



**De invloed van hemolymfe van bijenlarven op de
expressie van potentiële virulentiegenen van
*Paenibacillus larvae***

Sarah VAN LENT

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de Biochemie en de Biotechnologie
Major microbiële biotechnologie
Academiejaar 2010-2011

Promotor: Prof. Dr. Dirk C. de Graaf
Wetenschappelijk begeleider: Dieter De Koker
Vakgroep Fysiologie
Laboratorium voor Zoöfysiologie

Dankwoord

Graag wil ik van dit moment gebruik maken om de mensen te bedanken die mij dit jaar en de voorbije jaren gesteund hebben.

Eerst en vooral wil ik Prof. Dr. Dirk C. de Graaf bedanken, omdat hij mij de mogelijkheid gegeven heeft om deze thesis uit te voeren. Daarnaast wil ik ook Dieter De Koker en Dr. Lina De Smet bedanken voor hun begeleiding bij het experimenteel werk en het corrigeren van mijn thesis. Ook wil ik Ellen D., Ellen F., Matthias, Jorgen en Marleen bedanken, want jullie zijn een toffe bende waar ik me direct in thuis voelde. Iedereen was steeds goed gezind, waardoor ik elke dag met plezier naar het labo kwam. Bedankt allemaal voor de leuke momenten en ik kom zeker nog eens op de koffiepauze bij jullie.

Ook veel dank aan de Vakgroep Biochemie en Microbiologie voor het materiaal dat we mochten lenen. De mensen van de bijenstand van campus 'de Sterre' (UGent) wil ik ook bedanken voor de bijenlarven die we kregen.

Graag wil ik ook mijn vrienden, in het bijzonder Elien, Charlotte P. en Charlotte V., bedanken. Samen met en door jullie heb ik een prachtige studententijd gehad.

Mijn ouders en mijn broers wil ik heel hard bedanken. Moeke en vake, zonder jullie steun had ik dit nooit bereikt. Altijd stonden jullie voor mij klaar en ook al zag ik het soms niet zo goed zitten, jullie geloofden steeds in mij en gaven me moed om ertegenaan te gaan. Stijn en Dries, ook al zitten jullie in een totaal andere branche, toch waren jullie altijd geïnteresseerd in wat ik deed. Jelle, het is leuk dat we elkaar hebben kunnen helpen tijdens onze studie. Ook mijn grootouders verdienen een dankjewel. Ze weten graag waar ik mee bezig ben en zijn geboeide luisteraars. Bovendien kon mijn moemoe, dankzij haar uitstekende kennis van de Nederlandse taal, de laatste fouten uit mijn thesis halen.

Tot slot wil ik mij ook richten tot mijn vriend Seppe. Stress, dat is een woord dat niet in jouw woordenboek staat. Een mooie gave van jou is dan ook dat je me zo weet op te beuren. Bedankt omdat je er altijd voor mij bent.

Inhoudstabel

Dankwoord	i
Inhoudstabel	ii
Lijst met afkortingen	v
Nederlandse samenvatting.....	vii
English summary.....	viii
Deel 1: Inleiding.....	1
1.1 De honingbij.....	1
1.1.1 Het belang van honingbijen en hun plaats in het dierenrijk.....	1
1.1.2 Taakverdeling en ontwikkeling van de honingbij.....	2
1.1.3 Anatomie.....	4
1.2 <i>Paenibacillus larvae</i>	5
1.2.1 Algemeenheden en geschiedenis.....	5
1.2.2 Genotypes en virulentie.....	6
1.2.3 Genoom.....	7
1.3 Amerikaans vuilbroed (AVB).....	8
1.3.1 Bijenziekten.....	8
1.3.2 Pathogenese.....	9
1.3.3 Verspreiding.....	12
1.3.4 Symptomen.....	14
1.3.5 Behandeling.....	15
Deel 2: Doelstelling.....	17
Deel 3: Resultaten	18
3.1 Diagnostische PCR en rep-PCR.....	18

3.2 Preliminaire testen.....	19
3.2.1 Keuze van het medium.....	19
3.2.2 Invloed glycerol, DMSO en PTU op de groeicurve.....	22
3.2.3 Invloed BHIT-medium op hemocyten	23
3.2.4 Hemolymfe.....	24
3.2.5 RNA isolatie.....	26
3.2.6 Huishoudgenen.....	27
3.2.7 Virulentiegenen	37
3.3 Expressieniveaus van potentiële virulentiegenen.....	40
Deel 4: Discussie.....	44
4.1 Preliminaire testen.....	44
4.2 Expressieniveaus van potentiële virulentiegenen.....	46
4.3 Toekomstperspectieven.....	48
Deel 5: Materiaal en methoden	49
5.1 Gebruikte stam	49
5.1.1 Cultivatie.....	49
5.1.2 DNA isolatie.....	49
5.1.3 Diagnostische PCR.....	49
5.1.4 Rep-PCR.....	50
5.2 Preliminaire testen.....	50
5.2.1 Collecteren van hemolymfe	50
5.2.2 Invloed van het medium op de hemocyten.....	51
5.2.3 Groeicurven.....	51
5.3 Q-PCR.....	52
5.3.1 RNA stabilisatie	52
5.3.2 RNA isolatie.....	53

5.3.3 cDNA synthese.....	54
5.3.4 Keuze van mogelijke huishoud- en virulentiegenen	54
5.3.5. Primer design.....	57
5.3.6. PCR-efficiëntie.....	58
5.3.7. Q-PCR.....	59
Referenties.....	61
Bijlagen	66
1. Medium	66

Lijst met afkortingen

ABC	ATP-bindingscassette
<i>adk</i>	Adenylaatkinase
ADP	Adenosinedifosfaat
AMP	Antimicrobiële peptiden
API	Analytical Profile Index
ATP	Adenosine trifosfaat
AVB	Amerikaans vuilbroed
BHIT	Brain Heart Infusion Thiamine HCl
cDNA	Complementair DNA
CFU	Colony Forming Units
<i>cmk</i>	Cytidylaatkinase
C _T	Cycle treshold
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleïnezuur
dNTP	Deoxyribonucleotidetrifosfaat
EDTA	Ethylenediaminetetra-azijnzuur
<i>eftu</i>	Elongatiefactor Tu
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
FISH	Fluorescente in situ hybridisatie
<i>fum</i>	Fumaraathydratase
Fw	Forward
<i>gapdh</i>	Glyceraldehyde 3-fosfaatdehydrogenase
GC	Guanine, Cytosine
gDNA	Genomisch DNA
<i>gyrA</i>	GyraseA
h	Hemolymfe
HCl	Waterstofchloride
J	St-Julian
LB	Lysogeny Broth
<i>mbl</i>	Rod-shape determining protein
<i>mdh</i>	Malaatdehydrogenase
MgCl ₂	Magnesiumdichloride
mRNA	Messenger RNA
MTX	Mosquitocidaal Toxine
MYPGP	Mueller-Hinton, Yeast extract, dikaliumwaterstoffosfaat, glucose, natriumpyruvaat
NRP(S)	Niet-ribosomaal peptide (synthase)
NRT	No reverse transcription
NTC	No template control
OD	Optische densiteit
p	Plasmide

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase kettingreactie
PFGE	Pulsed Field Gelelectrophoresis
PK(S)	Polyketide (synthase)
PM	Peritrofe membraan
PO	Profenoloxidase
polyA	Polyadenylatie
PTU	Phenylthiourea
<i>purH</i>	Phosphoribosyl aminoimidazole carboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
Q-PCR	kwantitatieve-PCR
QS	Quorum sensing
rep-PCR	Repetitive element sequence based-PCR
rico	richtingscoëfficiënt
RNA	Ribonucleïnezuur
rpm	Rotaties per minuut
<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor
rRNA	Ribosomaal RNA
RT-qPCR	Real-time kwantitatieve-PCR
Rv	Reverse
S.D.	Standaarddeviatie
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfaat-polyacrylamidegelelektroforese
ssp.	Subspecies
<i>sucB</i>	Succinyl-coA synthetase subeenheid β
t	Tijdstip
TBE	Tris/Boraat/EDTA
Tm	Smelttemperatuur
U	Unit
Vip	Vegetatief insecticidaal proteïne

Nederlandse samenvatting

De economische waarde van de bestuiving van cultuurgewassen door insecten bedraagt ongeveer 153 miljard. Aangezien dat 10% van de wereldvoedselproductiewaarde is, zijn bestuivende insecten van levensbelang voor de menselijke voedselvoorziening. De honingbijen zijn verreweg de belangrijkste bestuivers. Hun succes is mede te danken aan hun grote aantallen. Met velen samenleven op een kleine plaats leidt echter tot een groot risico op infectie. Kennis over de manier waarop pathogenen de gezondheid van de bij aantasten is essentieel om de ziekten te kunnen behandelen en voorkomen.

Het genoom van *Paenibacillus larvae*, de verwekker van Amerikaans vuilbroed, is sinds kort gekend en geannoteerd. Via *in silico* analyse werden meer dan 200 potentiële virulentiegenen geïdentificeerd. Dit is echter slechts een theoretische benadering. Indien deze genen inderdaad een rol spelen bij de infectie van larven van de honingbij, dan wordt verwacht dat ze differentieel tot expressie komen wanneer de bacterie in contact komt met gastheerweefsels.

In deze thesis werd d.m.v. kwantitatieve-PCR (Q-PCR) nagegaan of tien potentiële virulentiegenen differentieel tot expressie kwamen in de aanwezigheid van hemolymfe. Hiervoor werden in eerste instantie preliminaire testen uitgevoerd om de juiste condities voor het Q-PCR experiment te bepalen. In eerste instantie werd vastgesteld dat *P. larvae* BRL-230010 zeer explosief groeit in BHIT-medium en geen endosporen vormt in het medium. Dat is ideaal aangezien de endosporen metabolisch inert zijn en bovendien de vegetatieve cellen de klinische manifestaties uitlokken. We wensen dus de genexpressie van de vegetatieve cellen te bestuderen.

Er werd gezocht naar een methode om hemolymfe steriel te collecteren. Dit bleek echter moeilijker dan verwacht. Uiteindelijk werd geopteerd om de hemolymfe te steriliseren d.m.v. een 0,2 µm filter, wat resulteerde in zuiver hemolymfe, zonder hemocyten en vetcellen. Een *P. larvae* cultuur gegroeid tot een OD₅₉₀ van ≈ 0,2 werd in twee gesplitst, waarna één cultuur *gespiket* werd met steriel hemolymfe en één cultuur met PTU (controle). Eén uur, 3 u en 9 u na *spiken* werd cultuur gecollecteerd. D.m.v. Q-PCR werden de genexpressieniveaus van tien potentiële virulentiegenen op de drie tijdstippen bepaald. De expressieniveaus van de potentiële virulentiegenen in de culturen *gespiket* met hemolymfe werden relatief bepaald t.o.v. de controleculturen. Er werd gecorrigeerd voor variaties tussen de stalen d.m.v. huishoudgenen die gevalideerd zijn voor dit experiment tijdens deze thesis. Hierdoor is het geobserveerd verschil in genexpressie uitsluitend t.g.v. de aanwezigheid van de hemolymfe.

Ondanks dat slechts een klein aantal potentiële virulentiegenen getest werd in deze studie, werd toch een duidelijke differentiële genexpressie vastgesteld bij een aantal genen (1 u na *spiken* werd de helft van de genen neergereguleerd en één gen opgereguleerd; na 3 u werd één gen neergereguleerd en werden drie genen opgereguleerd; na 9 u werden geen genen neergereguleerd en vijf genen opgereguleerd). De resultaten bekomen in deze studie zullen gebruikt worden om de condities voor een micro-array experiment, waarin de genexpressieniveaus van al de geannoteerde genen van *P. larvae* bepaald zullen worden in aan- en afwezigheid van hemolymfe, te bepalen.

English summary

The total economic value of pollination worldwide amounts to €153 billion, which represents 10% of the value of the world agricultural production that is used for human food. Insect pollinators, especially bees, are essential for the production of crops used for human consumption. Honeybees are very successful pollinators partly because of their large numbers, but they face especially high risks from pathogens, due to their crowded living conditions. Knowledge of the molecular mechanisms of pathogenesis is essential to control and cure the diseases.

The bacterium *Paenibacillus larvae* is the causative agent of the honey bee disease American foulbrood. Chan *et al.* (submitted) sequenced and annotated the genome of *P. larvae* recently and through *in silico* analyses they predicted more than 200 potential virulence genes. It is expected that some genes, which are important for the infection of the brood of the honey bee, will be differentially regulated when *P. larvae* gets in contact with hemolymph.

A quantitative PCR (Q-PCR) was performed to deduce whether ten potential virulence genes are differentially expressed when *P. larvae* was grown in the presence of hemolymph. First some preliminary tests were done, to determine the conditions for the Q-PCR experiment. It was found out that *P. larvae* BRL-230010 grows very fast in BHIT-medium and that no endospores are formed. These conditions are perfect, because the endospores are metabolically inert, dormant structures, while the vegetative cells cause the clinical symptoms of the disease. So the goal was to investigate the expression pattern of the vegetative cells.

It seemed impossible to collect the hemolymph sterile, so the hemolymph was sterilized through a 0,2 µm filter. The filter sterilized hemolymph was also free from hemocytes and fat cells. A *P. larvae* culture grown to an OD₅₉₀ of approximately 0,2 was split into two aliquots, of which one was spiked with hemolymph and one with PTU (control). Samples were collected 1 h, 3 h and 9 h after spiking. Subsequently the gene expression level of ten potential virulence genes was quantified at each time point. The gene expression level in presence of hemolymph was quantified relative to the gene expression level in the control cultures. Since it is recommended to use multiple appropriate reference genes with stable expression levels between sample groups to normalize the data, three software programs were used: NormFinder, BestKeeper and geNorm to assess candidate reference genes. There was corrected for variations between samples through normalization with the most stable genes. The observed differences in gene expression are therefore solely because of the presence of hemolymph.

Despite the fact that only ten potential virulence genes out of 200 were tested, for some genes an apparent differential gene expression was observed (1 h after spiking half of the genes were downregulated and one gene was upregulated; 3 h after spiking one gene was downregulated and two were upregulated; 9 h after spiking no genes were downregulated and two genes were upregulated). The results of this study will be used to determine the conditions for a microarray analysis, that will investigate the global gene expression profile (of all annotated genes) of *P. larvae* in the presence and absence of hemolymph.

Deel 1: Inleiding

1.1 De honingbij

1.1.1 Het belang van honingbijen en hun plaats in het dierenrijk

Bestuiving, een belangrijke stap voor de seksuele voortplanting van zaadplanten, is een biologisch proces waarbij stuifmeelkorrels uit de helmhokjes van de meeldraden overgebracht worden naar de stempel van de stamper. Dit proces kan zowel volbracht worden door dieren (o.a. insecten, vogels en vleermuizen) als door de wind of door water (Hoff, 2004). Bij veel voedselgewassen (vnl. groenten en fruit) en wilde planten gebeurt de bestuiving door dieren, waarbinnen de insecten (meerbepaald sociale en solitaire bijen) het grootste aandeel hebben (Genersch, 2010). De economische waarde van de bestuiving van cultuurgewassen door insecten bedraagt ongeveer 153 miljard euro. Aangezien dat 10% van de wereldvoedselproductiewaarde is, zijn bestuivende insecten van levensbelang voor de menselijke voedselvoorziening (Gallai *et al.*, 2009). Binnen de insecten is het de groep van de bijen (honingbijen, hommels en vele soorten wilde bijen) die zich echt in bestuiving heeft gespecialiseerd. Door hun eigenschappen zijn het echter de honingbijen (vnl. *Apis mellifera*) die wereldwijd de belangrijkste bestuivers zijn van cultuurgewassen, waardoor ze onmisbaar zijn voor een winstgevend en duurzaam agrocultureel ecosysteem (land- en tuinbouw) en voor de instandhouding van vele niet-agroculturele ecosystemen (Morse, 2000; Yue *et al.*, 2008). De honingbijen zijn namelijk voor hun voeding volledig afhankelijk van bloemen. Het stuifmeel is de eiwit- en mineralenbron voor de honingbij, terwijl de nectar zorgt voor de nodige energie. Andere insecten gebruiken naast stuifmeel en/of nectar ook andere componenten als voedsel (Blacqui re, 2009). Bovenop hun rol als bestuiver zijn de honingbijen ook belangrijk voor de productie van honing, koninginnenbrij, propolis en was (Hansen & Brodsgaard, 1999).

De plaats van de honingbij in het dierenrijk wordt weergegeven in Tabel 1.1. Er zijn vijf soorten honingbijen: de veel voorkomende *A. mellifera*, de reuzenhoningbijen *A. dorsata* en *A. laboriosa*, de Indische honingbij *A. cerana* en de dwerghoningbij *A. florea* (Winston, 1991). De bijen kunnen onderverdeeld worden in twee groepen: de sociale en de solitaire. Al de soorten van de honingbij zijn sociaal, wat wil zeggen dat ze samenleven als een volk (§ 1.1.2). De strikte taakverdeling binnenin een volk en de goede communicatie zorgen ervoor dat honingbijen heel effici nt in een wijde omgeving van het volk nectar en stuifmeel verzamelen, waarbij tegelijkertijd de bestuiving gerealiseerd wordt. De hoge effici ntie wordt bereikt doordat niet alle honingbijen van een volk zelf op zoek gaan naar bloemen. Een kleine groep verkenners zoekt de omgeving af en geeft de informatie door aan het volk (hoeveel bloemen en de nectar- en stuifmeelhoeveelheid). Hierdoor zullen honingbijen vooral foerageren op massaal bloeiende planten. Bijgevolg bezoeken ze bij een (korte) uitbundige bloei dermate veel bloemen (door het groot aantal individuen per volk), waardoor ze ingezet kunnen worden bij grootschalige land- en tuinbouw (monoculturen) (Blacqui re, 2009). Hommels worden ook gebruikt, maar voornamelijk in de glastuinbouw. Binnen de groep van de honingbijen is het *Apis mellifera* (in wat volgt zal de term (honing)bij enkel verwijzen naar

deze soort) die wereldwijd door imkers gehouden wordt en die ingezet wordt voor bovenstaand doel (vanEngelsdorp & Meixner, 2010).

Sociale insecten lopen een groot risico om geïnfecteerd te worden door een heleboel pathogenen. Dit kan verklaard worden doordat ze met heel veel samenleven in een kleine plaats, waardoor de pathogenen zich gemakkelijk kunnen verspreiden (Evans & Pettis, 2005). De honingbijen worden getroffen door virussen, bacteriën, fungi en parasieten. Deze pathogenen kunnen bijgevolg tot grote economische verliezen leiden, doordat ze de gezondheid van de bij kunnen aantasten (Genersch, 2010). Kennis over de manier waarop de pathogenen de gezondheid van de honingbij aantasten is zeer belangrijk om de ziekten te kunnen behandelen en/of voorkomen (Waddell *et al.*, 2007).

Tabel 1.1: De plaats van de honingbij in het dierenrijk [1].

Domein	Eukaryoten
Koninkrijk	Animalia (dieren)
Stam	Arthropoda (geleedpotigen)
Klasse	Hexapoda (insecten)
Orde	Hymenoptera (vliesvleugeligen)
Familie	Apidae (bij-achtigen)
Genus	<i>Apis</i> (honingbijen)
Soort	<i>mellifera</i> , <i>florea</i> , <i>dorsata</i> , <i>laboriosa</i> en <i>cerena</i>

1.1.2 Taakverdeling en ontwikkeling van de honingbij

Honingbijen leven samen in grote groepen, die bijenkolonies of bijenvolken genoemd worden. Binnenin het volk komen verschillende kasten of typen bijen voor (de koningin, darren en werksters), die elk gespecialiseerd zijn in welbepaalde taken. Door hun specialisatie zijn ze hun capaciteit om andere taken te kunnen vervullen grotendeels verloren, waardoor de verschillende individuen afhankelijk zijn van elkaar voor het voortbestaan van het bijenvolk. Zo kan de koningin (één per kolonie) enkel eitjes leggen en is ze niet in staat om een nest te bouwen, broed te verzorgen of voedsel te verzamelen. De darren (enkele honderden per kolonie) dragen enkel bij tot de voortzetting van de soort door te paren met de koningin en ze zijn uitsluitend in de kolonie aanwezig vanaf mei-juni tot september (Winston, 1991). Per kolonie komen 10000 tot 50000 werksters voor, die een verschillende functie hebben afhankelijk van hun leeftijd (Tabel 1.2).

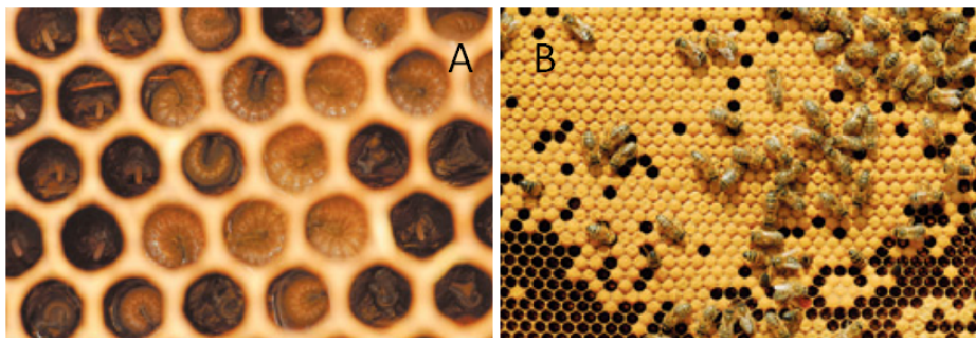
Tabel 1.2: Taakverdeling van de werksters volgens leeftijd [1].

	Taken	
Huisbij (3 weken)	Dag 1-2	Cellen poetsen en broed verwarmen
	Dag 3-5	Voederen van de oudere larven
	Dag 6-11	Voederen van de jonge larven
	Dag 12-17	Wasproductie, ratenbouw en verwerking van nectar tot honing
	Dag 18-21	Wachtdienst aan het vlieggat
Vliegbij (3 weken)	Dag 21-42	Verzamelen van nectar, stuifmeel, water en propolis

De ontwikkeling tot koningin, dar en werkster gebeurt in werkster-, darren- en koninginnencellen. De cellen worden echter niet alleen gebruikt voor het broed, maar ook voor de opslag van honing en pollen. Aan de kleur en de tekstuur van het wasdeksel weet men of de cel gebruikt wordt voor opslag of voor de metamorfose van een larve (bleek en waterdicht versus bruin en poreus respectievelijk). De ontwikkeling tot de verschillende kasten is afwijkend.

- Werksters

De koningin legt één bevrucht eitje (ongeveer 1,5 mm groot) in een werkstercel. Na drie dagen komt het eitje uit en is een kleine doorzichtige larve, die baadt in een melkachtig voer, zichtbaar. De eerste drie dagen wordt de larve gevoed met koninginnenbrij, wat leidt tot een aanzienlijke toename in grootte en gewicht. De volgende drie dagen wordt de larve gevoed met bijenbrood, een mengeling van stuifmeel, honing en water. Na deze zes dagen vult de larve de cel volledig en wordt de broedcel door de werksters afgesloten met een wasdeksel (Figuur 1.1). De larve wordt daarna niet meer gevoed (Chan & Foster, 2008).



Figuur 1.1: A) Gezond open broed. B) Gezond gesloten broed (Cornelissen *et al.*).

Vervolgens spint de larve een cocon en transformeert ze tot een pop. Na 12 dagen popstadium is de bij volledig ontwikkeld en knaagt de jonge bij zich een weg door het wasdekseltje heen. De volledige ontwikkeling van ei tot bij duurt 21 dagen [1].

- Darren

Wanneer de koningin onbevruchte eitjes legt, in cellen die iets groter zijn dan werkstercellen, ontwikkelen ze tot darren. De ontwikkeling verloopt gelijkaardig als bij de werksters. Het eerste verschil zijn de wasdeksels, die plat zijn bij werksterbroed versus hoog en bol bij

darrenbroed. Een ander verschil is de duur van het popstadium: 15 dagen bij darren i.t.t. 12 dagen bij werksters.

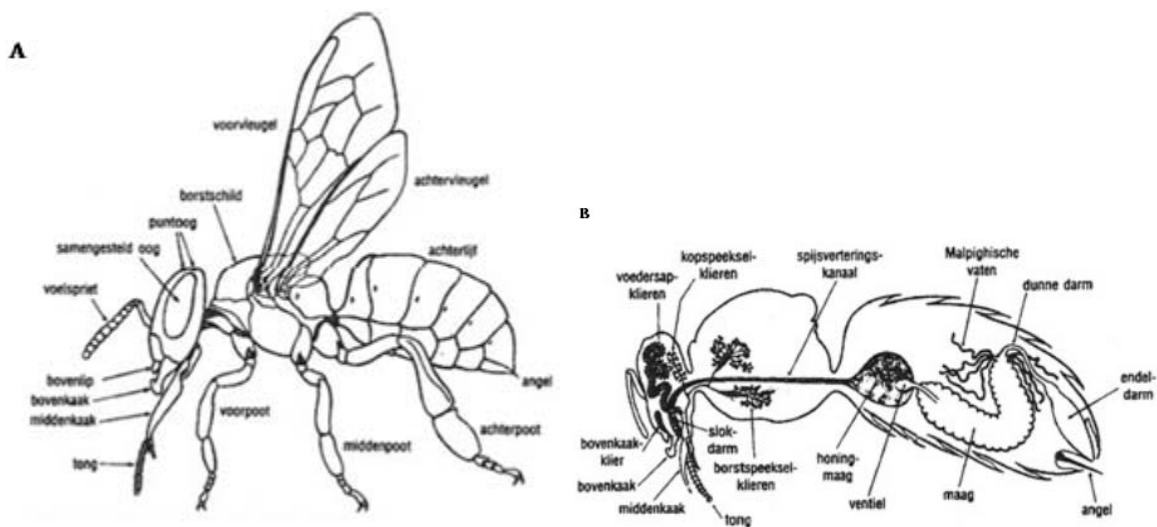
- Koninginnen

De koningin ontstaat net als de werksters uit een bevrucht eitje. De ontwikkeling gebeurt echter in een koninginnencel (ook koninginnendop of moerdop genoemd). Net als bij de werksters en de darren komt het eitje na drie dagen uit, maar de larve zal nu zes dagen gevoed worden met koninginnenbrij. De koningin is reeds na zeven dagen popstadium volwassen.

