wird [8]. Nach diesen Ergebnissen ist *P. larvae* nur dann in der Lage, die PM der Larven zu degradieren und die Larven zu töten, wenn PICBP49 exprimiert wird. In Abwesenheit der Expression von PICBP49 ist *P. larvae* nahezu avirulent. Der Abbau der PM ist demnach ein entscheidender Schritt in der Pathogenese der AFB, und PICBP49 ist ein Schlüsselfaktor für die Virulenz von *P. larvae*.

#### Plx1 und Plx2 – die Toxine von *Paenibacillus larvae* ERIC I

Vergleichende Genomanalysen von *P. larvae* ERIC I und II führten zur Identifizierung von zwei Toxinen, Plx1 und Plx2, die nur von Vertretern des Genotyps ERIC I exprimiert werden [11]. Beide Toxine gehören zu den AB-

Toxinen, die aus einer enzymatisch aktiven A-Domäne und einer Bindungs- und Translokationsdomäne, der B-Domäne, bestehen. Plx1 hat große Ähnlichkeit mit dem von *Lysinibacillus sphaericus* exprimierten Toxin MTX1 bzw. den von verschiedenen Kohlweißlingen (*Pieridae*, Lepidoptera) exprimierten Pierisin-ähnlichen Toxinen. *In silico*-Analysen ergaben Hinweise, dass beide Toxine ADP-Ribosylierungsaktivität besitzen und Plx1 wahrscheinlich DNA oder RNA als zelluläres Zielmolekül adressiert, während Plx2 eventuell das Signalmolekül Rho inaktiviert und so zur Depolymerisierung des Aktinzytoskeletts führt [11]. Expositionsbioassays mit Geninaktivierungsmutanten für Plx1 ( $\Delta plx1$ ) und Plx2 ( $\Delta plx2$ ) bestätigten, dass beide Toxine für die Virulenz von *P. larvae* ERIC I entscheidend sind, da die Infektion mit den jeweiligen Mutanten zu einer signifikant reduzierten Larvenmortalität im Vergleich zu Larven, die mit den Wildtyp-Bakterien infiziert worden waren, führte [11].

#### SplA – das S-layer-Protein von *Paenibacillus larvae* ERIC II

Vergleichende Proteomanalysen von *P. larvae* ERIC I und II zeigten, dass Vertreter des Genotyps ERIC II ein S-layer-Protein (SplA) exprimieren, das im Proteom von ERIC I nicht nachweisbar ist. Anschließende Genanalysen bestätigten, dass eine Insertionsmutation in *splA* dazu führt, dass SplA in *P. larvae* ERIC I nicht exprimiert wird [12]. Die funktionelle Charakterisierung von SplA gelang wieder über die Verwendung von Geninaktivierungsmutanten ( $\Delta splA$ ) in verschiedenen Bioassays. So zeigten Adhäsionsassays mit Primärzellen aus dem Darm von Bienenpuppen, dass SplA die Adhäsion von *P. larvae* ERIC II an Darmzellen vermittelt. Lediglich der Wildtyp von *P. larvae* ERIC II heftet sich *in vitro* an die Darmzellen an, während sowohl bei der Mutante *P. larvae* ERIC II  $\Delta splA$  als auch bei dem natürlicherweise SplA-defizienten ERIC-I-Stamm keine Adhäsion nachgewiesen werden konnte [12]. Expositionsbioassays bestä-

tigten die Rolle von SplA als wichtiger Virulenzfaktor für *P. larvae* ERIC II: Die mit *P. larvae* ERIC II  $\Delta$ splA infizierten Larven hatten eine um etwa die Hälfte verringerte Mortalität gegenüber den mit dem entsprechenden Wildtyp infizierten Tieren [12].

### Hemmstoffe gegen Toxine und den Chitinabbau als neue Therapieansätze?

Mit der Identifizierung der von *P. larvae* synthetisierten, antimikrobiell wirksamen Substanzen, des von *P. larvae* exprimierten PM-abbauenden Enzyms PICBP49, der *P. larvae* ERIC I-spezifischen Toxine Plx1 und Plx2 sowie des *P. larvae* ERIC II-spezifischen S-layer-Proteins SplA haben wir die ersten Bausteine für das Verständnis der molekularen Pathogenese der AFB zusammengetragen (**Abb. 2**). PICBP49 sowie die Toxine Plx1 und Plx2 bieten sich für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren an. Dies wiederum könnte in neuartigen Therapieansätzen und -strategien gegen den von *P. larvae* ausgelösten Bienentod münden. Insofern würde sich die alte Weisheit, dass man eine Krankheit verstehen muss, um sie behandeln zu können, auch für die AFB bewahrheiten.

### Danksagung

Wir danken der DFG, die diese Arbeiten und fünf hochmotivierte Doktorandinnen (Ainura Ashiralieva, Eva Garcia-Gonzalez, Gillian Hertlein, Lena Poppinga, Anne Fünfhaus) im Rahmen des Graduiertenkollegs 1121 und der Sachbeihilfe GE1365/1-1 gefördert hat. ■

### Literatur

- [1] Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J et al. (2006) Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:501–511
- [2] Morrissey BJ, Helgason T, Poppinga L et al. (2014) Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. *Environ Microbiol*, doi: 10.1111/1462-2920.12625

- [3] Yue D, Nordhoff M, Wieler LH et al. (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
- [4] Garcia-Gonzalez E, Müller S, Enslé P et al. (2014) Elucidation of sevadicin, a novel nonribosomal peptide secondary metabolite produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *Environ Microbiol* 16:1297–1309
- [5] Garcia-Gonzalez E, Müller S, Hertlein G et al. (2014) Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *MicrobiologyOpen* 3:642–656
- [6] Müller S, Garcia-Gonzalez E, Mainz A et al. (2014) Paenilamicin: structure and biosynthesis of a hybrid non-ribosomal peptide/polyketide antibiotic from the bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Angew Chem Int Ed Engl* 53:10821–10825
- [7] 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
- [8] Garcia-Gonzalez E, Poppinga L, Fünfhaus A et al. (2014) *Paenibacillus larvae* chitin-degrading protein PICBP49 is a key virulence factor in American Foulbrood of honey bees. *PLoS Pathog* 10:e1004284
- [9] Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ et al. (2010) An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* 330:219–222
- [10] Poppinga L, Fünfhaus A, Garcia-Gonzalez E et al. (2011) Functional analysis of the S-layer protein of *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* 42:792–793
- [11] 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
- [12] Poppinga L, Janesch B, Fünfhaus A et al. (2012) Identification and functional analysis of the S-layer protein SplA of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. *PLoS Pathog* 8:e1002716

### Korrespondenzadresse:

PD Dr. Elke Genersch  
Länderinstitut für Bienenkunde  
Friedrich-Engels-Straße 32  
D-16540 Hohen Neuendorf  
Tel.: 03303-2938-33  
Fax: 03303-2938-40  
elke.genersch@hu-berlin.de  
www.honigbiene.de

### AUTORIN



#### Elke Genersch

1980–1988 Biologiestudium an der Universität zu Köln. 1989–1993 Promotion und Postdoc am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. 1994–1995 Postdoc bei der Schering AG, Berlin. 1995–1999 Arbeitsgruppenleiterin am Max-Delbrück-Centrum, Berlin-Buch. 1999–2001 Arbeitsgruppenleiterin am Biomedical Center, Lund, Schweden. Seit 2001 stellvertretende Direktorin am Länderinstitut für Bienenkunde, Hohen Neuendorf. 2006 Habilitation am Fachbereich Veterinärmedizin der FU Berlin.