1.1.3 Anatomie

Het lichaam van de bij is opgebouwd uit drie grote delen (Figuur 1.2 A) nl. de kop, het borststuk (thorax) en het achterlijf (abdomen). Op de kop bevinden zich de ogen, de voelsprieten, de mondopening en de monddelen. Het borststuk bestaat uit drie segmenten, waarop steeds een paar poten gehecht zijn. Het tweede en het derde segment dragen elk een paar vleugels (voorvleugels en achtervleugels respectievelijk). Het achterlijf is samengesteld uit zes segmenten en bevat de angel, klieren, de gifblaas, het vetlichaam en het merendeel van de inwendige organen o.a. organen voor de spijsvertering (Figuur 1.2 B, § 1.3.2), het circulatorisch systeem, de ademhaling en de voortplanting [1].

De hemolymfe (insectenbloed) van de bij is nagenoeg kleurloos, doordat het enkel hemocyten (~ witte bloedcellen bij zoogdieren) bevat. De rode bloedcellen daarentegen, die bij de mens zorgen voor transport van zuurstof, zijn overbodig voor de bij aangezien die over een tracheeënstelsel beschikt voor het transport van zuurstof (Schotanus, 2009). Bijen hebben een halfopen bloedvatenstelsel met één bloedvat (nl. het bijenhart), waarin achter elkaar vijf hartkamers liggen. Via dit bloedvat wordt de hemolymfe van het achterlijf naar de kop gepompt. Verder stroomt de hemolymfe vrij in het lichaam. De hemolymfe brengt bouwstoffen (eiwitten, suikers, minerale stoffen...) naar de organen en is het ook van belang voor de afvoer van afvalstoffen via de buizen van Malpighi [1]. De hemolymfe zorgt eveneens voor de circulatie van de hemocyten, die zeer belangrijk zijn voor de immuunrespons (Tzou *et al.*, 2002).



Figuur 1.2: A) Anatomie van de werkbij. B) Spijsverteringsorganen van de werkbij. De maag wordt ook de middendarm genoemd [1].

1.2 *Paenibacillus larvae*

1.2.1 Algemeenheden en geschiedenis

Paenibacillus larvae is een Gram-positieve, staafvormige bacterie, die motiel is d.m.v. peritriche flagellen. Het is een facultatief anaerobe bacterie, die beter groeit met zuurstof dan zonder (Nordstrom & Fries, 1995). De taxonomische positie van *P. larvae* wordt weergegeven in Tabel 1.3 De endosporen van *P. larvae* zijn zeer infectueus voor de larven van de honingbij, waarin ze Amerikaans vuilbroed veroorzaken (§ 1.3). Het werd reeds aangetoond dat honing of kastmateriaal, gecontamineerd met sporen, een opslagplaats van *P. larvae* zijn. De endosporen kunnen er namelijk 30 tot 40 jaar levensvatbaar in blijven (Cornelissen *et al.*; Lindstrom *et al.*, 2008a).

Tabel 1.3: De taxonomische positie van *Paenibacillus larvae* [2].

Domein	Bacteriën
Koninkrijk	Firmicutes
Klasse	Bacilli
Orde	Bacillales
Familie	Paenibacillaceae
Genus	<i>Paenibacillus</i>
Soort	<i>larvae</i>

P. larvae kan zowel groeien op plaat als in vloeibare cultuur van verscheidene complexe (rijk aan nutriënten) media bij 37°C. In Tabel 1.4 worden de componenten van J-agar, MYPGP-agar en BHIT-agar weergegeven (Nordstrom & Fries, 1995). De detectielimieten van de verschillende media om endosporen van *P. larvae* in honing te detecteren, werden reeds in meerdere studies vergeleken (Dingman & Stahly, 1983; Hornitzky & Nicholls, 1993; Nordstrom & Fries, 1995). *P. larvae* groeit beter op J-agar en MYPGP-agar in een atmosfeer met 5% CO₂, terwijl dit niet het geval is bij BHIT-agar. Om *P. larvae* endosporen te detecteren in honing wordt het best gebruik gemaakt van MYPGP-agar, zowel in geval van aerobe incubatie als in een atmosfeer met 5% CO₂ (Nordstrom & Fries, 1995).

Verskillende *P. larvae* stammen vormen endosporen wanneer ze gegroeid worden op MYPGP-agar, maar niet in vloeibaar MYPGP-medium (Dingman & Stahly, 1983). Gochnauer *et al.* (1973) stelde vast dat een bepaalde *P. larvae* stam 10⁸ endosporen/ml vormde na groei in vloeibaar BHIT-medium, maar andere geteste stammen vormden geen/amper endosporen in het medium.

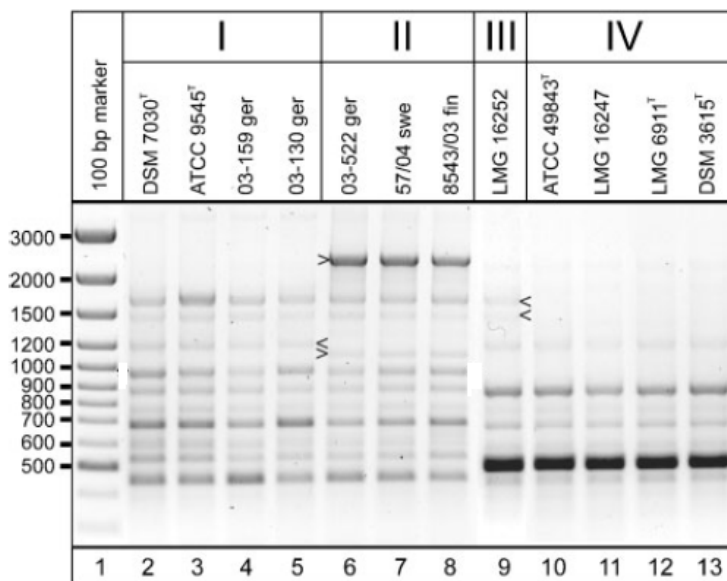
Tabel 1.4: Samenstelling van J-agar, MYPGP-agar en BHIT-agar. d H₂O = gedistilleerd water

J-agar	g/l d H ₂ O	MYPGP-agar	g/l d H ₂ O	BHIT-agar	g/l d H ₂ O
Tryptone	5	Mueller-Hinton	10	Brain Heart Infusion	17,5
Yeast extract	15	Yeast extract	15	Tryptone	10
K ₂ HPO ₄	3	K ₂ HPO ₄	3	glucose	2
Glucose	2	Natriumpyruvaat	1	NaCl	5
Agar	20	Glucose	2	Na ₂ HPO ₄	2,5
		Agar	20	Agar	20
				Thiamine HCl	0,0001

In 1906 werd de verwekker van Amerikaans vuilbroed *Bacillus larvae* genoemd (White, 1906). Veertig jaar later werd een nauw gerelateerd species beschreven nl. *Bacillus pulvifaciens* (Katznelson, 1950). *B. pulvifaciens* werd beschouwd als de verwekker van ‘powdery scale’, een zeldzame broedziekte. Vervolgens werden beide species in 1993 toegewezen aan het genus *Paenibacillus* en in 1996 werd na een taxonomische revisie besloten dat de verwekker van Amerikaans vuilbroed en van ‘powdery scale’ tot hetzelfde species behoort nl. *P. larvae*. Dit species werd onderverdeeld in twee subspecies nl. *P. larvae ssp. larvae* (PlI) en *P. larvae ssp. pulvifaciens* (Plp) (Heyndrickx *et al.*, 1996). In 2006 werd na een polyfasische taxonomiestudie (API, SDS-PAGE, kolonie en sporen morfologie, rep-PCR en PFGE) besloten om de twee subspecies af te schaffen en werd enkel *P. larvae* behouden (Genersch *et al.*, 2006).

1.2.2 Genotypes en virulentie

P. larvae kan onderverdeeld worden in vier verschillende genotypes (ERIC I-IV, Figuur 1.3) op basis van een rep-PCR met ERIC primers (Genersch *et al.*, 2006). De verschillende genotypes verschillen in heel wat fenotypische kenmerken waaronder een verschillende endosporen- en koloniemorfologie, verschillende SDS-PAGE profielen en PFGE patronen (Genersch *et al.*, 2006; Neuendorf *et al.*, 2004).



Figuur 1.3: Rep-profielen van de verschillende *P. larvae* genotypes. De banden die belangrijk zijn om de verschillende genotypes te onderscheiden zijn aangeduid met een pijl (Genersch *et al.*, 2006).

Het belangrijkste is echter hun verschil in virulentie (Genersch *et al.*, 2005). Epidemiologische studies tonen aan dat het ERIC I genotype frequent geïsoleerd wordt uit geïnfecteerde kolonies in Europa en Amerika, terwijl het ERIC II genotype beperkt blijkt te zijn tot Europa (Genersch, 2010). Genotypes ERIC III en IV komen minder frequent voor (Genersch *et al.*, 2006). ERIC I en ERIC II zijn dus de meest voorkomende genotypes en spelen bijgevolg de belangrijkste rol in Amerikaans vuilbroed (Genersch, 2010).

Wanneer larven van de honingbij geïnfecteerd worden met *P. larvae* ERIC II-IV dan duurt het gemiddeld zeven dagen voor al de larven sterven. Hierdoor sterven 90% van de larven nog voor de broedcellen afgesloten worden (§ 1.1.2) en kunnen ze gemakkelijk gedetecteerd en verwijderd worden door de voedsterbijen (werksterbijen van 3-11 dagen oud) (Genersch, 2008). De typische symptomen van Amerikaans vuilbroed (een draderige massa en harde, donkerbruine vuilbroedkorsten, § 1.3.4) zullen daardoor slechts zeldzaam voorkomen in een ERIC II-IV geïnfecteerde kolonie. De verspreiding van de ziekte in de kolonie wordt bijgevolg verhinderd, want de infectieuze endosporen worden veel minder in de kolonie gevormd (Genersch, 2010). Deze genotypes zijn dus zeer virulent voor de larven op individueel niveau, maar hebben een lagere virulentie op kolonieniveau (Rauch *et al.*, 2009).

Een infectie met *P. larvae* ERIC I daarentegen leidt gemiddeld pas na 12 dagen tot sterfte van al de geïnfecteerde larven. Hierdoor sterven 25-40% van de larven na het verzegelen van de broedcellen, waardoor ze moeilijk gedetecteerd en verwijderd kunnen worden door de voedsterbijen. Hierdoor degraderen de larven tot een draderige massa en worden vuilbroedkorsten gevormd, die miljoenen endosporen bevatten en daardoor zeer infectueus zijn (Genersch, 2008). Het ERIC I genotype heeft een lage virulentie op niveau van de individuele larven, maar is zeer virulent op kolonieniveau t.g.v. de korsten die leiden tot de verspreiding van de ziekte in de hele kolonie (Rauch *et al.*, 2009).

1.2.3 Genoom

Proteomics en *transcriptomics* kunnen leiden tot zeer waardevolle kennis over het moleculair pathogeniciteitsmechanisme van *P. larvae*. Vooraleer *-omics* studies van start kunnen gaan is het essentieel om over de genoomsequentie van de pathogeen te beschikken (Chan *et al.*, submitted). Het genoom van *P. larvae* BRL-230010 is voor het eerst gesequeneerd door Qin *et al.* (2006) en er werd een *draft* sequentie bekomen. De sequentie is geannoteerd en de geannoteerde versie is beschikbaar op www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/microbial.

De volledige genoomsequentie (4,3 Mbp) van *P. larvae* BRL-230010 werd recent door Chan *et al.* (submitted) bepaald. De kwaliteit van de sequentie is veel beter dan die bekomen in 2006 (164x *coverage* versus 5 tot 6x *coverage* respectievelijk). Na annotatie konden er 3568 genen voorspeld worden. Met behulp van een massaspectrometrische analyse werd vastgesteld dat minstens 35% van deze genen leidt tot eiwitsynthese. Het belangrijkste opzet van de studie was om potentiële virulentiefactoren te identificeren (§ 1.3.2), wat vervolgens zal leiden tot betere controle- en behandelingsmethoden voor Amerikaans vuilbroed (Chan *et al.*, submitted).

1.3 Amerikaans vuilbroed (AVB)

1.3.1 Bijenziekten

De bijenziekten kunnen onderverdeeld worden in drie groepen, afhankelijk van het stadium waarin de pathogeen voorkomt. De broedziekten (Amerikaans vuilbroed, Europees vuilbroed, kalkbroed, zakbroed en virussen) tasten de bijen in het broedstadium aan (Cornelissen *et al.*). Varroase treft zowel de volwassen bij als het broed, terwijl nosebose, acariose, amoebiase en roer enkel voorkomen bij de volwassen bij.

Amerikaans vuilbroed is de broedziekte met de meest drastische gevolgen, want ze leidt meestal tot afsterven van het hele volk waardoor de bijenpopulatie afneemt (Antunez *et al.*, 2007; Hansen & Brodsgaard, 1999). Deze ziekte van de honingbij heeft dan ook de grootste impact op de industrie. Naar schatting leidt AVB jaarlijks tot 5 miljoen dollar verlies in de Verenigde Staten (vanEngelsdorp & Meixner, 2010). De ziekte wordt veroorzaakt door de endosporen van *P. larvae*, die het enige infectueus stadium van de pathogeen zijn (Hornitzky, 1998). Wanneer ze door de larven via hun voeding (honing en stuifmeel) opgenomen worden, leiden ze tot afsterven van de larve. In de vroege larvale stadia is de opname van een 10-tal endosporen voldoende voor een fatale infectie (Genersch *et al.*, 2005; Woodrow, 1942). Eenmaal een volk geïnfecteerd is, verspreidt de ziekte zich meestal over het hele broednest, waardoor het volk niet meer in staat is om de verouderende bijenpopulatie te verjongen. Dit heeft tot gevolg dat het volk uiteindelijk afsterft (Cornelissen *et al.*). Het is een zeer besmettelijke ziekte en daarom geldt in vele landen, waaronder België, een meldingsplicht (Neuendorf *et al.*, 2004).

Aangezien het een broedziekte is, treft ze enkel de larven. De larven zijn het meest vatbaar voor een infectie tijdens de vroege larvale stadia nl. 12-36 u na het uitkomen van de larve (Genersch, 2010). Verscheidene studies hebben gezocht naar een mogelijke verklaring hiervoor. De vaststelling dat de ontwikkeling van het peritrofe membraan (PM) gerelateerd is met de leeftijd van de larve is een eerste aannemelijke verklaring. De dikte van het PM neemt toe met de leeftijd van de larve, waardoor larven vanaf 48 u na uitkomen beter in staat zijn om bacteriën in het lumen van de middendarm te isoleren (Davidson, 1970). Een leeftijdsafhankelijke expressie van antimicrobiële peptiden (AMP) was een volgende hypothese die onderzocht werd. De antimicrobiële peptiden abaecine en defensine worden echter ook aangemaakt tijdens de eerste larvale stadia (de periode dat de larven het meest vatbaar zijn voor *P. larvae*). Bovendien wordt abaecine meer aangemaakt in het eerste larvale stadia dan in de latere larvale stadia (Evans, 2004). Enkele jaren later stelden Chan & Foster *et al.* (2008) vast dat de hoeveelheden van de meeste immuunfactoren niet significant gecorreleerd waren met de leeftijd van de larven. Het profenoloxidase (PO) en het AMP apismine vertoonden echter wel een leeftijdsafhankelijke expressie, wat suggereert dat één of beide van deze factoren een rol speelt in de leeftijdsafhankelijke vatbaarheid van de larven voor AVB. Chan *et al.* (2009) kon aantonen dat de enzymactiviteit van het PO pas detecteerbaar is wanneer de larven drie dagen oud zijn. Tijdens de periode daarvoor, wanneer de larven het meest vatbaar zijn voor *P. larvae*, kon geen PO activiteit vastgesteld worden. Dit toont aan dat het PO significant aanwezig is in de hemolymfe van oudere larven, waardoor zij de PO *pathway* kunnen gebruiken om de infectie te bestrijden (Chan *et al.*, 2009). De desbetreffende *pathway* leidt tot de productie van toxische quinones, reactieve

zuurstof species en melanine (Tzou *et al.*, 2002). De toxische componenten remmen de bacteriële groei af en de melanine speelt o.a. een rol bij het afsluiten van wonden en het inkapselen van micro-organismen en parasieten (Cerenius *et al.*, 2010; Randolt *et al.*, 2008; Tzou *et al.*, 2002). Voor uitgebreide informatie over de PO *pathway* kan de *review* van Cerenius *et al.*(2008) geraadpleegd worden.

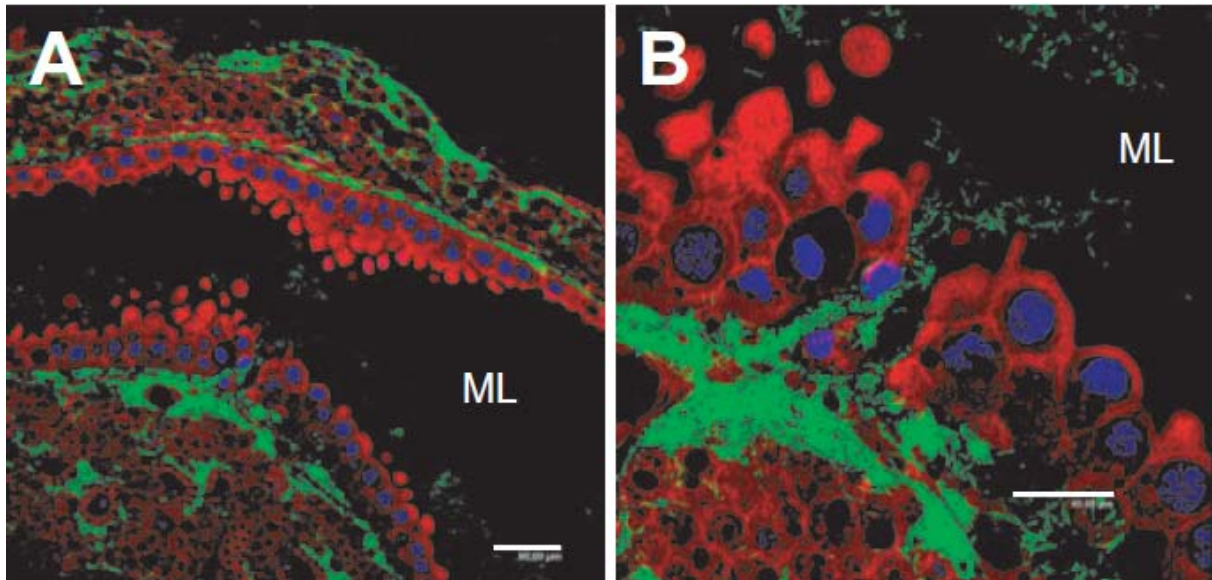
1.3.2 Pathogenese

De pathogeniciteit van een pathogeen is zijn vermogen om ziekte te veroorzaken. Het is een kwalitatieve term, wat wil zeggen dat de pathogeen al dan niet ziekte kan veroorzaken in de gastheer. Virulentie daarentegen is een kwantitatieve term, die de mate waarin een pathogeen ziekte kan veroorzaken weergeeft (Fünfhaus, 2009). Voor een welbepaalde gastheer en pathogeen is de pathogeniciteit absoluut, terwijl de virulentie variabel is t.g.v. invloeden van de omgeving (Shapiro-Ilan *et al.*, 2005). De genen die coderen voor elementen die bijdragen tot de virulentie worden virulentiefactoren genoemd (Fünfhaus, 2009; Hacker *et al.*, 1997). Toxines, adhesines en antibiotica zijn voorbeelden van virulentiefactoren (Madigan & Martinko, 2006).

Virulentiegenen kunnen gelocaliseerd zijn op mobiele genetische elementen zoals plasmiden, bacteriofagen en transposons, bovendien worden de meeste bacteriële pathogenen gekenmerkt door pathogeniciteitseilanden in hun genomsequentie (Hacker *et al.*, 1997). De eilanden (10 tot 200 kb) bevatten één of meerdere virulentiegenen en het GC% van de eilanden verschilt van het GC% van de rest van het genoom. Dat verschil in GC% wordt gebruikt om nieuwe pathogeniciteitseilanden te identificeren (Schmidt & Hensel, 2004). In de *draft* sequentie bekomen door Qin *et al.*(2006) zijn geen pathogeniciteitseilanden teruggevonden, deze analyse zal echter herhaald moeten worden op de recent bepaalde genomsequentie door Chan *et al.* (submitted). De meeste pathogenen die geen pathogeniciteitseilanden bezitten in hun genoom zijn zeer sterk geadapteerd aan hun gastheer en dit gaat samen met een reductie van hun genoom (Schmidt & Hensel, 2004). Pathogenen die wel pathogeniciteitseilanden bezitten, zijn daarentegen veel minder geadapteerd aan één welbepaalde gastheer. Tot nu toe is de honingbij de enige gekende gastheer van *P. larvae*, dit zou een verklaring kunnen zijn waarom *P. larvae* niet beschikt over de eilanden (Genersch, 2010).

Ondanks dat Amerikaans vuilbroed en zijn verwekker *P. larvae* reeds meer dan een eeuw beschreven zijn, staat de kennis over de algemene en de moleculaire pathogenese van deze ziekte nog steeds in zijn kinderschoenen. Pas in 2008 werden, m.b.v. fluorescente *in situ* hybridisatie (FISH) met een *P. larvae* specifieke 16S rRNA probe, de vroege stappen van de pathogenese van het ERIC I en ERIC II genotype van *P. larvae* bepaald (Yue *et al.*, 2008). Voor beide genotypes werden dezelfde stappen waargenomen. De larven nemen de endosporen op via hun voeding en de sporen kiemen ongeveer 12 u na de opname in het lumen van de middendarm (Figuur 1.2). Vervolgens prolifereren de vegetatieve bacteriën in de middendarm tot een zeer hoge dichtheid zonder dat ze visuele schade berokkenen aan het epitheel (de epitheelcellen zijn metabolisch actief en er werd geen schade aan de nucleï vastgesteld). Tijdens deze fase werden bovendien geen bacteriën gedetecteerd in het hemocoel. *P. larvae* gedraagt zich op dat moment als een commensale bacterie en verbruikt de voeding die opgenomen wordt door de larven. De massale proliferatie van *P. larvae* kan bijgevolg verklaard worden doordat suikers de belangrijkste component zijn van het larvale dieet en *P. larvae* beschikt over enzymen van de glycolyse, de pentose fosfaat en de Enter-

Doudoroff *pathways* om deze suikers te kunnen metaboliseren (Julian & Bulla, 1971). Het peritrofe membraan (PM) van een geïnfecteerde larve heeft als functie om bacteriën in het lumen van de middendarm te isoleren, maar in jonge larven (12-36 u) is het PM nog niet volledig ontwikkeld, waardoor *P. larvae* het PM kunnen penetreren. *P. larvae* bereikt hierdoor het epitheel om via de paracellulaire weg in het hemocoel terecht te komen (Figuur 1.4), wat leidt tot sterfte van de larve (Davidson, 1970; Yue *et al.*, 2008).



Figuur 1.4: Fluorescente *in situ* hybridisatie (FISH) analyse van *Paenibacillus larvae* die het middendarmepitheel van de larve penetreren. Met behulp van differentieel gelabelde probes is *P. larvae* groen gekleurd en de eukaryote cellen van de larven zijn rood gekleurd. De eukaryote nucleus is blauwgekleurd door TO-PRO-3 jodide. A) *P. larvae* migreren vanuit het lumen van de middendarm (ML) naar het hemocoel. B) Een uitvergroting van Figuur A: *P. larvae* bevindt zich intercellulair (Yue *et al.*, 2008).

P. larvae secreteren zeer actieve proteasen tijdens hun vegetatieve groei en tijdens de sporulatie (Dancer & Chantawannakul, 1997). Waarschijnlijk zijn een aantal van deze proteasen verantwoordelijk voor de degradatie van de cel-cel en de cel-matrix juncties, waardoor de integriteit van het epitheel lokaal verloren gaat en *P. larvae* toegang heeft tot het hemocoel (Genersch, 2010). De proteasen lijken cruciale virulentiefactoren, want ook in de volgende stap, waar ze verantwoordelijk zijn voor de degradatie van de larven tot een bruine, vloeibare, draderige massa (= een rotte larve), zijn ze belangrijk. Vervolgens droogt de draderige massa op tot een harde schaal (vuilbroedschaal, Figuur 1.5), die zeer infectueus is doordat ze miljoenen endosporen bevat (een dode larve kan $2,5 \times 10^9$ endosporen bevatten) (Genersch, 2008; Lindstrom, 2008b). De endosporen worden niet uitsluitend gevormd in de vuilbroedschaal, maar ze worden gevormd tijdens alle stadia van het infectieproces (Yue *et al.*, 2008). In de volgende alinea wordt het onderzoek naar de moleculaire pathogenese van *P. larvae* besproken.



Figuur 1.5: De dode larven vormen een vuilbroedschaal (Cornelissen *et al.*).

Om de pathogeniciteitsmechanismen van *P. larvae* te begrijpen is het essentieel om de virulentiefactoren te identificeren en te analyseren. Fünfhaus *et al.* (2009) voerden een vergelijkende genomische analyse uit op verschillende *P. larvae* pathogenen (genotypes ERIC I-IV), die van elkaar verschillen in verscheidene fenotypische eigenschappen waaronder hun virulentie. Ze identificeerden genen die belangrijk zijn voor de virulentie en die uniek zijn voor elk genotype. Er konden 106 mogelijke virulentiegenen bepaald worden, die coderen voor enzymen of eiwitten die betrokken zijn bij:

- informatieopslag en -verwerking (transcriptie, DNA-replicatie, -recombinatie en -herstel)
- cellulaire processen (verdedigingsmechanismen, signaaltransductie, celwand-, membraan-, en envelopbiogenese, intracellulair transport, secretie, vesiculair transport, posttranslationele modificatie...)
- metabolisme (suikers, aminozuren...)
- biosynthese van antimicrobiële peptiden (mycosubtiline, itureïne, bacitracine...) en toxines (MTX1 en hemolysine)

De betreffende studie stelde bovendien vast dat het genoom van *P. larvae* codeert voor één of meerdere genclusters voor niet-ribosomale peptide synthasen (NRPS) en polyketide synthasen (PKS) (Fünfhaus, 2009). NRPS en PKS zijn grote multi-modulaire enzymen die leiden tot de productie van een grote diversiteit van niet-ribosomale peptiden (NRP) en polyketiden (PK). Deze producten vertonen verschillende biologische activiteiten (antimicrobieel, antifungaal of antiparasitair) die belangrijk zijn voor het overleven van een micro-organisme en/of voor zijn pathogenese (Keller *et al.*, 2005). Genclusters zijn echter ongewoon voor pathogenen, want de aanmaak van PKS en NRPS vergt zeer veel energie, tijd en substraten (Genersch, 2010; Reva & Tummeler, 2008). De aanwezigheid in het genoom van *P. larvae* moet dus essentieel zijn voor de pathogeen. Een mogelijke verklaring is dat de pathogeen de antibiotica gebruikt om antagonistische bacteriën in de middendarm van de larve af te doden (Evans & Armstrong, 2006; Genersch, 2010). De middendarm van de larve is echter steriel in de periode dat de larve het meest vatbaar is voor *P. larvae* (12-36 u na het uitkomen van de larve) doordat ze dan koninginnenbrij eten, dat een bactericide werking heeft (McCleskey & Melampy, 1939). Het lijkt dus onwaarschijnlijk dat de antibioticaproductie noodzakelijk is om een infectie te kunnen realiseren. Tijdens latere stadia van de larvale ontwikkeling verandert de situatie doordat het larvaal dieet nu aangevuld wordt met nectar en pollen, die gecontamineerd zijn met bacteriën en fungi. Hierdoor is er een diverse microflora aanwezig in de middendarm

van de larve en zouden de antibiotica wel een rol kunnen spelen om andere bacteriën af te doden, zodat *P. larvae* over voldoende nutriënten beschikt (Mohr & Tebbe, 2006). Er wordt aangenomen dat de antibioticaproductie daardoor belangrijker is voor de traag dodende *P. larvae* (ERIC I) dan voor de snel dodende (ERIC II-IV). Dit is in overeenstemming met het feit dat genen die een rol spelen bij antibioticaproductie voornamelijk geïdentificeerd zijn bij ERIC I (Fünfhaus, 2009). Aangezien al de bovenstaande potentiële virulentiegenen geïdentificeerd werden d.m.v. subtractieve suppressie hybridisatie van de verschillende genotypes werden geen genen geïdentificeerd die gemeenschappelijk zijn voor de verschillende genotypes van *P. larvae*. Verder onderzoek is dus vereist om de algemene virulentiefactoren te bepalen en om de voorgestelde genotype specifieke virulentiegenen genomisch en functioneel te analyseren (Fünfhaus, 2009).

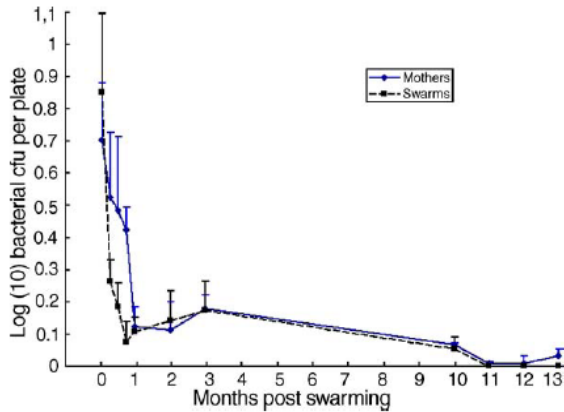
Neunendorf *et al.* (2004) ontdekte dat enkel het ERIC II genotype over plasmiden beschikt (nl. pPII9.4 en pPII11.0 van 9.4 en 11 kb respectievelijk). Het gen dat codeert voor het Cry toxine van *Bacillus thuringiensis* (een insecticide, Gram-positieve, sporenvormende bacterie) is meestal gelegen op een groot plasmide. Mogelijk levert een analyse van de twee plasmiden belangrijke virulentiegenen op (Schnepf *et al.*, 1998).

Sinds kort is het volledige genoom van *P. larvae* gekend en geannoteerd (§ 1.2.3). Om het genoom correct te assembleren werden de *contigs* geordend op basis van het genoom van een gerelateerde (93% sequentiesimilariteit van het 16S rRNA gen) bodembacterie nl. *P. JDR2*. Het is een interessante vaststelling dat regio's die weinig geconserveerd zijn tussen beide species, potentiële virulentiegenen bevatten. Deze voorspelde virulentiegenen omvatten onder andere proteasen (36), hemolysines (6), toxines (16), type I polyketide synthetasen (2), flagel proteïnen (83) en antibiotica resistentiegenen (85) (Chan *et al.*, submitted). Dit geannoteerd genoom biedt veel mogelijkheden om het pathogeniciteitsmechanisme van *P. larvae* op moleculaire niveau te ontrafelen o.a. *primerdesign* voor potentiële virulentiegenen, analyse van de expressieprofielen m.b.v. kwantitatieve PCR (Q-PCR) en een micro-array analyse.

1.3.3 Verspreiding

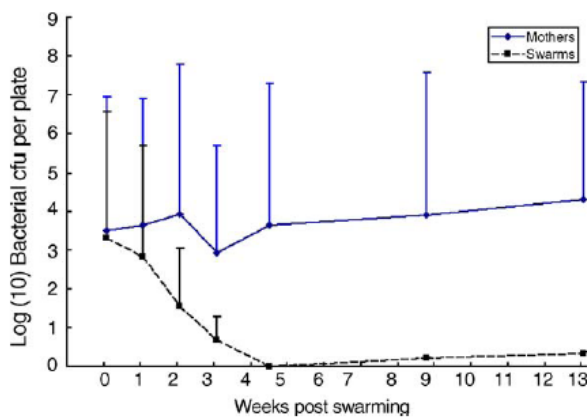
Aangezien *P. larvae* afhankelijk is van zijn gastheer om zich te kunnen reproduceren, moet de bacterie overgedragen worden van gastheer naar gastheer, zodat *P. larvae* aanwezig blijft in de larvenpopulatie (Genersch, 2010). De endosporen, die zeer hardnekkig -ze zijn bestand tegen hitte, koude, droogte en vochtigheid- en talrijk zijn, zorgen voor transmissie van de ziekte zowel binnen de kolonie als naar andere kolonies, waardoor het bijzonder moeilijk is om de ziekte te controleren (Genersch, 2010). Gedurende lange tijd werd gedacht dat AVB horizontaal verspreid werd, maar later werd vastgesteld dat de transmissie zowel horizontaal als verticaal gebeurt (Fries *et al.*, 2006; Genersch, 2008). Verticale transmissie betekent dat de pathogeen doorgegeven wordt van generatie op generatie. In een bijenkolonie is niet het individu van belang, maar wel het gehele volk. Wanneer het volk te groot wordt, zal het zich splitsen door te zwermen. In 2006 werd aangetoond dat endosporen van *P. larvae* doorgegeven worden aan de dochterkolonies wanneer een moederkolonie met AVB deelt. Aangezien de endosporen verspreid worden door de adulte bijen, zorgen zij voor de transmissie van de broedziekte. Wanneer de moederkolonie geen visuele symptomen van AVB vertoont, daalt het sporenaantal zowel in de moeder- als in de dochterkolonie(s) (Figuur 1.6), maar er is geen significant verschil (Fries *et al.*, 2006). Zelfs dertien maanden na het zwermen bleef het sporenaantal in de dochterkolonie zeer laag, waardoor aangetoond werd

dat er geen nieuwe endosporen geproduceerd werden. Zwermen kan in dit geval beschouwd worden als een strategie om AVB te bestrijden i.p.v. om de ziekte te verspreiden (Genersch, 2010).



Figuur 1.6: Het verloop van het aantal endosporen aanwezig in moeder- en dochterkolonie(s) na zwermen. De moederkolonie vertoonde geen visuele symptomen van Amerikaans vuilbroed (Fries *et al.*, 2006). CfU = colony forming units

Als de moederkolonie daarentegen wel symptomen vertoont, dan wordt een significant verschil in het sporenaantal waargenomen. De moederkolonie blijft ook na het zwermen geïnfecteerd, zoals waargenomen wordt aan de hoeveelheid endosporen (Figuur 1.7). In de zwermen (dochterkolonies) daarentegen daalt het aantal endosporen sterk en deze kolonies vertonen geen symptomen (Fries *et al.*, 2006). Het aantal endosporen neemt echter na vijf weken opnieuw toe, waardoor aangetoond wordt dat er nieuwe endosporen geproduceerd worden in de dochterkolonies. Het zwermen van kolonies met visuele symptomen kan dus wel beschouwd worden als een verticale transmissieroute (Genersch, 2010).

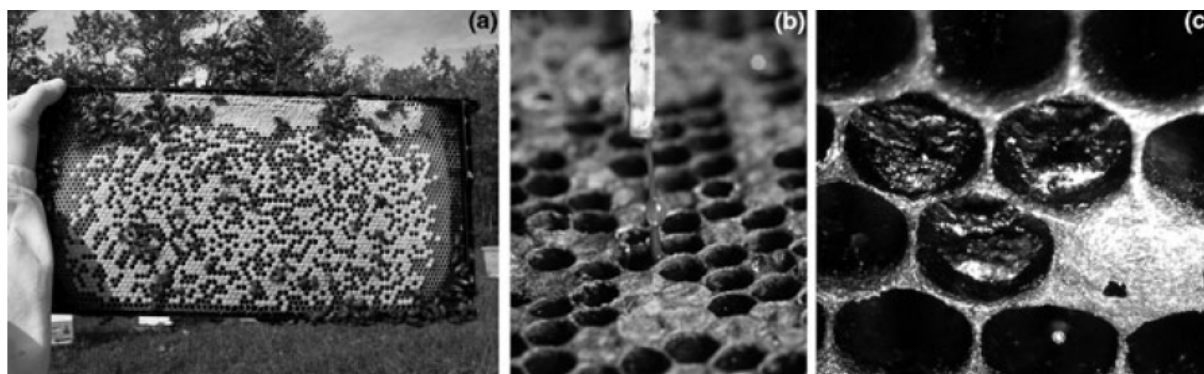


Figuur 1.7: Het verloop van het aantal endosporen aanwezig in moeder- en dochterkolonie(s) na zwermen. De moederkolonie vertoonde wel visuele symptomen van Amerikaans vuilbroed (Fries *et al.*, 2006). CfU = colony forming units

Horizontale transmissie daarentegen is onafhankelijk van de voortplanting van de gastheer en kan gerealiseerd worden doordat werksterbijen honing stelen van kolonies die verzwakt zijn (Lindstrom, 2008b). Als de kolonie verzwakt is t.g.v. Amerikaans vuilbroed, dan zal de stelende werksterbij endosporen transporteren naar haar eigen kolonie, waardoor die ook geïnfecteerd zal worden. Een andere manier van horizontale transmissie wordt gerealiseerd doordat sommige werksterbijen na een foerageertocht per ongeluk een andere kolonie binnenvliegen. Normaal gezien worden bijen van andere kolonies tegengehouden door de bijen die de wacht houden, maar soms kunnen de wachterbijen omgekocht worden m.b.v. honing en wordt de vreemde werksterbij binnengelaten (Genersch, 2008). Beide gevallen van horizontale transmissie gebeuren vaker wanneer de dichtheid van kolonies hoog is, waardoor aangenomen kan worden dat horizontale transmissie bevordert wordt door het imkeren (Genersch, 2008; Lindstrom, 2008b). Bovenop deze twee natuurlijke horizontale transmissieroutes wordt AVB ook horizontaal verspreid door de uitwisseling van besmet kastmateriaal tussen verschillende kolonies en door de handel van koninginnen en honing (Ashiralieva & Genersch, 2006). Hierdoor is AVB wereldwijd verspreid.

1.3.4 Symptomen

Een geïnfecteerde larve degradeert tot een bruine, vloeibare, draderige massa, die m.b.v. een lucifer draadvormig (10-30 mm) uitgerokken kan worden (Figuur 1.8 B). Deze luciferproef wordt vaak gebruikt door imkers als eerste indicatie voor Amerikaans vuilbroed. Het is echter slechts een indicatie, want ook andere ziekten kunnen leiden tot een draderige massa (de Graaf *et al.*, 2006a). Naarmate de infectie verder gevorderd is, verkleuren de wasdeksels van cellen waarin een dode larve aanwezig is. De deksels worden donkerder en grijsig en ze zakken in. Werksters perforeren de ingedeukte deksels in een poging om de geïnfecteerde larven te verwijderen. De draderige massa is echter opgedroogd tot een harde, donkerbruine korst, die moeilijk door de werksters verwijderd kan worden omdat ze kleverig zijn (Figuur 1.8 C). Wanneer een larve echter sterft vooraleer de cel verzegeld wordt, dan wordt de larve die nog geen duidelijke symptomen vertoont, snel verwijderd door de werksters en dit resulteert in een lege cel. Naarmate meer en meer larven geïnfecteerd worden, verschijnt het typisch ‘hagelschotpatroon’ in de raat, dit zijn zowel gezonde cellen, lege cellen en cellen met een ingezakt deksel (Figuur 1.8 A) (Cornelissen *et al.*). Het hagelschotpatroon kan net zoals de draderige massa ook het gevolg zijn van andere ziekten, maar ze worden beide gebruikt als een eerste indicatie voor Amerikaans vuilbroed (de Graaf *et al.*, 2006a). Om te bevestigen dat het effectief om *P. larvae* gaat kunnen verschillende diagnostische testen gebruikt worden o.a. een *P. larvae* specifieke PCR (Dobbelaere *et al.*, 2001), een ELISA (Olsen *et al.*, 1990), een testkit (Vita, Hants, UK) en een microscopische analyse van carbol-fuchsine gekleurde overblijfselen van een dode, geïnfecteerde larve (Hornitzky & Wilson, 1989).



Figuur 1.8: Symptomen van Amerikaans vuilbroed. A) Het hagelshotpatroon. B) De luciferproef. C) Harde, donkerbruine korsten (de Graaf *et al.*, 2006a).

1.3.5 Behandeling

Aangezien AVB een zeer besmettelijke ziekte is, zijn de maatregelen die getroffen moeten worden vaak vastgelegd in de wet (Genersch, 2010). In vele landen wordt de ziekte bestreden door besmette kolonies en honingraten af te branden. Al het materiaal zoals o.a. de kasten worden grondig gereinigd. In de meeste Europese landen is het verboden om antibiotica te gebruiken, maar in een aantal landen zoals o.a. Argentinië, de Verenigde Staten en Canada worden ze veelvuldig gebruikt (Alippi *et al.*, 2007). Antibiotica kunnen echter de infectieuze endosporen niet doden, waardoor ze enkel de klinische symptomen onderdrukken in plaats van te leiden tot herstel. Restanten van de antibiotica kunnen bovendien achterblijven in de honing en dat is niet aanvaardbaar in voeding voor consumptie, aangezien het o.a. kan leiden tot allergische reacties of ernstige neveneffecten in hypersensitieve personen. De antibiotica hebben niet alleen nadelige effecten bij de mens, maar ook op de bijenkolonie zelf. De vitaliteit van het broed en de levensduur van de kolonie worden namelijk getroffen (Genersch, 2010). Tot slot kan het veelvuldig gebruik van antibiotica ook leiden tot antibioticaresistente *P. larvae* (Lee *et al.*, 2009). Tetracycline is het voornaamste antibioticum dat gebruikt wordt om AVB te bestrijden en er zijn inderdaad reeds tetracycline resistente *P. larvae* geïsoleerd uit kolonies met AVB in bepaalde regio's van Argentinië, de Verenigde Staten en Canada (Alippi *et al.*, 2005). De zoektocht naar nieuwe antibiotica is reeds gestart, maar ook tegen deze antibiotica zal vroeg of laat resistentie ontwikkeld worden (Genersch, 2010; Kochansky & Pettis, 2005).

Het is dus noodzakelijk om alternatieve behandelingen voor AVB te vinden. Hiervoor werden verschillende componenten (o.a. afkomstig van de bij) getest op een mogelijke antagonistische activiteit tegen *P. larvae* (Genersch, 2010). Een eerste mogelijke kandidaat is propolis, een lijmachtige substantie die door bijen gemaakt wordt op basis van het hars afkomstig van bomen. Propolis wordt door bijen o.a. gebruikt om kieren te dichten, maar het beschermt de bijen ook tegen infecties doordat het antimicrobiële (antibacterieel, antiviraal, antifungaal) activiteit vertoont (Antunez *et al.*, 2008). Propolis remt inderdaad de groei van verscheidene *P. larvae* stammen. Het extract is echter een complex mengsel, 80-300 verschillende chemische componenten, van o.a. flavonoïden, fenolzuren en terpenen en het is nog niet geweten welke component(en) de inhiberende activiteit veroorzaakt. Verder onderzoek is nodig om de actieve component(en) te zoeken, op te zuiveren en te testen op verscheidene *P. larvae* stammen (Bastos *et al.*, 2008). Lee *et al.* (2009) zochten naar bacteriën

in honing, die een antagonistische activiteit vertonen tegen *P. larvae* tengevolge van hun vermogen tot synthese van antimicrobiële componenten. Het doel van deze studie was om een beschermende microbiële cultuur te kunnen samenstellen om AVB te bestrijden. *Paenibacillus polymyxa* TH13 werd geïsoleerd uit honing en de bacterie inhibeert de groei van *P. larvae* zeer sterk. De antibacteriële component werd gezuiverd en gekarakteriseerd en het gaat over een polymyxine E1, een peptide antibioticum. Verder onderzoek is nodig om nog andere bacteriën te identificeren die antimicrobiële componenten tegen *P. larvae* produceren. Een gebalanceerde samenstelling van die bacteriën zou dan een alternatieve behandeling voor AVB kunnen zijn (Lee *et al.*, 2009).

Deel 2: Doelstelling

Kennis over het moleculair pathogeniciteitsmechanisme van *Paenibacillus larvae* is essentieel om goede controle- en behandelingsmethoden voor Amerikaans vuilbroed te kunnen ontwikkelen (Waddell *et al.*, 2007). Een eerste belangrijke stap is de identificatie van de virulentiefactoren van *P. larvae*. Sinds kort is de genomsequentie van *P. larvae* gekend en via *in silico* analyse werden potentiële virulentiegenen bekomen. Aangezien dit slechts een predictie is, moet er nagegaan worden of die genen inderdaad een rol spelen bij de infectie van larven van de honingbij. Verschillende studies hebben potentiële virulentiegenen van pathogenen geïdentificeerd, doordat ze differentieel tot expressie kwamen in aanwezigheid van gastheerweefsels (Drevinek *et al.*, 2008; Jandu *et al.*, 2009; Mattinen *et al.*, 2008). Op basis hiervan wordt een differentieële expressie van de potentiële virulentiegenen van *P. larvae* verwacht in aanwezigheid van hemolymfe.

Genexpressie-analyses worden steeds belangrijker in het biologisch onderzoek (Vandesompele *et al.*, 2002). Kwantitatieve PCR (Q-PCR) en micro-arrays worden meer en meer gebruikt om differentieële genexpressies vast te stellen. RNA-sequencing is de meest recente techniek om genexpressie te analyseren. De techniek is op dit moment nog duurder dan de gebruikte methoden, maar zal door zijn voordelen (o.a. geen annotatie vereist) een opmars kennen [3]. Micro-arrays worden gebruikt om de expressie van duizenden genen parallel te kwantificeren, terwijl Q-PCR gebruikt wordt om de expressie van een beperkt aantal genen te kwantificeren. Kwantitatieve PCR wordt ook gebruikt om de resultaten bekomen m.b.v. een micro-array onafhankelijk te verifiëren, want Q-PCR leidt tot een accurate en sensitieve kwantificatie van de genexpressieniveaus.

Het doel van deze thesis is om m.b.v. een Q-PCR na te gaan of potentiële virulentiegenen van *P. larvae* differentieel tot expressie komen in de aanwezigheid van hemolymfe. Vooraleer het Q-PCR experiment uitgevoerd kan worden, dienen een aantal preliminaire testen uitgevoerd te worden. De vragen waar in eerste instantie een antwoord op gezocht zal worden zijn:

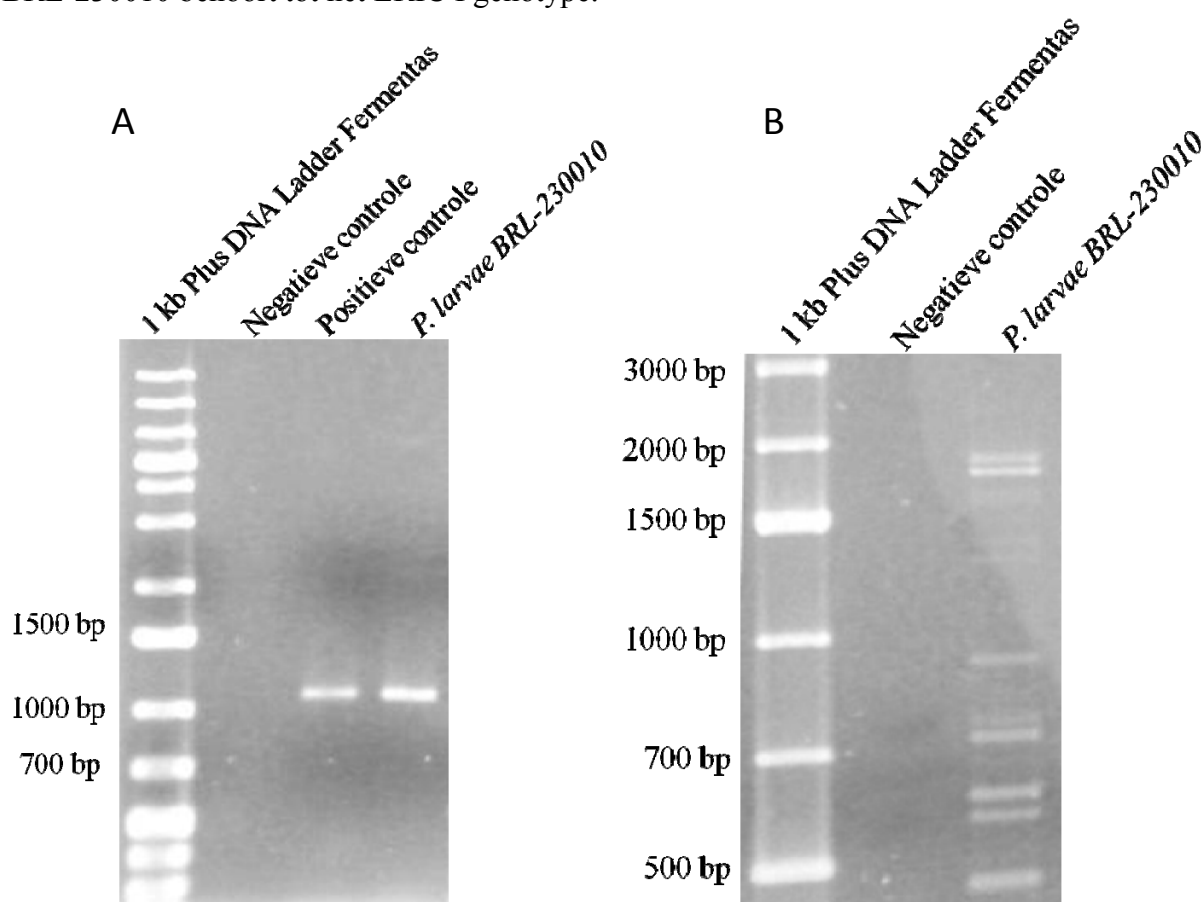
- 1) Welk medium (J-, BHIT- of MYPGP-medium) zal gebruikt worden om de bacterie te cultiveren?
- 2) Hoe kan hemolymfe gecollecteerd en bewaard worden, zodat het ter beschikking is om de bacteriecultuur op het juiste moment te *spiken*?
- 3) Welke verdunning van hemolymfe moet gebruikt worden om de cultuur te *spiken*?
- 4) Op welk moment zal de cultuur *gespiket* worden en op welke tijdstippen zal cultuur gecollecteerd worden?
- 5) Welke RNA isolatiemethode leidt tot de hoogste concentratie RNA, zonder contaminatie met genomisch DNA?
- 6) Welke genen kunnen als huishoudgenen in dit experiment gebruikt worden?
- 7) Welke potentiële virulentiegenen zullen getest worden in het Q-PCR experiment?

Finaal zullen de expressieniveaus van de potentiële virulentiegenen op verschillende tijdstippen na *spiken* met hemolymfe versus PTU (controle) bepaald worden.

Deel 3: Resultaten

3.1 Diagnostische PCR en rep-PCR

De gebruikte stam werd geïdentificeerd d.m.v. de diagnostische PCR ontwikkeld door Dobbelaere *et al.* (2001). Het bekomen amplicon (1106 bp) bevestigt dat de gebruikte stam *P. larvae* is (Figuur 3.1 A). Aangezien de verschillende *P. larvae* genotypes verschillen in hun virulentie, is het belangrijk om het genotype van *P. larvae* BRL-230010 te kennen. Elk genotype (I-IV) heeft een specifiek bandenpatroon na een rep-PCR volgens Genersch *et al.* (2006), beschreven in Paragraaf 1.2.2. De band t.h.v. 970 bp is specifiek voor de ERIC I en II genotypes (Figuur 3.1 B). Het ERIC II genotype heeft daarenboven een prominente band t.h.v. 2800 bp. Op basis van het bekomen bandenpatroon kunnen we besluiten dat *P. larvae* BRL-230010 behoort tot het ERIC I genotype.



Figuur 3.1: A) Agarosegel (0,8%) van de PCR voor de identificatie van de gebruikte stam. De positieve controle is LMG 15969. B) Agarosegel (1,4%) van de rep-PCR voor de genotypering van de gebruikte stam.

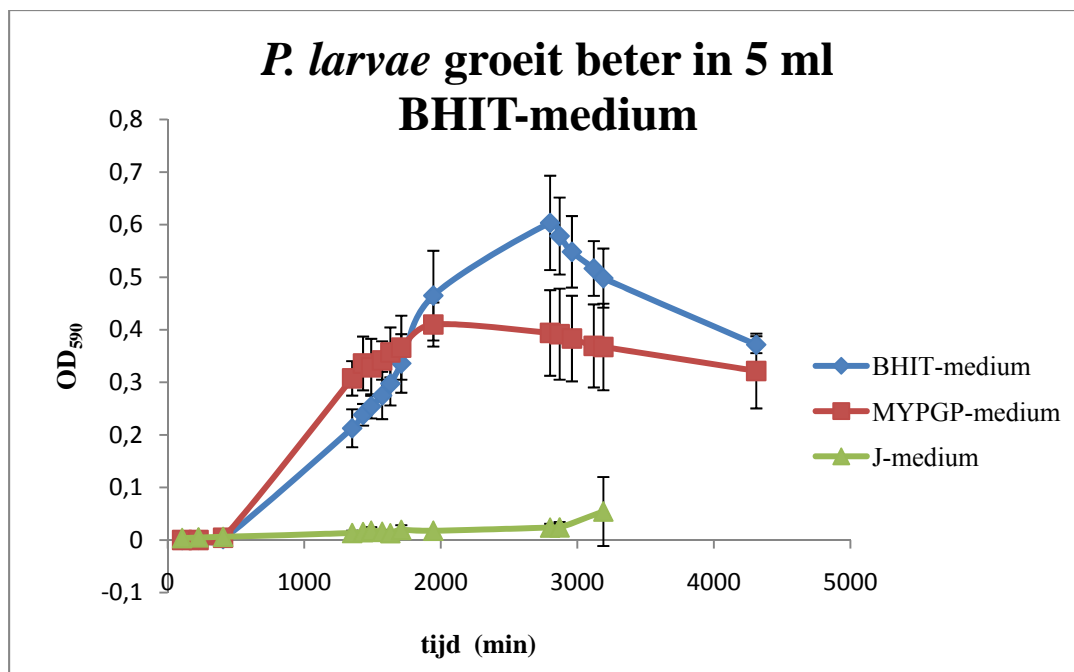
3.2 Preliminare testen

3.2.1 Keuze van het medium

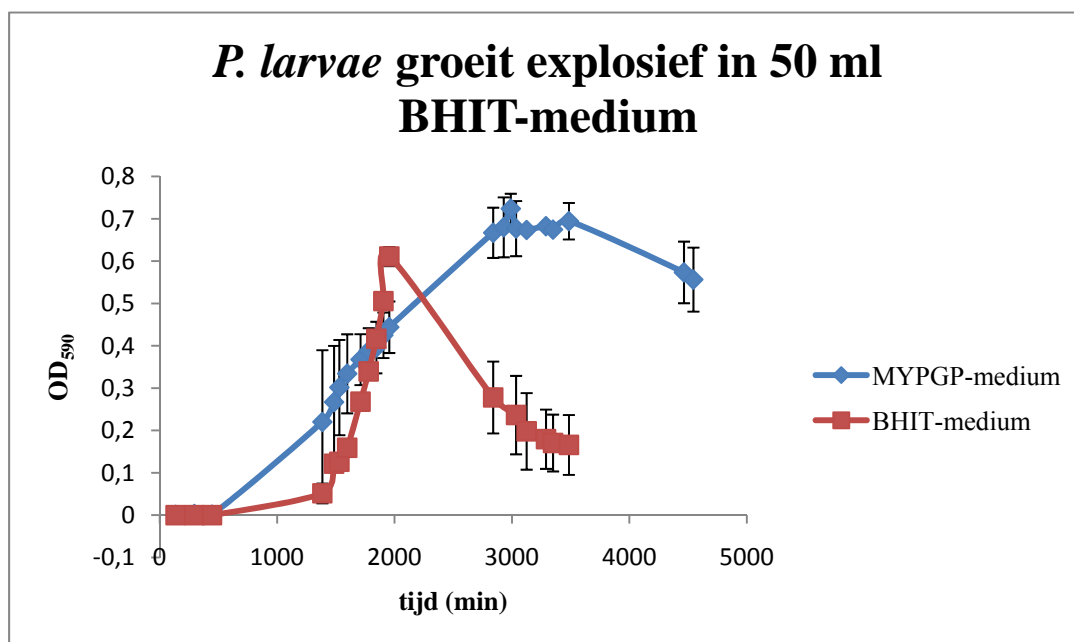
De belangrijkste criteria om te bepalen welk medium (MYPGP-, BHIT- of J-medium) gebruikt zou worden om *P. larvae* te cultiveren, waren: 1) zo weinig mogelijk endosporenvorming en 2) de beste groei. De endosporen zijn de causale agentia en zorgen voor de transmissie van de ziekte, maar het zijn metabolisch inerte, dormante structuren. De vegetatieve cellen daarentegen lokken de klinische manifestaties uit. We wensen dus de genexpressie van de vegetatieve cellen te bestuderen. Groeicurven van *P. larvae* in de drie verschillende media werden bepaald door op regelmatige tijdstippen de OD₅₉₀ te bepalen. Om de hoeveelheid endosporen te bepalen werd een verdunningsreeks gemaakt (10^{-1} - 10^{-6}) van de culturen nadat ze een OD₅₉₀ van 0,1; 0,2; 0,3 en 0,4 bereikt hadden. Van elke verdunning werd 50 µl uitgeplaat zonder en met hitte schok. Door de hitte schok worden vegetatieve cellen afgedood, waardoor het aantal sporen bepaald kan worden.

1) Groeicurven

Een opmerkelijke vaststelling is dat *P. larvae* niet groeide in J-medium, ondanks dat dit medium reeds eerder gebruikt werd om endosporen van *P. larvae* uit honing te detecteren door Hornitzky & Nicholls en Nordstrom & Fries (1993; 1995). In 5 ml culturen groeit *P. larvae* het best in BHIT-medium (hoogste OD₅₉₀ = 0,603 versus 0,410 in MYPGP-medium) (Figuur 3.2). Aangezien grotere culturen gebruikt zouden worden in het finale experiment, werden de groeicurven van *P. larvae* eveneens bepaald in 50 ml BHIT- en MYPGP-medium (Figuur 3.3). In een grotere cultuur groeit *P. larvae* tot een hogere OD₅₉₀ in MYPGP-medium (OD₅₉₀ = 0,724 versus 0,611), maar in BHIT-medium groeit *P. larvae* explosiever tijdens de exponentiële fase. Een merkwaardige vaststelling is dat *P. larvae* reeds na ≈ 2000 min (exact tijdstip niet gekend, doordat 2000 min het laatste meetpunt van de dag was) afsterft in BHIT-medium, terwijl dit in MYPGP-medium pas na ≈ 3500 min gebeurt. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat het MYPGP-medium meer nutriënten bevat die gemetaboliseerd kunnen worden door *P. larvae*.



Figuur 3.2: *P. larvae* groeit beter in 5 ml BHIT-medium. De groeicurven werden bepaald door op regelmatige tijdstippen de OD₅₉₀ te bepalen.

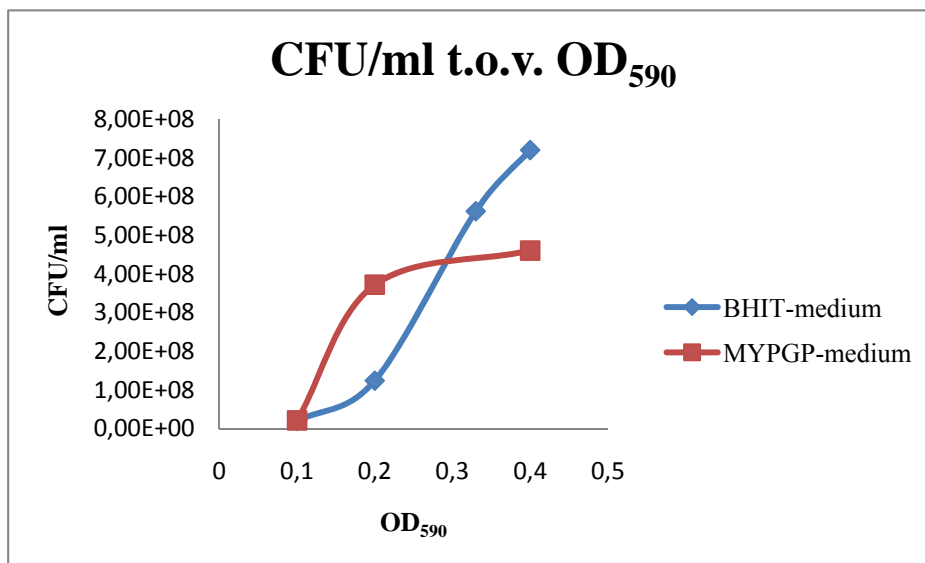


Figuur 3.3: *P. larvae* groeit explosief in 50 ml BHIT-medium. De groeicurven werden bepaald door op regelmatige tijdstippen de OD₅₉₀ te bepalen.

2) Aantal vegetatieve cellen en endosporen

Het aantal vegetatieve cellen vertoont nagenoeg een lineaire verhouding met de OD_{590} in BHIT-medium. De afwezigheid van een lineaire verhouding in het MYPGP-medium is waarschijnlijk te wijten aan het niet zorgvuldig maken van de verdunningsreeks (Figuur 3.4). Op basis van deze lineaire verhouding werd besloten om in het finale experiment de cultuur te *spiken* bij het begin van de exponentiële fase (OD_{590} van $\approx 0,2$), zodat het aantal cellen tijdens de opeenvolgende collectietijdstippen toeneemt.

Endosporen worden enkel gevormd tijdens de stationaire fase, maar aangezien de groeicurve van *P. larvae* nog niet gekend was, werd het aantal sporen reeds vanaf lage OD_{590} 's bepaald (Madigan & Martinko, 2006). In geen enkel medium werden endosporen waargenomen bij de geteste OD_{590} , bij de lagere OD_{590} (0,1 tot 0,3) is dat verwacht, aangezien deze punten in de exponentiële fase liggen (Figuur 3.2). In het MYPGP-medium ligt de OD_{590} van 0,4 aan het begin van de stationaire fase, maar ook hier werden geen endosporen gevormd, zoals ook vastgesteld werd door Dingman & Stahly (1983). Ze stelden eveneens vast dat de sporulatie in vloeibaar medium zeer zeldzaam is en bovendien niet alleen afhankelijk is van het gebruikte medium, maar ook van de stam (Dingman & Stahly, 1983). Op basis van de verkregen resultaten kunnen we besluiten dat *P. larvae* BRL-230010 geen endosporen vormt in de drie geteste media.



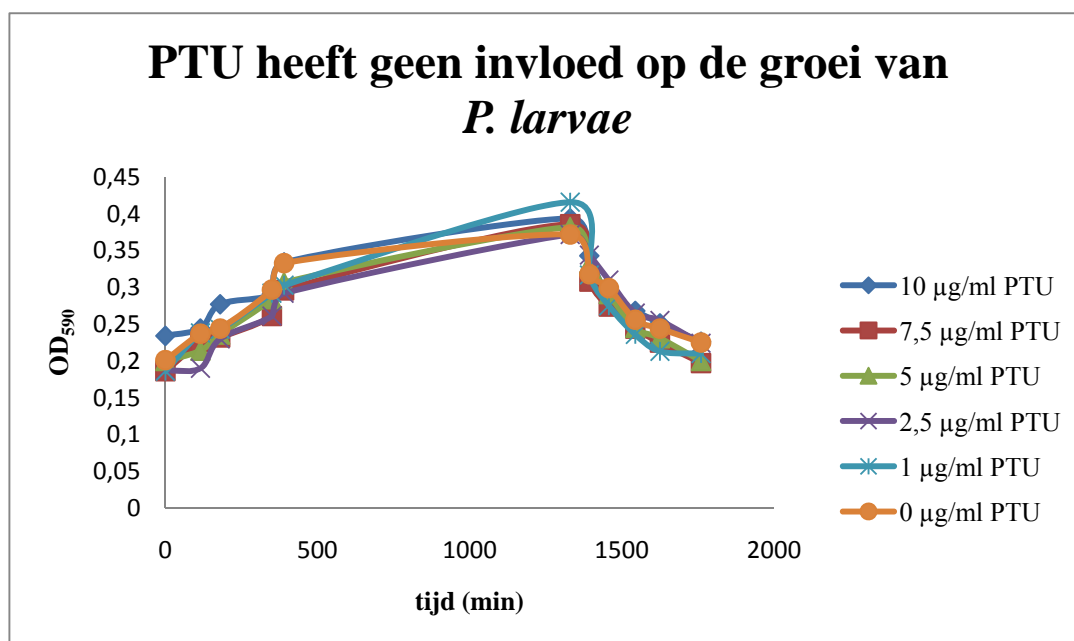
Figuur 3.4: CFU/ml t.o.v. OD_{590} . Deze waarden zijn afkomstig van een 5 ml cultuur. CFU= Colony Forming Units

3) Conclusie

Er werd geopteerd om met het BHIT-medium verder te werken en dit om volgende redenen: 1) in 5 ml culturen groeit *P. larvae* beter (Figuur 3.2) en 2) in grotere culturen is de maximale OD_{590} die behaald wordt iets lager in vergelijking met het MYPGP-medium, maar *P. larvae* vertoont een sterke exponentiële groei in dit medium (Figuur 3.3). Door deze explosieve groei, zal een wijziging in de groei t.g.v. de aanwezigheid van hemolymfe duidelijker waargenomen worden.

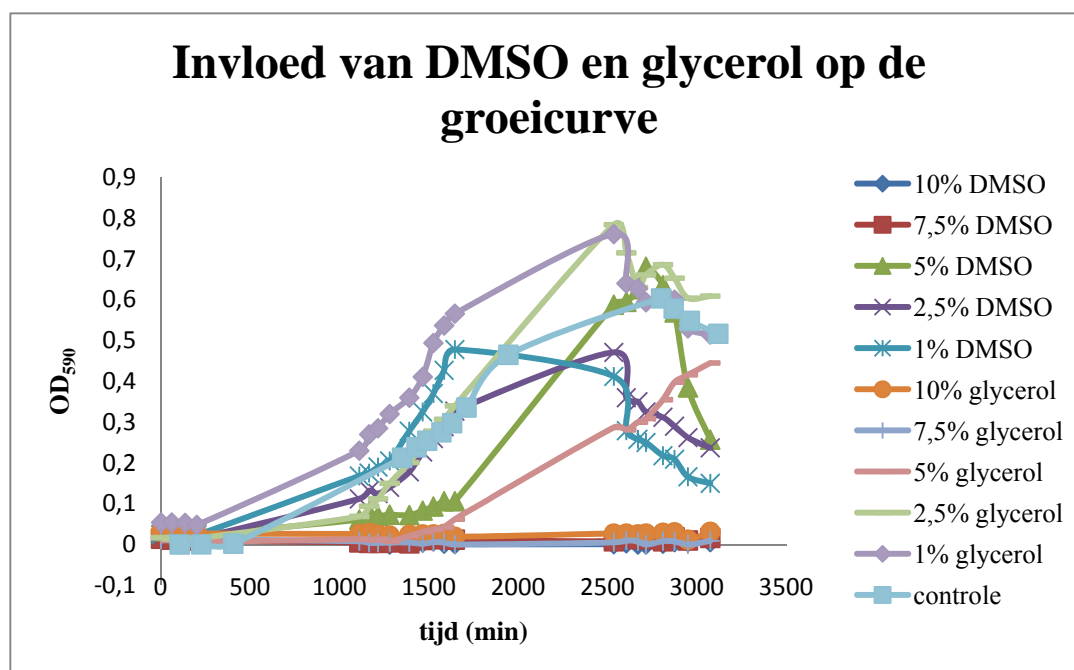
3.2.2 Invloed glycerol, DMSO en PTU op de groeicurve

Om te voorkomen dat de hemolymfe melaniseert tijdens het collecteren, moet fenylthiourea (PTU), een inhibitor van het fenoloxidase, toegevoegd worden. De invloed van verschillende concentraties op de groei van *P. larvae* werd getest om te bepalen welke concentratie gebruikt kan worden. Geen van de geteste PTU concentraties heeft een invloed op de groei van *P. larvae*, waardoor besloten werd om steeds 10 µg/ml (finale concentratie; eveneens gebruikt door Randolt *et al.* (2008)), PTU toe te voegen aan de hemolymfe (Figuur 3.5).



Figuur 3.5: PTU heeft geen invloed op de groei van *P. larvae*. *P. larvae* werd gegroeid in BHIT-medium en PTU werd toegevoegd bij een OD₅₉₀ van 0,198.

Er werd besloten om de *P. larvae* culturen te *spiken* met hemolymfe bij een OD₅₉₀ van $\approx 0,2$. Om gemakkelijk te kunnen werken werd gezocht naar een methode om hemolymfe te bewaren, waarbij de hemocyten intact blijven na invriezen en ontdooien. Twee veelgebruikte cryoprotectants zijn glycerol en dimethylsulfoxide (DMSO). In eerste instantie is het essentieel om na te gaan of deze componenten geen toxisch effect hebben op *P. larvae*. Verschillende verdunningen werden toegevoegd aan *P. larvae* culturen (Figuur 3.6) en hun invloed op de groei werd gevolgd door hun respectievelijke groeicurven te bepalen. Op basis van de behaalde resultaten kunnen DMSO en glycerol niet gebruikt worden als cryoprotectants bij concentraties hoger dan 7,5% en 5% respectievelijk.



Figuur 3.6: Invloed van DMSO en glycerol op de groeicurve. *P. larvae* werd gegroeid in BHIT-medium en DMSO of glycerol werd toegevoegd bij een OD₅₉₀ van 0,204.

3.2.3 Invloed BHIT-medium op hemocyten

Vooraleer de optimale bewaringsmethode voor de hemolymfe te bepalen, werd eerst de invloed van het medium op de integriteit van de hemocyten bestudeerd. Het aantal hemocyten in de hemolymfe werd geteld m.b.v. een Bürker telkamer voor toevoegen van het medium en na toevoeging van het medium en overnacht incubatie bij 37°C. Verschillende verdunningen van de hemolymfe werden getest (Tabel 3.1). Aangezien een zeer groot aantal hemocyten lyseerden in het medium, werd besloten om de hemolymfe zonder cryoprotectants in te vriezen bij -20°C.

Tabel 3.1: Een overzicht van de verschillende % hemolymfe die getest werden.

% hemolymfe	87,50	75	50	25	12,50
Resterend % hemocyten na toevoegen van medium en overnacht incubatie (37°C)	5,53	4,27	3,40	6,27	48,14

3.2.4 Hemolymfe

1) Collecteren

Er werd gezocht naar een methode om hemolymfe steriel te collecteren. Bij al de collectiemethoden werd de hemolymfe op ijs bewaard en werd PTU met een finale concentratie van 10 µg/ml toegevoegd om melanisatie te voorkomen.

In eerste instantie werd getracht om hemolymfe en een kleine hoeveelheid vetcellen te collecteren, aangezien *P. larvae* in de larven met beide fracties in aanraking komt. Bij deze collectiemethode werd er gewerkt in de laminaire flow om de kans op contaminaties tot een minimum te herleiden. De kans dat de hemolymfe gecontamineerd zou worden met darmbacteriën van de larven was echter reëel. Om te bepalen of de collectie van zuiver hemolymfe (= zonder vetcellen) minder vaak tot contaminatie leidt dan de collectie van hemolymfe met vetcellen, werden zowel zuivere hemolymfe *pools* als hemolymfe met vetcellen *pools* gecollecteerd.

Acht *P. larvae* culturen werden *gespiket* met een verschillende hemolymfe *pool* (Tabel 3.2). De culturen groeiden tot zeer hoge OD₅₉₀, welke mogelijk te wijten zijn aan: 1) de hemolymfe zorgt voor de optimale omgeving van *P. larvae* of 2) contaminatie. Contaminatie werd nagegaan door 50 µl van de finale cultuur uit te platen op LB-agar, waarop *P. larvae* niet groeit. Na overnacht incubatie bij 37°C waren de LB-platen van drie culturen reeds volgegroeid (Tabel 3.2). Op de LB-platen van de overige vijf culturen waren geen tot weinig kolonies gevormd. Van die vijf culturen werd een verdunningsreeks (10⁻¹-10⁻¹⁰) van de finale cultuur gemaakt en werd 50 µl van de 10⁻⁷-10⁻¹⁰ verdunningen uitgeplaat op MYPGP-agar. Enkel cultuur 4, een cultuur met zuiver hemolymfe, vertoonde na drie dagen incubatie bij 37°C de koloniemorfologie van *P. larvae*. De gebruikte methode leidt dus over het algemeen niet tot steriel hemolymfe.

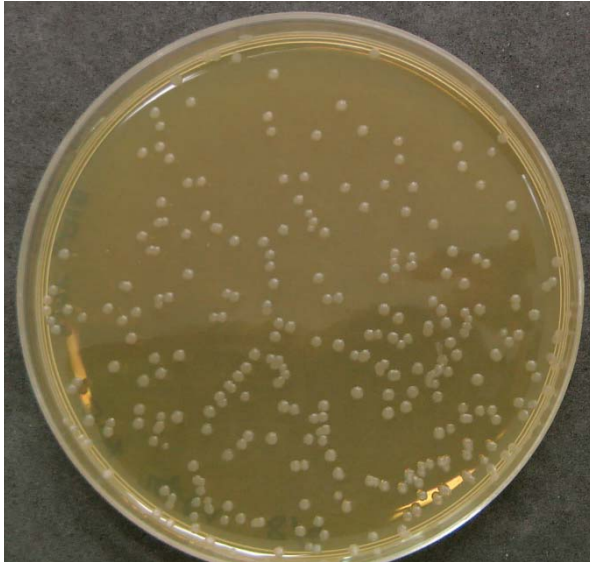
Wegens de beperkte tijdspanne van een thesis werd daarom besloten hemolymfe en vetcellen te collecteren op de bench en na centrifugatie werd het bekomen hemolymfe gesteriliseerd d.m.v. een 0,2 µm filter. De bekomen hemolymfe bevat geen hemocyten en geen vetcellen, maar wel eiwitten, vetten, suikers... die aanwezig zijn in de hemolymfe. Om de steriliteit te bevestigen werd 50 µl hemolymfe uitgeplaat op LB-medium en BHIT-medium, waarop na incubatie geen kolonies waargenomen werden.

Tabel 3.2: Een overzicht van de acht culturen die *gespiket* werden.

Cultuur	1	2	3	4	5	6	7	8
Zuiver hemolymfe	+	-	-	+	-	-	-	-
Hemolymfe en vetcellen	-	+	+	-	+	+	+	+
Maximale OD ₅₉₀	1,803	1,546	1,878	0,978	2,006	1,437	2,426	1,372
Aantal kolonies op LB-agar na 16u (37°C)	0	> 200	> 200	0	6	0	2	> 200
Aantal kolonies op LB-agar na 40u (37°C)	0	> 200	> 200	0	15	0	7	> 200
<i>P. larvae</i>	-	-	-	+	-	-	-	-

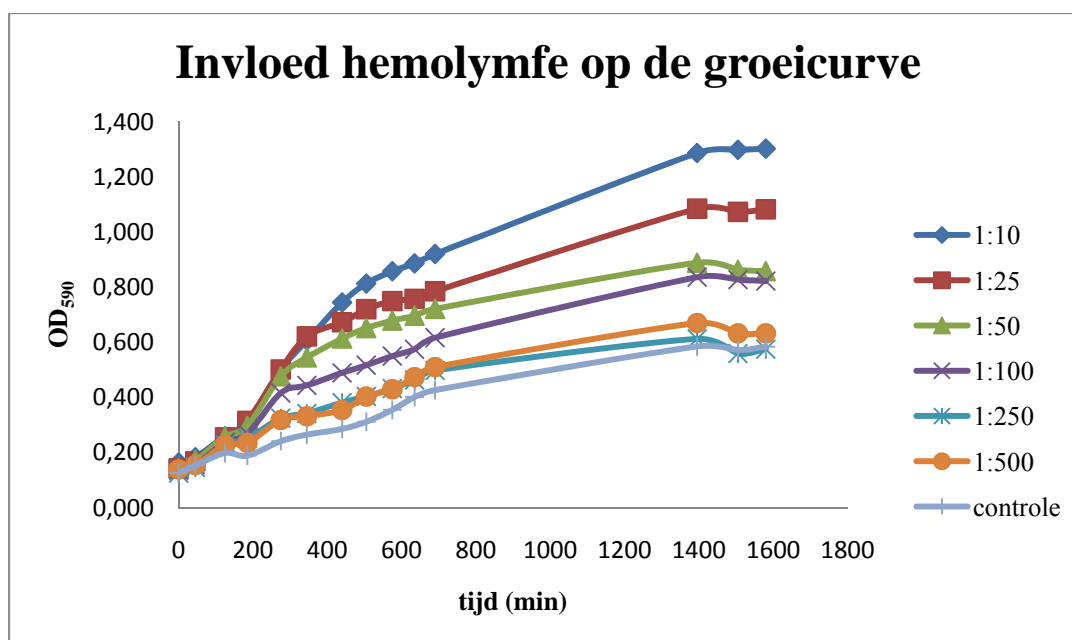
2) Verdunning hemolymfe om te *spiken*

Om te bepalen met welke verdunning van de hemolymfe de *P. larvae* cultuur *gespiket* zou worden, werd de invloed van verschillende hemolymfe verdunningen op de groeicurve van *P. larvae* nagegaan. Op het einde van het experiment werd 50 μ l van de 1:25 cultuur uitgeplaat op BHIT-medium, waarop na incubatie de juiste koloniemorfologie waargenomen werd (Figuur 3.7).



Figuur 3.7: Koloniemorfologie van *P. larvae* gegroeid op BHIT-medium.

Zowel de 1:10 als de 1:25 verdunningen leidden tot een enorme boost van *P. larvae* (maximale OD₅₉₀ van 1,303 en 1,083 respectievelijk t.o.v. 0,584 bij de controle) (Figuur 3.8). Wegens het groot volume hemolymfe dat toegevoegd moet worden aan een 50 ml cultuur en het klein volume hemolymfe per larve (20 tot 30 μ l), werd de 1:25 verdunning gekozen om de volgende experimenten uit te voeren. Op basis van de bekomen groeicurve, werd besloten om cultuur te collecteren 1 u, 3 u en 9 u na *spiken*. Het tijdstip na 1 u werd gekozen om na te gaan of de genexpressie zeer snel na het *spiken* verandert. Het tijdstip na 3 u ligt aan het begin van de exponentiële fase, terwijl het tijdstip na 9 u ongeveer in het midden van de exponentiële fase ligt. Wegens de praktische haalbaarheid was het niet mogelijk om nog meer tijdstippen op te nemen in het experiment.



Figuur 3.8: Invloed van hemolymfe op de groeicurve. *P. larvae* werd gegroeid in 2 ml BHIT-medium en de culturen werden *gespiket* bij een OD₅₉₀ van 0,268. De controle werd *gespiket* met PBS.

3.2.5 RNA isolatie

Gram-positieve bacteriën lyseren door hun dikkere peptidoglycaanlaag moeilijker dan Gram-negatieve bacteriën, waardoor enzymatische lyse en/of mechanische disruptie noodzakelijk zijn. Bovendien bevat het mRNA van prokaryoten geen intronen, waardoor het niet mogelijk is om co-amplificatie van genomisch DNA te voorkomen d.m.v. intronoverspannende primers. Het RNA moet dus vrij zijn van genomisch DNA om het te kunnen gebruiken voor een Q-PCR experiment. Vier verschillende methoden werden getest om RNA te isoleren uit *P. larvae* (Tabel 3.3). Alle methoden maakten gebruik van een gDNA eliminatiekolom en een *on-column* DNase digestie om het genomisch DNA te verwijderen.

Tabel 3.3: De lysemethoden van de verschillende RNA isolatiemethoden.

	Lysemethode
Methode 1	Lysozyme en proteïnase K
Methode 2	Lysozyme, proteïnase K en mechanische disruptie met 0,1 mm Silica Beads
Methode 3	Lysozyme, proteïnase K, mechanische disruptie met 0,1 mm Silica Beads en lyse reagens
Methode 4	Lysozyme en lyse reagens

In eerste instantie werden methode 1, 2 en 3 vergeleken (methode 4 was nog niet ter beschikking). Bij een OD₅₉₀ van 0,168 leidde alleen methode 2 tot een verdubbeling van de opbrengst uit 3 ml cultuur t.o.v. 1,5 ml cultuur (Tabel 3.4). Methode 1 werd achterwege gelaten, want methode 2 en 3 leidden tot een hogere opbrengst. Vervolgens werden methode 2 en 3 herhaald op *P. larvae* cultuur met een OD₅₉₀ van 0,441. Zoals verwacht werd meer RNA geïsoleerd uit deze dichtere culturen. In tegenstelling tot de eerste isolatie, leidde methode 3

nu ook tot een verdubbeling van de opbrengst uit 3 ml cultuur t.o.v. 1,5 ml cultuur. Methode 3 leidde tot de hoogste opbrengst en werd daarom nog eens herhaald op een *P. larvae* cultuur met OD₅₉₀ van 0,480 om ze te kunnen vergelijken met methode 4. Beide methoden leverden een gelijkaardig resultaat voor opbrengst en zuiverheid, maar niet voor de contaminatie met genomisch DNA. Dit werd vastgesteld door een Q-PCR op het bekomen RNA, waaruit bleek dat meer genomisch DNA (= lagere C_T-waarde) aanwezig was in het RNA geïsoleerd met methode 3 dan met methode 4. Methode 4 is bovendien veel goedkoper, het protocol is korter en vereist minder handelingen dan methode 3, waardoor meer stalen tegelijk behandeld kunnen worden.

Tabel 3.4: De opbrengst en de zuiverheid bekomen met de verschillende methoden.

OD ₅₉₀	ml cultuur	Methode 1		Methode 2		Methode 3		Methode 4	
		ng/μl	A260/280	ng/μl	A260/280	ng/μl	A260/280	ng/μl	A260/280
0,168	1,5	23,77	1,61	20,59	1,57	24,76	1,50		
	3	21,91	1,55	50,35	1,51	23,73	1,58		
0,441	1,5			191,75	2,10	238,47	2,08		
	3			418,62	2,14	524,53	2,13		
0,480	3					1196	2,17	1098,39	2,19

3.2.6 Huishoudgenen

De geobserveerde genexpressieniveaus van de potentiële virulentiegenen zullen genormaliseerd worden, om te corrigeren voor variaties tussen stalen (bv. verschil in RNA isolatie, cDNA synthese...). Dat is essentieel zodat het geobserveerd verschil in genexpressie effectief t.g.v. het *spiken* met hemolymfe is. Aangezien universele huishoudgenen niet bestaan, werd er gezocht welke huishoudgenen gebruikt kunnen worden in ons experiment (Thellin *et al.*, 1999). Er werd vertrokken van elf mogelijke huishoudgenen van verschillende functionele groepen, zodat de kans dat ze samen gereguleerd worden minimaal is.

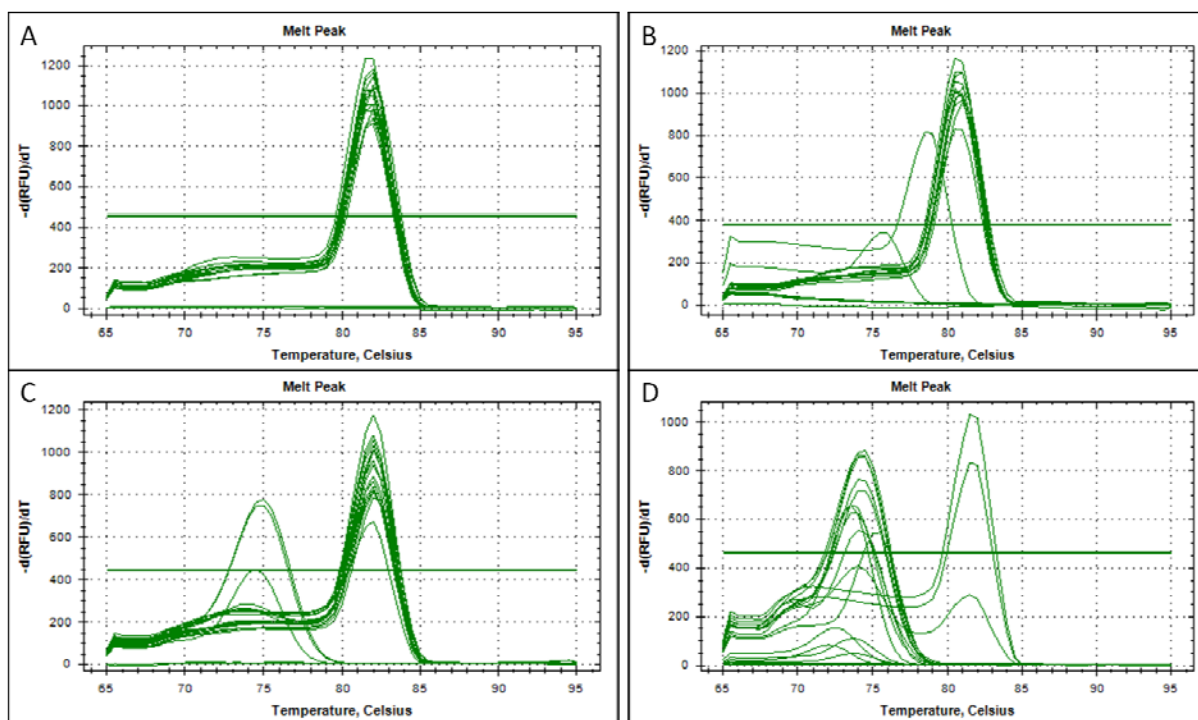
1) PCR-efficiëntie

De PCR-efficiëntie is zeer belangrijk bij een Q-PCR, want indien elke cyclus niet tot een verdubbeling van het aantal kopijen zou leiden, dan zou het mRNA-niveau verkeerd worden ingeschat. Daarom werd voor elk huishoudgen getest of het ontwikkeld primerpaar een efficiëntie van 80%-120% had. De PCR-efficiëntie werd berekend op basis van de richtingscoëfficiënt van de standaardcurve, die bekomen werd d.m.v. een Q-PCR op een vijfvoudige verdunningsreeks van de cDNA *template*, met de volgende formule: efficiëntie = $(10^{-1/\text{rico}}) - 1$. De meeste primerparen vertoonden een goede efficiëntie (Tabel 3.5) en een goede smeltcurve.

Tabel 3.5: De PCR-efficiënties van de mogelijke huishoudgenen. De huishoudgenen die niet gebruikt werden in volgende experimenten worden in het grijs weergegeven.

Afkorting gen	Functionele groep	Primers (Fw/Rv)	PCR-efficiëntie (%)
<i>gyrA</i>	Replicatie	DDK_001/DDK_002 en DDK_063/DDK_064	157,9 en 80,8
<i>rpoD</i>	Transcriptie	DDK_003/DDK_004 en DDK_065/DDK_066	74,2 en 103,9
<i>eftu</i>	Translatie	DDK_009/DDK_010	101,2
<i>purH</i>	Nucleïnezuursynthese	DDK_007/DDK_008	105,6
<i>cmk</i>	Nucleïnezuursynthese	DDK_015/DDK_016	92,6
<i>mbl</i>	Morfogenese	DDK_019/DDK_020 en DDK_069/DDK_070	94,9 en 93,7
<i>adk</i>	Energie homeostase	DDK_011/DDK_012	97,8
<i>gapdh</i>	Energie metabolisme	DDK_005/DDK_006 en DDK_067/DDK_068	167,3 en 90,1
<i>sucB</i>	Energie metabolisme	DDK_013/DDK_014	97,9
<i>fum</i>	Energie metabolisme	DDK_017/DDK_017	92,2
<i>mdh</i>	Energie metabolisme	DDK_021/DDK_022	104,8

De smeltcurve van *fum* (Figuur 3.9 A) is een voorbeeld van een perfecte smeltcurve, want ze vertoont uitsluitend pieken bij één smelttemperatuur. Hierdoor wordt aangetoond dat uitsluitend één specifiek PCR-product gevormd is. Aangezien de PCR-efficiënties van de eerste primerparen voor *gyrA*, *rpoD* en *gapdh* niet in orde waren, werden nieuwe primerparen ontwikkeld. De nieuwe primerparen leidden wel tot de gewenste efficiëntie. Het eerste primerpaar voor *mbl* vertoonde een goede efficiëntie, maar de pieken met lagere smelttemperaturen tonen aan dat er primerdimeren gevormd werden (Figuur 3.9 C). Het tweede primerpaar leidde tot de vorming van specifieke PCR-producten (Figuur 3.9 D), dit huishoudgen werd daarom niet gebruikt in de volgende experimenten. De smeltcurve van *mdh* toonde eveneens de vorming van primerdimeren en specifieke PCR-producten (Figuur 3.9 B). Doordat dit pas opgemerkt werd nadat al de efficiënties reeds bepaald waren, werd dit huishoudgen niet gebruikt in de volgende experimenten.



Figuur 3.9: Smeltcurven van *fum*, *mdh*, *mbl* primerpaar 1 en *mbl* primerpaar 2 (A, B, C en D respectievelijk). De smeltcurve van *fum* vertoont uitsluitend pieken bij één smelttemperatuur, terwijl de overige drie smeltcurven pieken vertonen bij meerdere temperaturen.

2) Stabiliteit

Om te kunnen corrigeren voor variaties tussen stalen zijn huishoudgenen nodig, die nagenoeg evenveel tot expressie komen onder de verschillende geteste condities (*gespiket* met PTU en hemolymfe). De stabiliteiten van de negen huishoudgenen waarvoor goede primerparen ter beschikking waren (Tabel 3.5), werden bepaald m.b.v. NormFinder, geNorm en BestKeeper (Andersen *et al.*, 2004; Pfaffl *et al.*, 2004; Vandesompele *et al.*, 2002). Hiervoor werden elf onafhankelijke *P. larvae* culturen gegroeid, die in twee gesplitst werden bij een OD_{590} van $\approx 0,2$. Vervolgens werd steeds één cultuur *gespiket* met 1:25 hemolymfe en één cultuur met PTU (concentratie \approx concentratie PTU in de cultuur *gespiket* met hemolymfe). Op de tijdstippen 1 u, 3 u en 9 u na *spiken* werd de OD_{590} van al de culturen bepaald (Tabel 3.6) en werd van elke cultuur 3 ml geïncubeerd en behandeld met *RNAlater*TM. De C_T -waarden van de negen huishoudgenen op de drie tijdstippen werden d.m.v. Q-PCR bepaald, zowel in de elf culturen *gespiket* met hemolymfe als in de elf culturen *gespiket* met PTU. De bekomen C_T -waarden werden ingelezen in BestKeeper. Voor geNorm en NormFinder werden de C_T -waarden eerst omgezet naar ruwe data.

Ondanks meerdere pogingen bleek het moeilijk om reproduceerbare groeicurven te verkrijgen na *spiken* met hemolymfe. Replicaten 1-4 groeiden tot hogere OD_{590} na 3 u en 9 u *gespiket* met PTU en hemolymfe dan de overige replicaten. Bovendien vertoonden replicaten 6-10 een daling in OD_{590} na 3 u *gespiket* met PTU, terwijl de culturen *gespiket* met hemolymfe wel een stijgende OD_{590} vertoonden. Doordat dit voorval bij tien replicaten waargenomen werd (data enkel van 5 replicaten weergegeven) en omdat de OD_{590} na 9 u *gespiket* met hemolymfe hoger is dan de OD_{590} na 9 u *gespiket* met PTU, werden de replicaten toch meegenomen in het

experiment om de meest stabiele huishoudgenen te bepalen. Huishoudgenen die een stabiel expressiepatroon vertonen in al de replicaten zijn goede kandidaten om te corrigeren voor variaties die onafhankelijk zijn van de hemolymfe.

Tabel 3.6: De OD₅₉₀ van de elf onafhankelijke culturen op de verschillende tijdstippen na *spiken* met PTU en hemolymfe (1:25). De hemolymfe werd geïncubeerd volgens methode 3 (§ 5.2.1).

	OD ₅₉₀ na 1 u		OD ₅₉₀ na 3 u		OD ₅₉₀ na 9 u	
	PTU	Hemolymfe	PTU	Hemolymfe	PTU	Hemolymfe
Replicaat 1	0,226	0,305	0,261	0,387	0,559	0,633
Replicaat 2	0,296	0,3	0,374	0,433	0,729	0,756
Replicaat 3	0,25	0,292	0,308	0,408	0,583	0,711
Replicaat 4	0,219	0,244	0,315	0,4	0,583	0,814
Replicaat 5	0,223	0,303	0,235	0,378	0,365	0,409
Replicaat 6	0,193	0,265	0,174	0,396	0,211	0,401
Replicaat 7	0,194	0,251	0,18	0,341	0,219	0,328
Replicaat 8	0,19	0,269	0,171	0,368	0,219	0,372
Replicaat 9	0,184	0,292	0,155	0,389	0,208	0,39
Replicaat 10	0,203	0,257	0,186	0,368	0,277	0,395
Replicaat 11	0,198	0,287	0,199	0,373	0,276	0,409

- **geNorm**

GeNorm raadt aan om minimaal drie stabiele huishoudgenen te gebruiken om de normalisatiefactor te berekenen (Vandesompele *et al.*, 2002). Op basis van Figuur 3.10 B, D, F en H kan het optimaal aantal huishoudgenen bepaald worden (Tabel 3.7). Een paarsgewijze variatie groter dan 0,15 betekent dat een extra huishoudgen een significant effect heeft en bijgevolg best ingesloten wordt om een betrouwbare normalisatiefactor te bekomen (Vandesompele *et al.*, 2002).

Wanneer alle data van de verschillende tijdstippen samen opgenomen worden in de analyse blijkt dat V6/7 gelijk is aan 0,15 (Figuur 3.10 B) en dit betekent dat een 7^{de} huishoudgen geen significante meerwaarde betekent voor de normalisatiefactor, waardoor zes huishoudgen voldoende zijn om een betrouwbare normalisatiefactor te bekomen over de tijd heen (d.w.z. dat de genexpressieniveaus van dezelfde zes huishoudgenen bepaald zullen worden 1 u, 3 u en 9 u na *spiken* met hemolymfe en PTU om een normalisatiefactor te berekenen voor de drie tijdstippen).

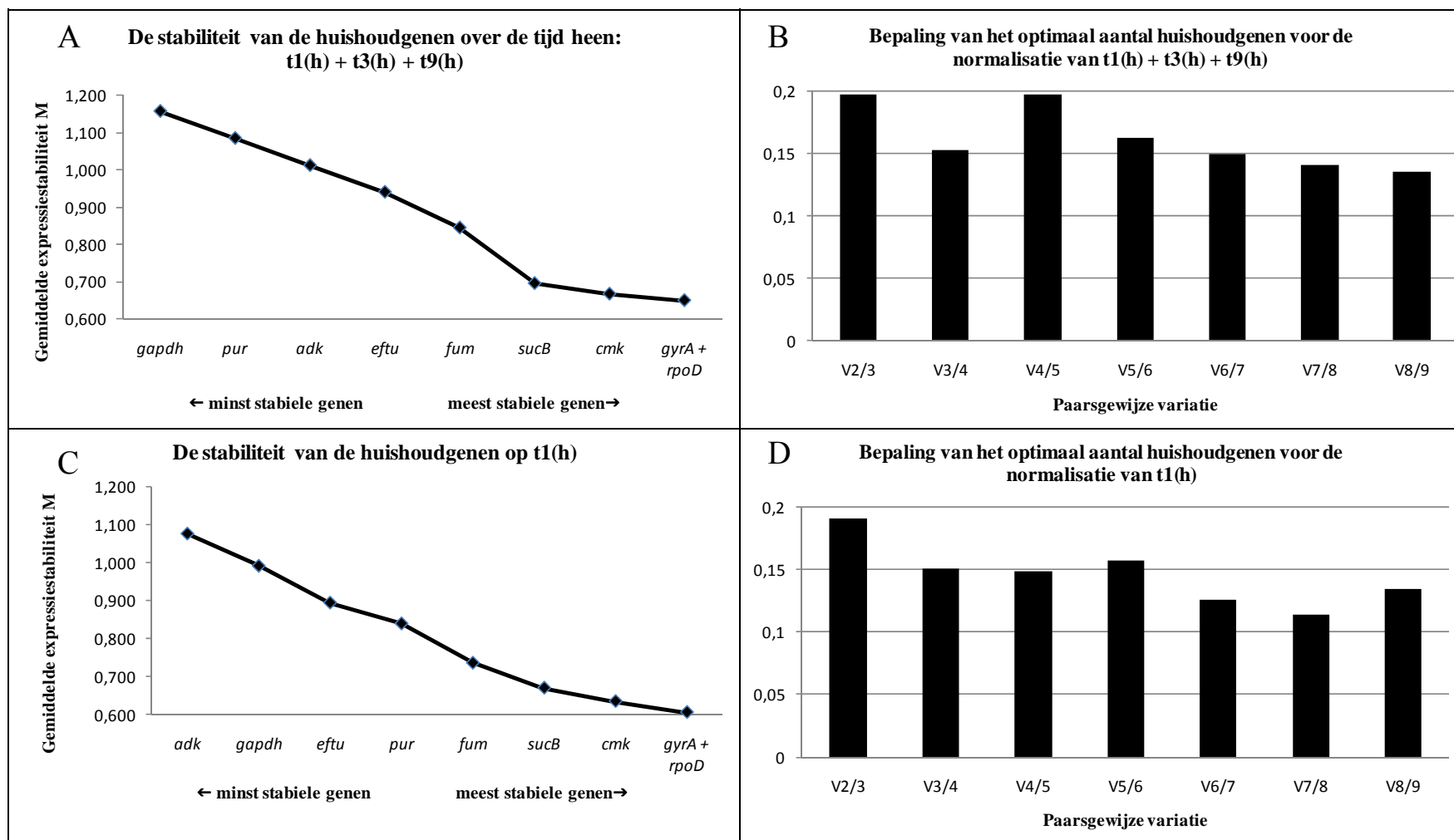
Indien echter de data verkregen op een bepaald tijdstip afzonderlijk opgenomen worden in de analyse dan is V3/4 enkel groter dan 0,15 op tijdstip 9 u na *spiken*, waardoor op de tijdstippen 1 u en 3 u na *spiken* drie genen gebruikt moeten worden om een betrouwbare normalisatiefactor te bekomen en op het tijdstip 9 u na *spiken* vier (Figuur 3.10 D, F, en H en Tabel 3.7). Voor elk tijdstip wordt de normalisatiefactor dus berekend op basis van de meest stabiele huishoudgenen voor dat bepaald tijdstip.

De stabielste huishoudgenen op de tijdstippen 1 u en 3 u na *spiken* komen overeen met de drie stabielste huishoudgenen over de tijd heen, maar de stabielste huishoudgenen op tijdstip 9 u na *spiken* zijn verschillend. Een normalisatie per tijdstip zal bijgevolg leiden tot een

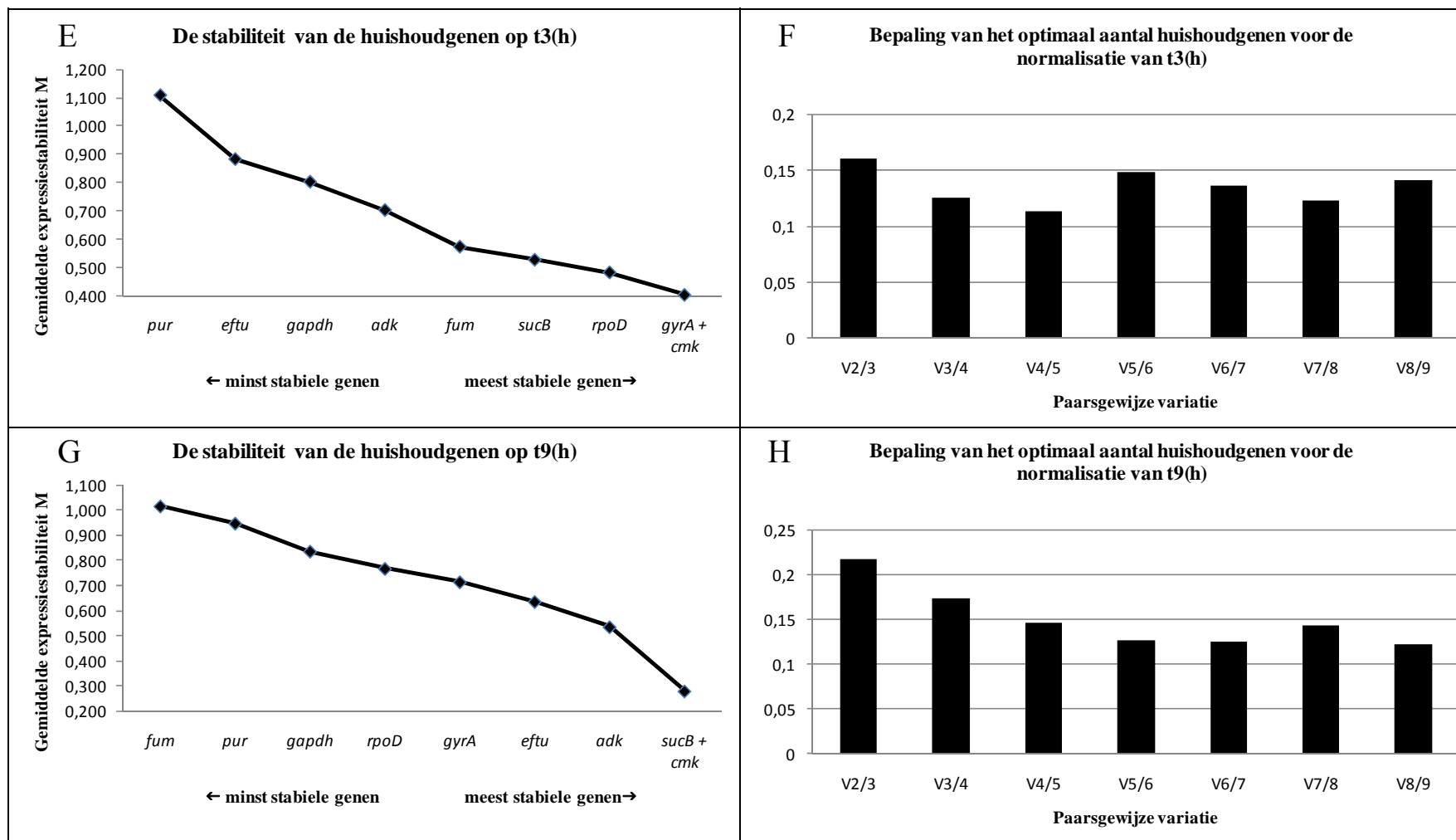
betrouwbaarder resultaat en bovendien moeten in totaal minder huishoudgenen gekwantificeerd worden. Om een normalisatiefactor per tijdstip te berekenen moeten namelijk 20 kwantificaties uitgevoerd worden (1 u en 3 u na *spiken* met hemolymfe en PTU moeten drie huishoudgenen gekwantificeerd worden en 9 u na *spiken* met hemolymfe en PTU vier: 4 condities x 3 huishoudgenen + 2 condities x 4 huishoudgenen = 20 in totaal). Indien geopteerd zou worden om de verschillende tijdstippen te normaliseren d.m.v. dezelfde huishoudgenen, dan zouden 36 kwantificaties uitgevoerd moeten worden (zes condities x zes huishoudgenen).

Tabel 3.7: Het optimaal aantal huishoudgenen en de stabielste huishoudgenen over de tijd heen en per tijdstip. De resultaten zijn gebaseerd op Figuur 3.10.

Tijdstippen	Optimaal aantal huishoudgenen	Stabielste huishoudgenen
t1(h) + t3(h) + t9(h)	6	<i>gyrA, rpoD, cmk, sucB, fum, eftu</i>
t1(h)	3	<i>gyrA, rpoD, cmk</i>
t3(h)	3	<i>gyrA, cmk, rpoD</i>
t9(h)	4	<i>sucB, cmk, adk, eftu</i>



Figuur 3.10 deel 1: De resultaten bekomen met geNorm. A) De stabiliteit van de huishoudgenen over de tijd heen, d.w.z. 1 u, 3 u en 9 u na *spiken* met PTU en hemolymfe. B) De paarsgewijze variatie van de huishoudgenen over de tijd heen. C) De stabiliteit van de huishoudgenen 1 u na *spiken* met PTU en hemolymfe. D) De paarsgewijze variatie van de huishoudgenen 1 u na *spiken* met PTU en hemolymfe. t = tijdstip, h = hemolymfe



Figuur 3.10 deel 2: E) De stabiliteit van de huishoudgenen 3 u na *spiken* met PTU en hemolymfe. F) De paarsgewijze variatie van de huishoudgenen 3 u na *spiken* met PTU en hemolymfe. G) De stabiliteit van de huishoudgenen 9 u na *spiken* met PTU en hemolymfe. H) De paarsgewijze variatie van de huishoudgenen 9 u na *spiken* met PTU en hemolymfe. t = tijdstip, h = hemolymfe

- **NormFinder**

NormFinder bepaalt enkel de volgorde van de stabiliteiten van de huishoudgenen (Tabel 3.8), maar geeft geen informatie over het optimaal aantal huishoudgenen. Net zoals bij geNorm blijkt ook uit de resultaten bekomen bij NormFinder dat de stabielste huishoudgenen voor 9 u na *spiken* afwijken van de stabielste huishoudgenen over de tijd heen en voor 1 u en 3 u na *spiken*. Bovendien komen de resultaten van geNorm en NormFinder volledig overeen voor 3 u en 9 u na *spiken* (*cmk*, *rpoD*, *gyrA* en *adk*, *sucB*, *eftu*, *cmk* respectievelijk). Voor 1 u na *spiken* komen twee van de drie huishoudgenen overeen (*cmk* en *gyrA*).

Tabel 3.8: De resultaten bekomen met NormFinder. De genen zijn geordend van meest stabiel (laagste stabiliteitswaarde) naar minst stabiel (hoogste stabiliteitswaarde). t = tijdstip, h = hemolyse

t1(h) + t3(h) + t9(h)		t1(h)	
Afkorting gen	Stabiliteitswaarde	Afkorting gen	Stabiliteitswaarde
<i>cmk</i>	0,286	<i>cmk</i>	0,135
<i>gyrA</i>	0,398	<i>gyrA</i>	0,373
<i>eftu</i>	0,467	<i>eftu</i>	0,438
<i>rpoD</i>	0,484	<i>fum</i>	0,461
<i>sucB</i>	0,554	<i>rpoD</i>	0,477
<i>fum</i>	0,578	<i>sucB</i>	0,563
<i>adk</i>	0,684	<i>purH</i>	0,594
<i>purH</i>	0,764	<i>gapdh</i>	0,754
<i>gapdh</i>	0,819	<i>adk</i>	0,825
t3(h)		t9(h)	
Afkorting gen	Stabiliteitswaarde	Afkorting gen	Stabiliteitswaarde
<i>cmk</i>	0,142	<i>adk</i>	0,326
<i>rpoD</i>	0,320	<i>sucB</i>	0,342
<i>gyrA</i>	0,331	<i>eftu</i>	0,383
<i>fum</i>	0,354	<i>cmk</i>	0,443
<i>sucB</i>	0,399	<i>gyrA</i>	0,466
<i>eftu</i>	0,565	<i>gapdh</i>	0,514
<i>adk</i>	0,592	<i>rpoD</i>	0,557
<i>gapdh</i>	0,672	<i>purH</i>	0,702
<i>purH</i>	0,868	<i>fum</i>	0,789

- **BestKeeper**

BestKeeper bepaalt net als NormFinder enkel een rangschikking van de huishoudgenen volgens hun stabiliteiten (Tabel 3.9). Ook bij dit programma wijken de stabielste huishoudgenen van één tijdstip af van de stabielste huishoudgenen over de tijd heen en de overige twee tijdstippen (die bovendien identiek zijn nl. *sucB*, *rpoD* en *gyrA*). In tegenstelling tot wat waargenomen werd bij geNorm en NormFinder zijn het nu echter de huishoudgenen van 3 u na *spiken* die afwijken.

Tabel 3.9: De resultaten bekomen met BestKeeper. De genen zijn geordend van meest stabiel (laagste standaarddeviatie) naar minst stabiel (hoogste standaarddeviatie). t = tijdstip, h = hemolyse, S.D. = standaarddeviatie, C_T = *cycle threshold*

t1(h) + t3(h) + t9(h)		t1(h)	
Afkorting gen	S.D. ($\pm C_T$)	Afkorting gen	S.D. ($\pm C_T$)
<i>sucB</i>	0,80	<i>sucB</i>	0,68
<i>rpoD</i>	0,82	<i>rpoD</i>	0,71
<i>gyrA</i>	0,83	<i>gyrA</i>	0,83
<i>cmk</i>	0,96	<i>purH</i>	0,83
<i>fum</i>	0,97	<i>cmk</i>	0,96
<i>purH</i>	1,07	<i>fum</i>	1,05
<i>eftu</i>	1,09	<i>eftu</i>	1,17
<i>adk</i>	1,40	<i>gapdh</i>	1,45
<i>gapdh</i>	1,66	<i>adk</i>	1,62

t3(h)		t9(h)	
Afkorting gen	S.D. ($\pm C_T$)	Afkorting gen	S.D. ($\pm C_T$)
<i>fum</i>	0,49	<i>gyrA</i>	0,61
<i>cmk</i>	0,67	<i>rpoD</i>	0,82
<i>sucB</i>	0,76	<i>sucB</i>	0,86
<i>rpoD</i>	0,77	<i>eftu</i>	0,90
<i>gyrA</i>	0,77	<i>adk</i>	0,94
<i>gapdh</i>	0,83	<i>cmk</i>	0,96
<i>eftu</i>	0,99	<i>gapdh</i>	1,16
<i>purH</i>	1,10	<i>purH</i>	1,26
<i>adk</i>	1,19	<i>fum</i>	1,42

- **Conclusie**

De resultaten verkregen door de drie programma's zijn vergelijkbaar. De stabielste huishoudgenen zijn niet dezelfde over de drie geteste tijdstippen, waardoor het aangewezen is om per tijdstip een verschillende set huishoudgenen te gebruiken i.p.v. een grotere vaste set over alle tijdstippen heen. Bovendien moeten op deze werkwijze minder kwantificaties uitgevoerd worden (20 en 36 kwantificaties respectievelijk). Hierdoor werd besloten om per tijdstip de stabielste huishoudgenen te gebruiken om de data te normaliseren. Het optimaal aantal huishoudgenen per tijdstip werd bepaald door geNorm en de huishoudgenen die gebruikt werden voor elk tijdstip zijn eveneens degene die bekomen werden door de analyse gebruikmakend van het *software* pakket geNorm (Tabel 3.7). De resultaten bekomen met de analyse van geNorm zijn namelijk nagenoeg identiek met deze van NormFinder (slechts één gen verschillend). Alhoewel met BestKeeper afwijkende resultaten bekomen werden, vertonen de huishoudgenen verkregen met geNorm ook hier meestal een goede stabiliteit. De drie programma's tonen eveneens aan dat de minst stabiele huishoudgenen *gapdh*, *adk*, *purH* en *fum* zijn. Uitgezonderd *purH* zijn deze genen allemaal van belang bij het energiemetabolisme. Aangezien de hemolymfe o.a. suikers bevat is dit geen onverwacht resultaat.

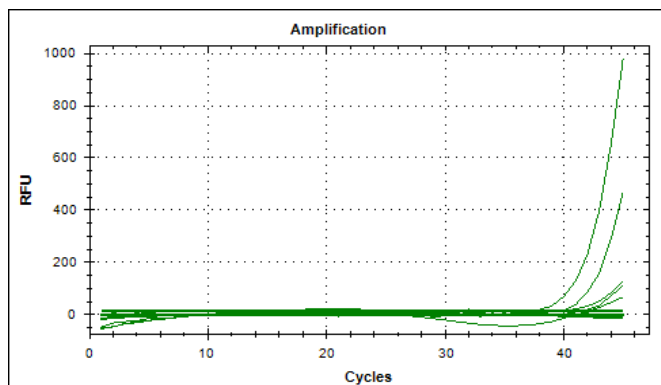
3.2.7 Virulentiegenen

De PCR-efficiënties van de primerparen ontwikkeld voor de twintig gekozen potentiële virulentiegenen werden op dezelfde manier bepaald als bij de huishoudgenen (§ 3.2.6). Al de antibioticaresistentie eiwitten en de flageleiwitten, uitgezonderd *fliA*, vertoonden een goede efficiëntie en smeltcurve. In Tabel 3.10 worden alle geteste virulentiegenen met hun respectievelijke efficiënties weergegeven.

Tabel 3.10: De PCR-efficiënties van de potentiële virulentiegenen. De potentiële virulentiegenen die niet gebruikt werden in het volgende experiment worden in het grijs weergegeven.

Functionele groep	Naam	Primers (Fw/Rv)	PCR-efficiëntie (%)
Toxine	<i>etx_mtx2</i>	DDK_023/DDK_024	440,3
	<i>vip2</i>	DDK_025/DDK_026	568,2
	<i>binair toxine B/PA1</i>	DDK_027/DDK_028	99
	<i>binair toxine B/PA2</i>	DDK_029/DDK_030 en DDK_071/DDK_072	256 en 125
Hemolysine	<i>tylC</i>	DDK_031/DDK_032	84
	<i>hlyIII</i>	DDK_033/DDK_034	141
	<i>duf37</i>	DDK_035/DDK_036 en DDK_073/DDK_074	248 en 79,2
	<i>tly</i>	DDK_037/DDK_038	98,5
Protease	<i>clpC</i>	DDK_039/DDK_040	94
	<i>zink afhankelijk carboxypeptidase</i>	DDK_041/DDK_042 en DDK_075/DDK_076	133,3 en 95,9
	<i>ATP-afhankelijk Lon protease</i>	DDK_043/DDK_044 en DDK_077/DDK_078	88,2 en 73,6
	<i>oligoendopeptidase F</i>	DDK_045/DDK_046	niet te bepalen
	<i>germinatie protease</i>	DDK_047/DDK_048	97,8
Antibioticaresistentie eiwitten	<i>multidrug ABC transporter</i>	DDK_049/DDK_050	97,5
	<i>multidrug efflux eiwit</i>	DDK_051/DDK_052	89,9
	<i>mdlB</i>	DDK_053/DDK_054	98,2
Flageleiwitten	<i>flhA</i>	DDK_055/DDK_056	101,1
	<i>cheA</i>	DDK_057/DDK_058	98,5
	<i>cheY/cheZ</i>	DDK_059/DDK_060	88,3
	<i>fliA</i>	DDK_061/DDK_062	29,3

De amplificatiecurve bekomen voor *fliA* toont aan dat het gen nauwelijks aanwezig was in de gebruikte cDNA *pool* (zeer hoge C_T -waarde), of dat het gebruikte primerpaar een zeer slechte efficiëntie heeft (Figuur 3.11). Aangezien reeds voldoende primerparen voor flageleiwitten een goede efficiëntie vertoonden, werd dit gen niet meegenomen in het volgende experiment.



Figuur 3.11: De amplificatiecurve van *fliA* met als cDNA template een *pool* van cDNA afkomstig van culturen 1 u, 3 u en 9 u *gespiket* met hemolymfe en met PTU.

De toxines, de hemolysines (HlyIII en Duf37) en de proteasen (ATP-afhankelijk Lon protease, oligoendopeptidase F en germinatie protease) vertoonden zeer hoge C_T -waarden (Tabel 3.11). Voor het oligoendopeptidase F kon slechts één C_T -waarde bepaald worden, waardoor geen standaardcurve en dus ook geen PCR-efficiëntie bekomen kon worden. Een mogelijke verklaring voor de hoge C_T -waarden is dat de genen niet geëxprimeerd werden in één van de twee groepen (*gespiket* met hemolymfe of PTU), waardoor het cDNA van de virulentiegenen verdund werd in de *pool*. De PCR-efficiënties van de primerparen van het binair toxine B/PA1, het zink afhankelijk carboxypeptidase, het ATP-afhankelijk Lon protease en Duf37 werden daarom opnieuw bepaald op een cDNA *pool* die uitsluitend cDNA van de culturen *gespiket* met hemolymfe bevatte. De C_T -waarden van de proteasen veranderden nauwelijks, die van het toxine en het hemolysine verbeterden wel, maar de PCR-efficiënties vielen buiten de bruikbare range. Een andere mogelijkheid is dat de primers verantwoordelijk zijn voor de hoge C_T -waarden. Daarom werden er nieuwe primers ontwikkeld en de PCR-efficiënties werden opnieuw bepaald op de oorspronkelijke cDNA *pool*. De C_T -waarden van de vier genen werden kleiner, maar alleen de PCR-efficiëntie van het primerpaar van het zink afhankelijk carboxypeptidase voldeed. In het verdere experiment zal gewerkt worden met de genen waarvoor primerparen konden ontwikkeld worden met goede efficiënties.

Tabel 3.11: De C_T-waarden van de potentiële virulentiegenen waarvan het eerste primerpaar niet tot een PCR-efficiëntie van 80-120% leidde. De eerste cDNA pool is samengesteld uit cDNA afkomstig van de volgende culturen: 1 u, 3 u, 9 u *gespiket* met hemolymfe en 1 u, 3 u, 9 u *gespiket* met PTU. De tweede cDNA pool bevat cDNA afkomstig van de culturen 1 u, 3 u en 9 u *gespiket* met hemolymfe.

Functionele groep	Naam	Laagste C _T -waarde op eerste cDNA pool	Laagste C _T -waarde op tweede cDNA pool	Laagste C _T -waarde van nieuw primerpaar
Toxine	<i>etx_mtx2</i>	38,84		
	<i>vip2</i>	36,98		
	<i>binair toxine</i> B/PA1	37,36		
	<i>binair toxine</i> B/PA2	33,05	24,4	21,13
Hemolysine	<i>hlyIII</i>	35,01		
	<i>duf37</i>	36,45	25,6	23,19
Protease	<i>zink afhankelijk carboxypeptidase</i>	33,05	32,13	17,75
	<i>ATP-afhankelijk Lon protease</i>	24,6	31,27	21,8
	<i>oligoendopeptidase</i> F	42,8		
	<i>germinatie protease</i>	37,74		

3.3 Expressieniveaus van potentiële virulentiegenen

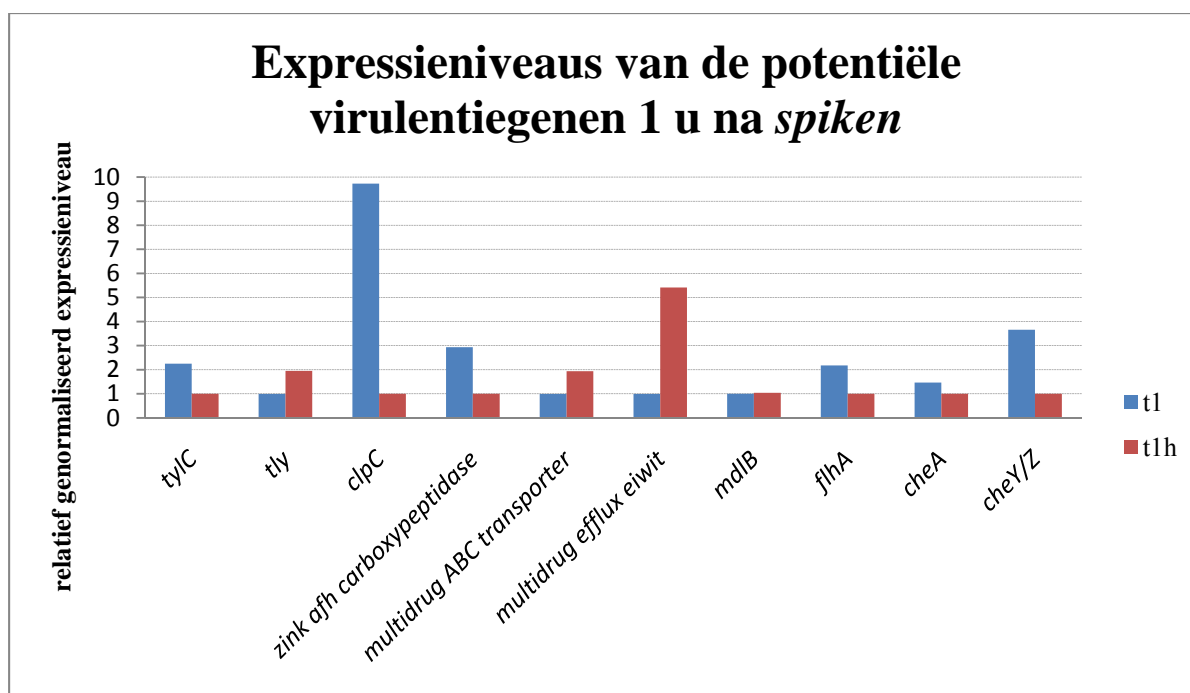
De genexpressieniveaus van de tien potentiële virulentiegenen waarvoor goede primerparen ter beschikking waren (Tabel 3.10), werden bepaald na 1 u, 3 u en 9 u *gespiket* met hemolymfe en PTU. Het design van het experiment was grotendeels dezelfde als om de stabiliteit van de huishoudgenen te bepalen (§ 3.2.6 puntje 2). De enige verschillen waren dat 1) slechts één grote cultuur gekweekt werd in plaats van elf kleine culturen (120 ml t.o.v. 25 ml) en 2) dat voor elk gen een standaardcurve opgesteld werd d.m.v. een vijfvoudige verdunningsreeks van een cDNA *pool* (cDNA van culturen na 1 u, 3 u en 9 u *gespiket* met hemolymfe en PTU).

Net als bij de culturen die gebruikt werden om de stabiliteit van de huishoudgenen te bepalen, werd de OD₅₉₀ van de cultuur gemeten op de drie tijdstippen. De OD₅₉₀ ligt hoger dan bij de kleine culturen (Tabel 3.12 en Tabel 3.6), wat ook waargenomen werd bij het opstellen van de groeicurven (Figuren 3.2 en 3.3). Bovendien is het verschil in OD₅₉₀ tussen de culturen *gespiket* met PTU en hemolymfe groter dan bij de kleine culturen op de tijdstippen 3 u en 9 u na *spiken* (na 3 u: 0,234 vs. 0,351 en na 9 u 0,231 vs. 0,538). De hogere OD₅₉₀ toont aan dat *P. larvae* een sterkere exponentiële groei gekend heeft (zoals verwacht volgens Figuur 3.3) en de mogelijkheid heeft gehad om zich aan te passen aan de nieuwe omgeving. Gezien de aanwezigheid van o.a. suikers in de hemolymfe, werd de betere groei verwacht.

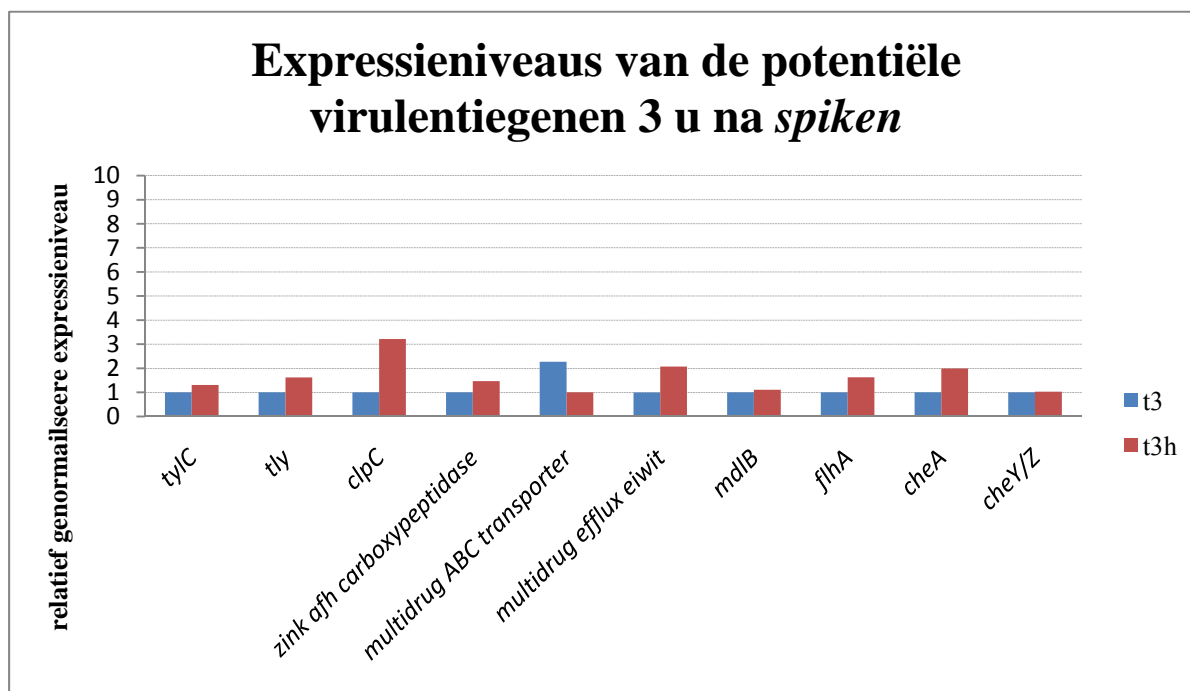
Tabel 3.12: De OD₅₉₀ van de *P. larvae* cultuur op de verschillende tijdstippen na *spiken* met PTU en hemolymfe (1:25). De hemolymfe werd geïncubeerd volgens methode 2 (§ 5.2.1).

OD ₅₉₀ na 1 u		OD ₅₉₀ na 3 u		OD ₅₉₀ na 9 u	
PTU	Hemolymfe	PTU	Hemolymfe	PTU	Hemolymfe
0,289	0,351	0,351	0,702	0,644	1,182

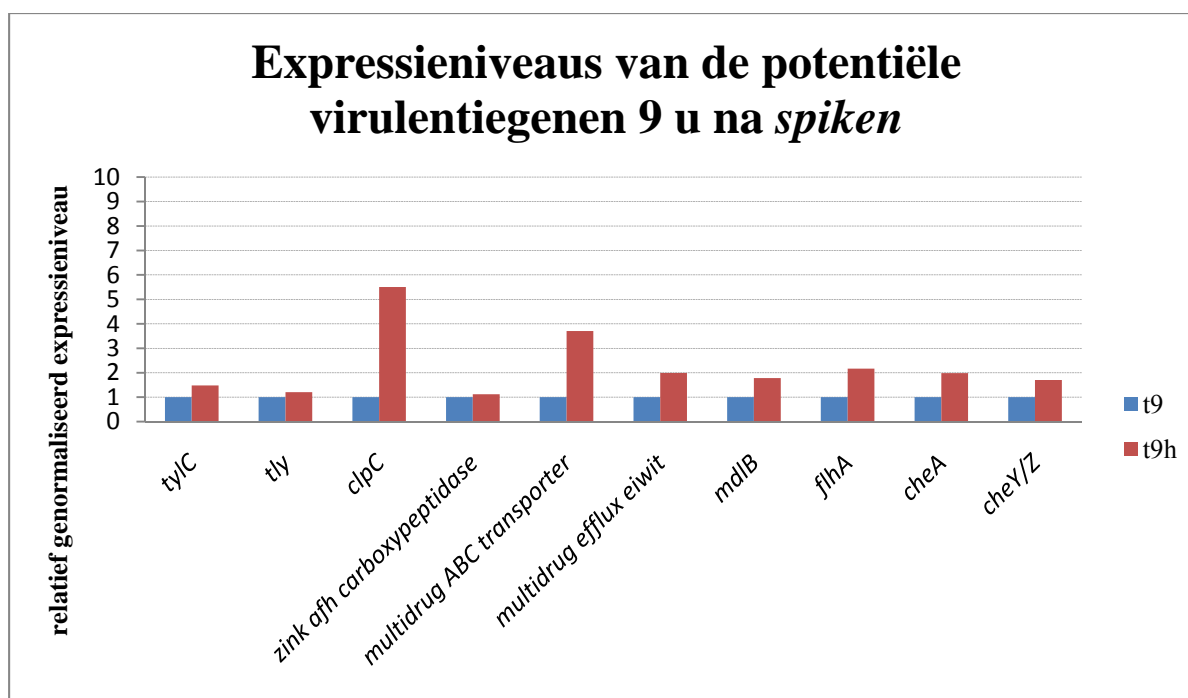
De C_T-waarden van de tien genen werden in beide condities bepaald op de drie tijdstippen. De smeltcurven van de tien genen vertoonden slechts één piek, waardoor de gen specifieke amplificatie bevestigd werd. De PCR-efficiënties van de standaardcurven lagen tussen 98,2% en 107,1%. De bekomen C_T-waarden werden omgezet naar genormaliseerde relatieve expressieniveaus met de volgende formule: $(1,95^{AC_T})$ /de normalisatiefactor voor het welbepaald tijdstip (Figuren 3.12-3.14). Hierbij werden de expressieniveaus van de potentiële virulentiegenen in de culturen *gespiket* met hemolymfe relatief bepaald t.o.v. de culturen *gespiket* met PTU. Aangezien de expressieniveaus slechts in één cultuur bepaald werden, konden geen significantieniveaus berekend worden. Louter doordat cellen biologische systemen zijn, kan variatie waargenomen worden. Hierdoor moet er minstens een verdubbeling of halvering van de genexpressie waargenomen worden in de cultuur *gespiket* met *hemolymfe* t.o.v. met PTU vooraleer er in dit experiment gesproken kan worden over een differentiële genexpressie (Drevinek *et al.*, 2008; Liu & Ream, 2008). De namen die toegekend zijn aan de tien potentiële virulentiegenen van *P. larvae* zijn gebaseerd op de namen van de genen van *B. subtilis* waarmee ze homoloog zijn (ze vertonen allemaal een E-waarde die veel kleiner is dan 0,01 [4]). Op basis van de geconserveerde domein databank (CDD) werd een mogelijke functie voorspeld voor de eiwitten die gecodeerd worden door genen die homoloog zijn met de genen van *B. subtilis*.



Figuur 3.12: Expressieniveaus van de potentiële virulentiegenen 1 u na *spiken*. De cultuur *gespiket* met PTU (t1) werd gebruikt als referentie om de potentiële virulentiegenen in de cultuur *gespiket* met hemolymfe (t1h) relatief te kwantificeren. *tylC* en *tly* coderen voor hemolysines; *clpC* en *zink afh carboxypeptidase* voor proteasen; *multidrug ABC transporter* en *mdlB* voor antibioticaresistentie eiwitten en *flhA*, *cheA* en *cheY/Z* voor flageleiwitten. De hemolymfe werd geïsoleerd volgens methode 2. t = tijdstip, h = hemolymfe, afh = afhankelijk



Figuur 3.13: Expressieniveaus van de potentiële virulentiegenen 3 u na *spiken*. De cultuur *gespiket* met PTU (t3) werd gebruikt als referentie om de potentiële virulentiegenen in de cultuur *gespiket* met hemolymfe (t3h) relatief te kwantificeren. *tylC* en *tly* coderen voor hemolysines; *clpC* en *zink afh carboxypeptidase* voor proteasen; *multidrug ABC transporter* en *mdlB* voor antibioticaresistentie eiwitten en *flhA*, *cheA* en *cheY/Z* voor flageleiwitten. De hemolymfe werd geïsoleerd volgens methode 2. t = tijdstip, h = hemolymfe, afh = afhankelijk



Figuur 3.14: Expressieniveaus van de potentiële virulentiegenen 9 u na *spiken*. De cultuur *gespiket* met PTU (t9) werd gebruikt als referentie om de potentiële virulentiegenen in de cultuur *gespiket* met hemolymfe (t9h) relatief te kwantificeren. *tylC* en *tly* coderen voor hemolysines; *clpC* en *zink afh carboxypeptidase* voor proteasen; *multidrug ABC transporter* en *mdlB* voor antibioticaresistentie eiwitten en *flhA*, *cheA* en *cheY/Z* voor flageleiwitten. De hemolymfe werd geïsoleerd volgens methode 2. t = tijdstip, h = hemolymfe, afh = afhankelijk

tylC vertoonde een neerregulatie na 1 u. Op de overige tijdstippen vertoonde geen van beide genen die mogelijk coderen voor hemolysines een sterk afwijkend genexpressieniveau. De afwezigheid van hemocyten zou hiervoor een mogelijke verklaring kunnen zijn.

clpC codeert mogelijk voor een klasse III stressrespons gerelateerd ATPase, dat een rol zou kunnen spelen bij de productie van virulentiefactoren (Chan *et al.*, submitted). Het is opmerkelijk dat het gen na 1 u een sterke neerregulatie vertoonde ($\approx 1/10$), terwijl na 3 u en 9 u een sterke opregulatie ($\times 3,2$ en $\times 5,5$ respectievelijk) waargenomen werd. Dit gen komt dus duidelijk differentiële tot expressie onder invloed van de hemolymfe. Net zoals *clpC* vertoonde ook het *zink afhankelijk carboxypeptidase* (eveneens een protease) een neerregulatie na 1 u, maar na 3 u en 9 u werd geen differentiële expressie waargenomen.

De *multidrug ABC transporter* en het *multidrug efflux eiwit* zijn twee genen die mogelijk coderen voor antibioticaresistentie eiwitten, die een differentiële expressie vertoonden in de aanwezigheid van hemolymfe. De *multidrug ABC transporter* vertoonde een neerregulatie na 3 u, maar werd sterk opgereguleerd na 9 u ($\times 3,7$). Het gen codeert voor een eiwit dat mogelijk betrokken is bij een signalisatiepathway die belangrijk is voor het begin van de sporulatie (Chan *et al.*, submitted). Het *multidrug efflux eiwit* werd zowel opgereguleerd na 1 u, na 3 u en na 9 u ($\times 5,4$, $\times 2,1$ en $\times 2$ respectievelijk).

flhA, *cheA* en *cheY/Z* coderen mogelijk voor flageleiwitten. Het *flhA* gen codeert voor een eiwit dat mogelijk betrokken is bij de biosynthese van de flagel. Terwijl het *cheA* gen en het *cheY/Z* gen coderen voor eiwitten met een mogelijke rol bij chemotaxis. *flhA* en *cheY/Z*

werden neergereguleerd na 1 u. Na 3 u werd *cheA* opgereguleerd (x 2) en na 9 u werden *cheA* en *flhA* opgereguleerd (x 2 en x 2,2 respectievelijk).

Ondanks dat slechts een klein aantal potentiële virulentiegenen getest werden in deze studie (slechts 10 van de > 200), werd toch een duidelijke differentiële expressie vastgesteld bij een aantal genen (na 1 u werden vijf genen neergereguleerd en één gen opgereguleerd; na 3 u werd één gen neergereguleerd en drie genen opgereguleerd; na 9 u werden geen genen neergereguleerd en vijf genen opgereguleerd). Hieruit blijkt dat de hemolymfe niet uitsluitend leidt tot een betere groei van *P. larvae*, maar dat het ook invloed heeft op de expressie van een aantal potentiële virulentiegenen.

Deel 4: Discussie

Honingbijen zijn van levensbelang voor de menselijke voedselvoorziening, doordat ze verreweg de belangrijkste bestuivers van cultuurgewassen zijn. Het succes van de honingbijen is te danken aan hun grote aantallen, een strikte taakverdeling en een goede communicatie. De keerzijde van met velen samen te leven op een kleine plaats is echter het groot risico om geïnfecteerd te worden door pathogenen (Evans & Pettis, 2005). Kennis over de manier waarop de pathogenen de gezondheid van de bij aantasten is essentieel om de ziekten te kunnen behandelen en/of voorkomen. Deze thesis kadert binnen een doctoraat dat o.a. de virulentiegenen van *P. larvae* wil identificeren, een eerste belangrijke stap in de zoektocht naar goede controle- en behandelingsmethoden van Amerikaans vuilbroed.

Sinds kort is de genomsequentie van *P. larvae* gekend en meer dan 200 potentiële virulentiefactoren werden bekomen door de sequentie te vergelijken met het genoom van de niet-pathogene, gerelateerde *P. JDR2* (Chan *et al.*, submitted). Deze identificatie is louter theoretisch, bijgevolg moet er nagegaan worden of die genen inderdaad bijdragen tot het pathogeniciteitsmechanisme van *P. larvae*. Aangezien verwacht werd dat potentiële virulentiegenen differentieel tot expressie komen wanneer ze in contact komen met gastheerweefsels, werd d.m.v. Q-PCR nagegaan of tien gekozen potentiële virulentiegenen differentieel tot expressie komen in de aanwezigheid van hemolymfe.

4.1 Preliminare testen

In een eerste deel werd een antwoord gezocht op een aantal essentiële vragen om de condities voor het Q-PCR experiment te bepalen. We onderzochten welk medium het best gebruikt kon worden om *P. larvae* te cultiveren. Aangezien *P. larvae* goed moet groeien in het medium, werden groeicurven van *P. larvae* bepaald in drie verschillende media (§ 3.2.1). Ondanks dat J-agar reeds gebruikt werd door Hornitzky & Nicholls en Nordstrom & Fries (1993; 1995) om endosporen van *P. larvae* uit honing te detecteren, bleek *P. larvae* niet te groeien in vloeibaar J-medium. Deze observatie toont aan dat eerder gerapporteerde groei op vast medium geen garantie is dat de bacterie ook kan groeien in de vloeibare variant. Aangezien we opteerden om te werken in een vloeibare cultuur, werd er niet verder gewerkt met het J-medium. *P. larvae* vertoont een zeer sterke exponentiële groei in het BHIT-medium, maar de cultuur bereikt een minder hoge maximale OD₅₉₀ en sterft sneller af dan in MYPGP-medium. Aan beide media wordt evenveel glucose in zuivere vorm toegevoegd, maar de samenstelling van de andere componenten die toegevoegd worden aan beide media verschillen. Van veel componenten is de exacte samenstelling niet gekend, maar een mogelijke verklaring voor het verschil in groei zou t.g.v. een verschillende suikerbron, aanwezig in die componenten, kunnen zijn. *Brain heart infusion* bevat namelijk glucose, terwijl zetmeel aanwezig is in Mueller-Hinton. Glucose kan sneller gemetaboliseerd worden door *P. larvae*, wat de explosieve groei kan verklaren. Het MYPGP-medium bevat minder monomeer glucose, maar zetmeel is eveneens een bron van glucose. Als de glucose opgebruikt is, zal *P. larvae* het zetmeel degraderen tot glucose, waardoor de langere groei in dit medium verklaard zou kunnen worden. Een tweede belangrijk criterium voor de keuze van het medium was zo

weinig mogelijk endosporenvorming. Sporulatie in vloeibaar medium is zeer zeldzaam en bovendien afhankelijk van de stam (Dingman & Stahly, 1983). We hebben aangetoond dat *P. larvae* BRL-230010 geen endosporen vormt in de geteste media. Er werd besloten om verder te werken met het BHIT-medium, omdat *P. larvae* daarin zeer explosief groeit waardoor een wijziging in groei t.g.v. de aanwezigheid van hemolymfe duidelijker waargenomen zal worden.

Er werd getracht om hemolymfe inclusief hemocyten en vetcellen steriel te collecteren (§ 3.2.4). *P. larvae* komt namelijk met beide fracties in aanraking in de larven. Bovendien werd in *Drosophila melanogaster*, het insect waarbij het immuunsysteem reeds het best bestudeerd is, aangetoond dat het vetlichaam en de hemocyten zeer belangrijk zijn voor de immunorespons. De hemocyten trachten o.a. de microbiële pathogenen op te ruimen d.m.v. fagocytose en de aanwezigheid van de pathogenen (Gram-positieve en -negatieve bacteriën en fungi) wordt waargenomen via moleculen aanwezig in de hemolymfe (nog niet gekend welke dat zijn). Vervolgens worden intracellulaire *pathways* (o.a. Toll *pathway* en Imd *pathway*) in het vetlichaam geactiveerd, wat leidt tot de synthese van AMP's, die gesecreteerd worden in de hemolymfe (Tzou *et al.*, 2002). Ondanks de verschillende collectiemethoden die getest werden, was de bekomen hemolymfe met vetcellen niet steriel. Daarom werd besloten om de bekomen hemolymfe en vetcellen te centrifugeren, waarna de hemolymfe gesteriliseerd werd d.m.v. een 0,2 µm filter. Het is dus belangrijk om op te merken dat in de gebruikte hemolymfe geen hemocyten noch vetcellen aanwezig waren. Bijgevolg zal de genexpressie van *P. larvae* niet gestimuleerd kunnen worden door componenten aanwezig in de membranen van deze cellen. *P. larvae* zal wel kunnen reageren op componenten aanwezig in de hemolymfe o.a. AMP's die constitutief in kleine hoeveelheden aanwezig zijn, moleculen die zorgen voor de herkenning van microbiële pathogenen, aminozuren, monosacchariden, eiwitten... (Evans, 2004; Wyatt, 1961). Deze simplistische nabootsing van de *in vivo* situatie zal gebruikt worden om inzicht te krijgen in de virulentiestrategie van *P. larvae* (Waddell *et al.*, 2007).

Vooreerst werd de invloed van verschillende verdunningen van hemolymfe op de groei van *P. larvae* onderzocht (§ 3.2.4). Hoe meer hemolymfe toegediend werd, hoe groter het effect op de groeicurve (Figuur 3.8). De monosacchariden aanwezig in de hemolymfe zullen hier zeker een rol in spelen. Deze betere groei is een eerste indicatie dat *P. larvae* reageert op de aanwezigheid van hemolymfe, maar zegt niets over de expressie van de potentiële virulentiefactoren. De 1:25 verdunning werd gekozen voor het finaal experiment, aangezien hier reeds een enorme boost in de groei van *P. larvae* t.o.v. de controle waargenomen werd (OD₅₉₀ 1,083 t.o.v. 0,584). Op basis van deze respons verwacht men dat *P. larvae* de mogelijkheid heeft gehad om zich aan te passen aan de nieuwe omgeving. Op basis van de bekomen groeicurve (Figuur 3.8) werd besloten om de genexpressie van tien gekozen potentiële virulentiegenen te bepalen 1 u, 3 u en 9 u na *spiken* met hemolymfe en PTU (controle). Dit experiment is gebaseerd op meerdere studies waar analyse van de genexpressieprofielen van pathogenen in aan- en afwezigheid van hun gastheerweefsels tot de identificatie van potentiële virulentiefactoren geleid heeft (Drevinek *et al.*, 2008; Jandu *et al.*, 2009; Mattinen *et al.*, 2008). In deze studies werden micro-array analyses uitgevoerd en werd slechts op één tijdstip de genexpressie geanalyseerd (het tijdstip varieert van 6 tot 24 u na *spiken*). In dit experiment werden de genexpressieniveaus op drie tijdstippen bepaald, om na

te gaan welk tijdstip ideaal zou zijn om een micro-array analyse uit te voeren. De bekomen resultaten worden bediscussieerd in Paragraaf 4.2.

Analyse van genexpressieprofielen levert waardevolle kennis op over biologische processen. Q-PCR wordt hiervoor de laatste jaren zeer veel gebruikt door de vele voordelen van de techniek: sensitief, kwantificatie kan over een brede range uitgevoerd worden, accuraat... Een belangrijke opmerking is echter dat enkel betrouwbare resultaten bekomen kunnen worden wanneer een correcte normalisatie uitgevoerd wordt. In het verleden werden hiervoor vaak genen betrokken bij basis cellulaire processen gebruikt bv. *gapdh*, 16S *rRNA*... (Huggett *et al.*, 2005). Er is echter vastgesteld dat deze veelgebruikte huishoudgenen niet stabiel tot expressie komen onder alle condities in alle organismen (Thellin *et al.*, 1999). Een verklaring die hiervoor gegeven wordt is dat de huishoudgenen ook een rol kunnen spelen bij andere cellulaire processen dan de essentiële celprocessen (Jian *et al.*, 2008). Tot op heden waren in de literatuur nog geen huishoudgenen beschreven voor het experiment uitgevoerd met *P. larvae* in deze studie. Daarom werden de stabiliteiten van negen mogelijke huishoudgenen (Tabel 3.5) bepaald d.m.v. geNorm, NormFinder en BestKeeper (Tabellen 3.7-3.9). De resultaten bekomen met geNorm en NormFinder waren nagenoeg identiek. BestKeeper duidde andere genen aan als stabielste, maar de genen aangeduid door geNorm en NormFinder scoorden ook niet slecht bij BestKeeper. Daarom werd besloten om de huishoudgenen aangeduid door geNorm te gebruiken om te normaliseren per tijdstip. Vele studies maken namelijk slechts gebruik van één programma, waarbij geNorm het meest gebruikt wordt (Maroufi *et al.*, 2010). GeNorm wordt geprefereerd aangezien het ook het optimaal aantal huishoudgenen bepaalt. Voor ons experiment leidt een normalisatie per tijdstip tot een betrouwbaarder resultaat en bovendien moeten minder kwantificaties uitgevoerd worden dan om te normaliseren over de tijd heen (20 en 36 kwantificaties respectievelijk). Een normalisatie per tijdstip is dus goedkoper, vergt minder tijd en leidt tot een betrouwbaarder resultaat. Omwille van deze redenen hebben we dan ook besloten om per tijdstip een normalisatiefactor te berekenen op basis van de stabielste huishoudgenen op dat tijdstip.

4.2 Expressieniveaus van potentiële virulentiegenen

In een tweede deel werden de genexpressieniveaus van tien potentiële virulentiegenen bepaald 1 u, 3 u en 9 u na *spiken* met hemolymfe en PTU. Na 1 u vertoonde de helft van de genen een neerregulatie in de aanwezigheid van hemolymfe t.o.v. PTU, terwijl na 3 u en 9 u in grote lijn een stijging van de genexpressie waargenomen werd (Figuren 3.12-3.14). Aangezien er vaak slechts een beperkte stijging waargenomen werd en dat die gebaseerd is op slechts één *P. larvae* cultuur is het moeilijk om conclusies te trekken. Een mogelijke verklaring voor de beperkte stijgingen op de geteste tijdstippen is dat de expressie van virulentiefactoren bij verschillende pathogenen gereguleerd wordt via quorum-sensing (QS), waardoor de genexpressie afhankelijk is van de celdensiteit (Drevinek *et al.*, 2008; Mattinen *et al.*, 2008). Hierdoor zullen de pathogenen massaal bepaalde virulentiefactoren aanmaken wanneer ze een bepaalde densiteit bereiken, om zo de defensie van de gastheer te kunnen ondermijnen. Zo worden de exoproteïnen (hemolysines, enterotoxines, proteasen, lipasen en coagulases) van *Staphylococcus aureus* gecoördineerd gesynthetiseerd na de exponentiële fase, terwijl de oppervlakteproteïnen (bv. fibrinogeen bindende eiwitten) voornamelijk tijdens de exponentiële fase geproduceerd worden. Deze gecoördineerde regulatie staat onder controle

van de QS-locus (Frees *et al.*, 2003). Mogelijk staan de virulentiegenen van *P. larvae* ook onder controle van QS, waarbij het aannemelijk is dat verschillende virulentiefactoren op verschillende tijdstippen opgereguleerd zullen worden. Het zou kunnen dat het merendeel van de virulentiefactoren pas opgereguleerd worden na de exponentiële fase, zoals dat bij *S. aureus* reeds vastgesteld is (Frees *et al.*, 2003). Wegens de praktische haalbaarheid was het niet mogelijk om de genexpressie op een vierde tijdstip na te gaan, maar het einde van de exponentiële fase (\approx na 21 u) is een tijdstip dat nog getest zou kunnen worden in de toekomst.

We verwachtten dat de genen die mogelijk coderen voor hemolysines opgereguleerd zouden worden in aanwezigheid van hemolymfe. Hierdoor komen namelijk de componenten aanwezig in de hemocyten terecht in de hemolymfe, waardoor *P. larvae* ze kan metaboliseren. *P. larvae* degradeert namelijk de volledige larve tot vuilbroedkorsten. Geen van beide genen die mogelijk coderen voor een hemolysine (*tylC* en *tly*) werden echter opgereguleerd. Het zou kunnen dat *P. larvae* eerst in contact moet komen met hemocyten vooraleer deze genen sterk geactiveerd worden. Een andere mogelijke verklaring is dat de hemolysines pas opgereguleerd worden na de exponentiële fase, zoals dat ook het geval is bij *S. aureus* (Frees *et al.*, 2003).

Het *clpC* gen werd neergereguleerd 1 u na *spiken* en opgereguleerd 3 u en 9 u na *spiken*. Het Clp proteolytisch complex bestaat uit twee componenten die met elkaar associëren: de ClpP protease subeenheid en een Clp ATPase dat chaperone-activiteit vertoont (bv. ClpC en ClpX). Het ATPase zorgt voor de energie en voor de substraatspecificiteit. Het resulterend complex kan vergeleken worden met het 26S proteasoom bij eukaryoten (Kruger *et al.*, 2000). De Clp complexen zijn zeer geconserveerd bij bacteriën, maar hebben verschillende functies in verschillende species (Capestany *et al.*, 2008). Dit blijkt ook uit de literatuur, waar op basis van o.a. mutanten-analyses verschillende functies toegewezen zijn aan de complexen in verschillende bacteriën. Twee functies die mogelijk ook toegewezen zouden kunnen worden aan het ClpC (ATPase) van *P. larvae* zijn stressrespons en virulentie (Frees *et al.*, 2003; Luong *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2001). Een pathogeen wordt namelijk blootgesteld aan verschillende stresscondities tijdens het infectieproces. Mogelijke oorzaken hiervan zijn onder andere oxidatieve schade, fagocytose en immuunfactoren aangemaakt door de gastheer. Stress kan leiden tot het verkeerd opvouwen van eiwitten, die het ClpC herkent en ontvouwt om ze dan door te geven aan het ClpP voor degradatie (Kojetin *et al.*, 2009). Om de gastheer succesvol te koloniseren zijn dus niet alleen specifieke virulentiefactoren vereist, maar ook algemene stressrespons eiwitten (Yamamoto *et al.*, 2001). Aangezien zuiver hemolymfe (zonder hemocyten) gebruikt werd, zijn fagocytose en oxidatieve schade niet relevant in dit experiment. Toch kan het ClpC een stressrespons eiwit zijn aangezien AMP aanwezig waren in de hemolymfe en omdat *P. larvae* in de honingbijlarve wel in contact komt met reactieve zuurstof species, hemocyten... Inactivatie van het ClpP of van de Clp ATPasen leidt tot een significante reductie van de virulentie van ernstige pathogenen zoals o.a. *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* en *Mycobacterium tuberculosis* (Frees *et al.*, 2003; Gaillot *et al.*, 2000; Kar *et al.*, 2008; Robertson *et al.*, 2002). Dit is zowel te wijten aan hun rol in bovenstaand beschreven stresssituaties, maar ook doordat ze rechtstreeks de synthese van belangrijke virulentiefactoren controleren. Het ATPase dat betrokken is bij deze regulerende functie varieert van pathogeen tot pathogeen. Zo blijkt het ClpC eiwit belangrijk voor de transcriptie van *inlA*, *inlB* en *actA* die coderen voor eiwitten die belangrijk zijn voor adhesie en invasie van de gastheercellen door *L. monocytogenes* (Nair *et al.*, 2000). Bij *S.*

aureus daarentegen is het ClpX eiwit essentieel voor de transcriptie van genen die coderen voor hemolysines, enterotoxines... Het ClpC van *P. larvae* heeft mogelijk ook zo'n regulerende functie, maar verder onderzoek hieromtrent is zeker nodig.

Het gen dat mogelijk codeert voor een multidrug efflux eiwit werd op alle tijdstippen opgereguleerd, maar de sterkste opregulatie werd waargenomen 1 u na *spiken*. Hieruit kunnen we besluiten dat dit efflux eiwit een mogelijke rol speelt vroeg in het infectieproces en mogelijk beschermt het *P. larvae* tegen immuunfactoren aanwezig in de hemolymfe (Mattinen *et al.*, 2008). De multidrug ABC transporter werd 9 u na *spiken* opgereguleerd. Een gelijkaardige transporter is bij *B. subtilis* betrokken bij de signalisatiepathway die leidt tot de activatie van *kinA* (Chan *et al.*, submitted). KinA is een histidine kinase dat deel uitmaakt van een twee-component-systeem dat leidt tot sporulatie. Bij *B. subtilis* wordt *kinA* echter pas maximaal geëxprimeerd net voor de stationaire fase (Predich *et al.*, 1992). In ons experiment vertoont de transporter echter reeds een opregulatie in het midden van de exponentiële fase, waardoor de transporter nu mogelijk betrokken is bij een andere functie dan sporulatie.

flhA is mogelijk betrokken bij de biosynthese van de flagel (Chan *et al.*, submitted). *cheA* codeert voor een histidine kinase, dat signalen vanuit de omgeving doorgeeft aan de responsregulator CheY/CheZ. Het desbetreffend twee-component-systeem is betrokken bij chemotaxis. De responsregulator heeft een invloed op de richting waarin de flagel roteert, waardoor de bacterie aangetrokken of afgestoten wordt door bepaalde metabolieten (Predich *et al.*, 1992). De reden waarom *flhA* en *cheY/Z* neergereguleerd werden 1 u na *spiken* is niet duidelijk. We zouden namelijk verwachten dat het waarnemen van de omgeving bij het begin van een infectie zeer belangrijk is.

4.3 Toekomstperspectieven

Het is belangrijk om op te merken dat deze studie bedoeld was als een verkennend onderzoek om inzicht te krijgen in het design van een micro-array analyse op het mRNA afkomstig van *P. larvae* culturen *gespiket* met hemolymfe. In Paragraaf 4.2 werd op basis van de literatuur een voorstel gedaan omtrent een mogelijke functie van de genen die differentieel tot expressie gebracht werden als respons op hemolymfe. De differentiële genexpressie is echter slechts vastgesteld in één *P. larvae* cultuur. Vooraleer conclusies getrokken kunnen worden over de differentiële expressie moet de genexpressie in meerdere biologische replicaten bepaald worden. Om definitieve functies toe te kennen aan differentieel gereguleerde genen moeten mogelijk mutanten-analyses uitgevoerd worden. Aangezien onder de gebruikte omstandigheden van het finale experiment reeds differentiële genexpressie vastgesteld werd op een selectie van slechts tien genen, kunnen we concluderen dat de condities ook gebruikt kunnen worden voor de micro-array analyse. Een mogelijk punt van verandering is de methode om steriel hemolymfe met hemocyten en vetcellen te collecteren, waardoor de *in vivo* situatie beter nagebootst kan worden. Aangezien de virulentiegenen mogelijk gereguleerd worden via QS, is het aangeraden om ook de post-exponentiële fase nog preliminair te testen. Bij *S. aureus* kwamen de virulentiegenen die onder controle stonden van QS namelijk tot expressie in het midden van de exponentiële fase (reeds getest in deze studie) en na de exponentiële fase (Frees *et al.*, 2003). Mocht er overgegaan worden tot dit experiment dan zullen ook voor dat tijdstip de stabielste huishoudgenen bepaald dienen te worden. In het algemeen kunnen we concluderen dat deze studie bepaalde inzichten verschaft heeft in het experimentdesign om de virulentiegenen van *P. larvae* te identificeren.

Deel 5: Materiaal en methoden

5.1 Gebruikte stam

Al de experimenten werden uitgevoerd op één stam: *Paenibacillus larvae* BRL-230010.

5.1.1 Cultivatie

Eén kolonie werd gesuspenseerd in 300 µl PBS, waarna 100 µl gebruikt werd om 5 ml vloeibare cultuur te enten (= één buis). De vloeibare culturen werden geïncubeerd bij 200 rpm en 37°C. De duur van de incubatie was afhankelijk van het experiment.

Bij grotere culturen werd een precultuur opgestart zoals hierboven beschreven, die dan als ent gebruikt werd. Een andere methode die gebruikt werd, is één waarbij verschillende 5 ml culturen samengevoegd werden tot het gewenste volume.

5.1.2 DNA isolatie

Eén kolonie werd opgepikt en gesuspenseerd in 50 µl water, waarna dit 15 min bij 95°C geïncubeerd werd. Na 5 min centrifugatie bij 5000 rpm (rotor 12143) werd 1 µl van het bekomen supernatans als DNA template in de PCR-reactie gebruikt. Als alternatief werd 1 µl van een glycerolstock gebruikt. Beide methoden werden gebruikt voor de diagnostische PCR. Het DNA voor de rep-PCR werd geïsoleerd m.b.v. een InstaGene Matrix (Bio-Rad, Hercules, VS) volgens het protocol beschreven door de fabrikant, met de volgende aanpassingen: 1) één kolonie werd gesuspenseerd in 200 µl gedistilleerd water en 2 min gecentrifugeerd bij 10000 rpm (rotor 12143) 2) 150 µl InstaGene matrix werd toegevoegd aan de pellet en werd 20 min geïncubeerd bij 56°C 3) hard vortexen en 8 min centrifugeren bij 12000 rpm (rotor 12143) en 4) 5 µl van het supernatans werd gebruikt per 25 µl PCR-reactie.

5.1.3 Diagnostische PCR

De identificatie van de gebruikte stam werd uitgevoerd d.m.v. de primers ontwikkeld door Dobbelaere *et al.*(2001) (Tabel 5.1). De mastermix (25 µl per reactie) bevatte: 10x buffer (Qiagen, Hilden, Duitsland), 17,75 µl gedistilleerd water, 1,6 mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, VS), 2 µM AVB Fw primer (Integrated DNA Technologies, Leuven, België), 2 µM AVB Rv primer (Integrated DNA Technologies), 0,5 mM MgCl₂ (Qiagen), 1,25 U HotStarTaq polymerase (Qiagen) en 1 µl DNA/glycerolstock. Het PCR-programma bestond uit een initiële activatie van het HotStarTaq polymerase bij 95°C voor 15 min, gevolgd door 30 cycli van 1 min denaturatie bij 93°C, 30 sec hybridisatie bij 55°C, 1 min elongatie bij 72°C en 5 min finale elongatie bij 72°C. Het PCR-product (9 µl) werd gevisualiseerd op een 0,8% TBE agarosegel.

Tabel 5.1: De primers die gebruikt werden voor de diagnostische PCR (Dobbelaere *et al.*, 2001).

Naam van het gen	Primersequenties forward/reverse (5' naar 3')	Naam van de primers	Grootte van het amplicon (bp)
16S rRNA	CTTGTGTTTCTTTTCGGGAGACGCCA/ TCTTAGAGTGCCACCTCTGCG	AVB Fw/ AVB Rv	1106

5.1.4 Rep-PCR

Het ERIC-genotype van *P. larvae* BRL-230010 werd bepaald d.m.v. een rep-PCR met ERIC primers (Tabel 5.2) (Genersch *et al.*, 2006). De primers zijn gericht tegen natuurlijk voorkomende, geconserveerde repetitieve DNA sequenties (ERIC = Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), die aanwezig zijn in de extragenische regio van het genoom van de meeste Gram-negatieve en Gram-positieve bacteriën [5]. De bekomen genomische *fingerprint* is uniek voor elke stam. De vier verschillende genotypes van *P. larvae* kunnen onderscheiden worden op basis van het bekomen bandenpatroon (Figuur 1.3). De mastermix (25 µl per reactie) bevatte: 10x buffer (Qiagen), 12,75 µl gedistilleerd water, 1,6 mM dNTPs (Invitrogen), 2 µM primer ERIC1 (Integrated DNA Technologies), 2 µM primer ERIC2 (Integrated DNA Technologies), 1,5 mM MgCl₂ (Qiagen), 1,25 U HotStarTaq polymerase (Qiagen) en 5 µl DNA. Het PCR-programma bestond uit een initiële activatie van het HotStarTaq polymerase bij 95°C voor 15 min, gevolgd door 35 cycli van 1 min denaturatie bij 94°C, 1 min hybridisatie bij 52,4°C, 2,5 min elongatie bij 72°C en 10 min finale elongatie bij 72°C. Het PCR-product (10 µl) werd gevisualiseerd op een 1,4% TBE agarosegel.

Tabel 5.2: De primers die gebruikt werden voor de rep-PCR (Genersch *et al.*, 2006).

Naam van de primers	Primersequenties forward/reverse (5' naar 3')
ERIC1 en ERIC2	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC/AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

5.2 Preliminair testen

5.2.1 Collecteren van hemolymfe

Vooraleer overgegaan kon worden tot het *spiken* van een *P. larvae* cultuur met hemolymfe, werd er gezocht naar een methode om hemolymfe steriel te verzamelen uit larven (L3, L4 en L5) van *Apis mellifera carnica*, afkomstig van de bijenstand van campus 'de Sterre' (UGent).

Bij de eerste poging werd er gewerkt in een laminaire flow. De larven werden verzameld in petriplaten. Ze werden 5 min gewassen in 70% ethanol en vervolgens 5 min in water. De gewassen larven werden overgebracht naar een nieuwe petriplaat. De larven werden aangeprikt en d.m.v. lichte druk konden een druppel hemolymfe (20-30 µl per larve) en een beetje vetcellen verzameld worden in een 1,5 ml epje, waarin fenylthiourea (PTU) met een finale concentratie van 10 µg/ml zat. PTU inhibeert het fenoloxidase, waardoor melanisatie van de hemolymfe voorkomen wordt. Tijdens het collecteren werd de hemolymfe bewaard op ijs.

Bij de tweede methode werd er gewerkt op de bench. De larven werden op dezelfde manier gewassen als bij de eerste methode. Er werd een snede aangebracht over de gehele lengte van de larve en de hemolymfe en veel vetcellen werden gecollecteerd in 2 ml epjes, waarin PTU

(finale concentratie van 10 µg/ml) zat. De hemolymfe en de vetcellen werden bewaard op ijs. Na het collecteren werden de epjes 30 min afgedraaid bij 13000 rpm (rotor 12143) bij 4°C. Hierbij werd de hemolymfe gescheiden van de vetcellen en de bovenste fase (hemolymfe) werd overgebracht naar een nieuw epje. De epjes werden opnieuw 15 min afgedraaid bij 13000 rpm (rotor 12143) bij 4°C. De bovenste fase werd gesteriliseerd d.m.v. een 0,2 µm filter (Whatman, Dassel, Duitsland).

Bij de derde methode werd er eveneens op de bench gewerkt. De gewassen larven werden verzameld in 50 ml buizen waarin PTU zat (finale concentratie ≈ 10 µg/ml). Tijdens het collecteren werden de larven op ijs bewaard. De 50 ml buis werd 60 min afgedraaid bij 13500 rpm (rotor 12139) bij 4°C. De bovenste fase werd verdeeld over 1,5 ml epjes, die opnieuw 30 min afgedraaid werden bij 13500 rpm (rotor 12143) bij 4°C. Partikels die nog aanwezig waren in de bovenste fase werden verwijderd m.b.v. een 0,45 µm filter (Whatman), waarna de hemolymfe gesteriliseerd werd d.m.v. een 0,2 µm filter.

Om de steriliteit van de hemolymfe gecollecteerd volgens de tweede methode na te gaan werd 50 µl hemolymfe uitgeplaat op LB- en BHIT-medium.

5.2.2 Invloed van het medium op de hemocyten

Om te testen of de hemocyten lyseren in het medium, werd het aantal hemocyten in de hemolymfe geteld m.b.v. een Bürker telkamer voor toevoegen van het medium. Hiervoor werd een 1:2 verdunning van hemolymfe in trypaanblauw gemaakt, waardoor levende cellen onderscheiden kunnen worden van dode cellen (respectievelijk kleurloos en blauw). Na toevoegen van het medium werden de cellen overnacht bij 37°C geplaatst en daarna opnieuw geteld. De verdunningen van de hemolymfe die getest werden zijn: 87,5%, 75%, 50%, 25% en 12,5%. Het aantal hemocyten per ml werd met de volgende formule berekend: het aantal cellen/telkamer x 2 (correctiefactor voor verdunning met trypaanblauw) x correctiefactor voor verdunning met medium x 20/19 (correctiefactor voor verdunning met PTU) x 10⁴ (factor van de telkamer).

5.2.3 Groeicurven

De groei van *P. larvae* werd opgevolgd door op regelmatige tijdstippen de OD₅₉₀ van 2 ml cultuur te bepalen met een Vitalab 10 (Vital Scientific, Dieren, Nederland). In eerste instantie werden groeicurven van *P. larvae* in 5 ml van de drie verschillende media (J-, BHIT- en MYPGP-medium) bepaald. Om na te gaan hoeveel endosporen er gevormd werden in de verschillende media, werd een verdunningsreeks gemaakt (10⁻¹-10⁻⁶) wanneer de culturen een OD₅₉₀ van 0,1; 0,2; 0,3 en 0,4 bereikt hadden. Van elke verdunning werd 50 µl uitgeplaat op MYPGP-medium zonder en met hitte schok (10 min bij 80°C). Door de hitte schok worden de vegetatieve cellen afgedood, waardoor het aantal endosporen bepaald kan worden.

Er werden ook groeicurven in 50 ml van MYPGP- en BHIT-medium bepaald. De volgende experimenten werden steeds uitgevoerd op *P. larvae* gegroeid in BHIT-medium.

- **De invloed van DMSO, glycerol en PTU op de groei van *P. larvae***

DMSO en glycerol zijn twee cryoprotectants. Vooraleer getest werd welke component het best gebruikt kan worden om de hemocyten in te vriezen, werden de invloeden van verschillende verdunningen van beide componenten op de groei van *P. larvae* bepaald.

Ook de invloed van PTU, toegevoegd aan de hemolymfe om melanisatie te voorkomen, werd nagegaan. De culturen werden gegroeid tot een OD₅₉₀ van $\approx 0,2$, waarna DMSO, glycerol of PTU toegevoegd werd. Zowel voor DMSO als voor glycerol werden de volgende percentages getest: 10%, 7,5%, 5%, 2,5%, 1% en 0%. De concentraties die getest werden voor PTU zijn: 10 $\mu\text{g/ml}$, 7,5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ en 0 $\mu\text{g/ml}$. Het totaalvolume was steeds 2 ml: 1 ml cultuur en 0,9 ml medium, aangevuld door de te testen component verdund in PBS.

- **De invloed van hemolymfe op de groei van *P. larvae***

De hemolymfe werd meteen na het collecteren verdund met PBS en ingevroren. *P. larvae* culturen met een OD₅₉₀ van $\approx 0,2$, werden *gespiket* met verschillende hoeveelheden hemolymfe. De verdunningen die getest werden zijn: 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 en 1:500. Het totaalvolume was steeds 2 ml: 1 ml cultuur en 550 μl medium, aangevuld met hemolymfe verdund in PBS.

Om na te gaan of de culturen, *gespiket* met hemolymfe gecollecteerd op de eerste manier, op het einde van het experiment (stationaire fase) niet overgroeid waren door andere bacteriën, werd 50 μl van de finale cultuur uitgeplaat op LB-medium. Er werd eveneens een verdunningsreeks gemaakt van de finale cultuur en 50 μl van de 10^{-7} - 10^{-10} verdunningen werd uitgeplaat op MYPGP-medium. De platen werden bij 37°C geplaatst. Het aantal kolonies op het LB-medium werd geteld na één en twee dagen. De koloniemorfologie op MYPGP-medium werd bekeken na drie dagen. Na bepaling van de groeicurven met hemolymfe gecollecteerd op de tweede manier, werd uitsluitend 50 μl van de finale cultuur uitgeplaat op BHIT-medium. De koloniemorfologie werd na drie dagen bekeken.

5.3 Q-PCR

Het grote verschil tussen een Q-PCR en een klassieke PCR is dat bij Q-PCR de hoeveelheid PCR-product gemeten wordt tijdens de exponentiële fase i.p.v. op het einde. Tijdens de exponentiële fase zijn geen componenten tekort (bv. dNTP's, primers,...), waardoor na elke cyclus de hoeveelheid PCR-product nagenoeg verdubbeld. Bijgevolg is de exponentiële fase de beste fase om accurate data voor kwantificatie te bekomen. Het Q-PCR toestel bepaalt tijdens de exponentiële fase twee waarden: één *threshold* en de C_T -waarden (*cycle threshold*) van de geteste stalen. De C_T -waarde is de cyclus waarbij de fluorescentie van dat staal de *threshold* bereikt. Hoe meer input (= hoe meer cDNA en dus ook hoe meer mRNA) hoe sneller de fluorescentie de *threshold* zal bereiken en dus hoe lager de C_T -waarden.

5.3.1 RNA stabilisatie

Prokaryoot mRNA heeft geen 5' cap en slechts zelden een 3' polyA staart. Daardoor is het zeer onstabiel en is de gemiddelde halfwaarde tijd 3 min. Stabilisatie van het RNA is dus een absolute vereiste voor een correcte genexpressie-analyse. Na het collecteren van bacterieculturen (voor *spiken*, na 1 u, 3 u, 9 u *gespiket* met hemolymfe en na 1 u, 3 u, 9 u *gespiket* met PTU) werd het RNA gestabiliseerd met RNAlaterTM (Applied Biosystems, Foster City, VS). 1,5 ml cultuur per epje werd afgedraaid gedurende 2 min bij 10000 rpm (rotor 12143) en 4°C. De pellets werden geresuspendeerd in 500 μl PBS. Na centrifugatie (2 min bij 10000 rpm en 4°C) werden de pellets opgelost in 10 μl PBS. Finaal werd 50 μl

RNAlater™ toegevoegd en werden de epjes 2 min op ijs geplaatst. Na centrifugatie (2 min bij 10000 rpm en 4°C) werden de stalen bewaard bij -20°C.

5.3.2 RNA isolatie

Het mRNA van prokaryoten bevat geen intronen, waardoor het onmogelijk is om co-amplificatie van genomisch DNA te voorkomen d.m.v. intronoverspannende primers. Daarom is het van groot belang dat het RNA vrij is van genomisch DNA. Vier RNA isolatiemethoden werden uitgetest op RNAlater™ behandelde bacteriële pellets (afkomstig van niet-*gespikte* culturen met eenzelfde OD₅₉₀). De RNA concentratie en zuiverheid werd bepaald met een Nanodrop ND1000 UV-VIS spectrofotometer (Isogen life science, De Meern, Nederland). Zuiver RNA heeft een A260/A280 ratio tussen 1,7 en 2,1. De opbrengt en de afwezigheid van genomisch DNA waren de belangrijkste criteria bij het kiezen van de beste methode.

1) Enzymatische lyse en afbraak door proteïnase K

RNA werd geïsoleerd m.b.v. de RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) volgens het protocol beschreven door de fabrikant. De bacteriële cellen werden gelyseerd door $2,4 \cdot 10^5$ units lysozyme (Fluka, Milwaukee, VS) en 4 units proteïnase K (Invitrogen). Om het genomisch DNA te verwijderen werd er gebruik gemaakt van een gDNA eliminator spinkolom en werd een *on-column* digestie met 27 units DNase (Qiagen) uitgevoerd.

2) Enzymatische lyse, afbraak door proteïnase K en mechanische disruptie

RNA werd geïsoleerd m.b.v. de RNeasy Plus Mini Kit volgens het protocol beschreven door de fabrikant. De bacteriële cellen werden gelyseerd door $1,2 \cdot 10^5$ units lysozyme (Fluka), 4 units proteïnase K (Invitrogen) en 1,5 min *bead beating* m.b.v. een precellys 24 (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankrijk) met 0,1 mm Silica Beads (BioSpec Products, Bartlesville, VS). Om het genomisch DNA te verwijderen werd er gebruik gemaakt van een gDNA eliminator spinkolom en werd een *on-column* DNase digestie (27 units) uitgevoerd.

3) Enzymatische lyse, afbraak door proteïnase K, mechanische disruptie en lyse reagens

RNA werd geïsoleerd m.b.v. de RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) volgens het protocol beschreven door de fabrikant. De bacteriële cellen werden gelyseerd door $1,2 \cdot 10^5$ units lysozyme (Fluka), 4 units proteïnase K (Invitrogen) en 1 ml Qiazol lyse reagens (opgewarmd tot 65°C). Om het genomisch DNA te verwijderen werd een *on-column* DNase digestie (27 units) uitgevoerd.

4) Enzymatische lyse en lyse reagens

RNA werd geïsoleerd m.b.v. de Invitrap Spin Cell RNA Mini Kit (STRATEC Molecular, Birkenfeld, Duitsland) volgens het protocol beschreven door de fabrikant. De bacteriële cellen werden gelyseerd door $1,2 \cdot 10^5$ units lysozyme (Fluka) en 350 µl Lysis Solution R (bevat 0,01 M DTT). Om het genomisch DNA te verwijderen werd een DNA Binding Spin Filter gebruikt en werd een *on-column* DNase digestie (27 units) uitgevoerd.

5.3.3 cDNA synthese

De cDNA synthese werd uitgevoerd met de Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Duitsland). Aangezien het bacterieel mRNA niet over een 3' polyA straat beschikt, werd gebruik gemaakt van random hexamere primers. Het cDNA dat gebruikt werd om de PCR-efficiënties te bepalen, werd gesynthetiseerd uitgaande van 4 µg totaal RNA. De efficiënties van de primerparen van de huishoudgenen en potentiële virulentiegenen werden bepaald op een cDNA *pool*. Deze *pool* werd samengesteld uit cDNA afkomstig van de volgende culturen: 1 u, 3 u, 9 u *gespiket* met hemolymfe en 1 u, 3 u, 9 u *gespiket* met PTU. Het cDNA dat gebruikt werd in de Q-PCR om de meest stabiele huishoudgenen en de expressie van de virulentiegenen op de verschillende tijdstippen te bepalen, werd gesynthetiseerd van 4 µg, 2 µg, 1 µg of 0,5 µg totaal RNA (afhankelijk van de RNA-opbrengst van het staal).

5.3.4 Keuze van mogelijke huishoud- en virulentiegenen

Kwantitatieve PCR is een routinetechniek geworden voor de analyse van genexpressie. Het is een zeer sensitieve methode, die leidt tot een accurate kwantificatie van RNA. Een correcte normalisatie is essentieel om betrouwbare resultaten te bekomen. Aangezien er geen universele huishoudgenen bestaan, moeten huishoudgenen gevalideerd worden voor elk experiment. In eerste instantie werd in de literatuur gezocht naar een tiental huishoudgenen die reeds gebruikt werden in studies met *Paenibacillus* en *Bacillus*. De genen die geselecteerd werden (Tabel 5.3) coderen voor proteïnen die tot verschillende functionele groepen behoren, om de kans dat ze samen gereguleerd worden te verminderen. Van de huishoudgenen gevonden in studies met *Bacillus* werd de overeenkomstige gensequentie van *P. larvae* opgezocht in de annotatielijst opgesteld door Chan *et al.* (submitted).

Tabel 5.3: De huishoudgenen die geëvalueerd werden tijdens deze thesis.

Afkorting	Volledige naam	Functionele groep
<i>gyrA</i>	GyraseA	Replicatie
<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor	Transcriptie
<i>eftu</i>	Elongatiefactor Tu	Translatie
<i>purH</i>	Phosphoribosyl aminoimidazole carboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	Nucleïnezuursynthese
<i>cmk</i>	Cytidylaatkinaze	Nucleïnezuursynthese
<i>mbl</i>	Rod-shape determining protein mbl	Morfogenese
<i>adk</i>	Adenylaatkinaze	Energie homeostase
<i>gapdh</i>	Glyceraldehyde 3-fosfaatdehydrogenase	Energie metabolisme
<i>sucB</i>	Succinyl-coA synthetase subeenheid β	Energie metabolisme
<i>fum</i>	Fumaraathydratase	Energie metabolisme
<i>mdh</i>	Malaatdehydrogenase	Energie metabolisme

Chan *et al.*(submitted) identificeerde meer dan 200 potentiële virulentiegenen, waarvan er in deze studie twintig geselecteerd werden op basis van de volgende twee criteria: uit verschillende functionele groepen en een zo laag mogelijke E-waarde (Tabel 5.4)

Tabel 5.4: De potentiële virulentiegenen waarvoor de primerefficiënties bepaald werden tijdens deze thesis.

Functionele groep	Eiwit	Gelijkend op het eiwit ... van ...	Mogelijke functie op basis van de geconserveerde domein databank (CDD)	E-waarde
Toxine				
	EFX46729	Het epsilon toxine Etx van <i>Clostridium perfringens</i> en het <i>mosquitocidal</i> toxine Mtx2 van <i>Bacillus</i>	Porievorming in gastheercellen	8,00E-20
	EFX43878	Een vegetatief insecticidaal eiwit (Vip2) van <i>Bacillus</i>	Actine-ADP-ribosylerend toxine: de enzymatische component van een binair toxine	4,00E-32
	EFX43879	Het binair toxine B/ het anthrax toxine PA van <i>Clostridium</i>	de membraancomponent van een binair toxine	2.00E-102
	EFX45058	Het binair toxine B/ het anthrax toxine PA van <i>Clostridium</i>	De membraancomponent van een binair toxine	1.00E-83
Hemolysine				
	EFX44544	Het putatief membraangeassocieerd eiwit (TylC) van <i>Bacillus subtilis</i>	Hemolysine	8.00E-72
	EFX46836	Het putatief membraan hydrolase (HlyIII) van <i>Bacillus cereus</i>	Cytolysine, een integraal membraanproteïne dat poriën vormt in gastheercellen	2.00E-23
	EFX45724	Het Duf37 eiwit van <i>Bacillus subtilis</i>	Hemolysine	1.00E-22
	EFX45686	Een methyltransferase met een RNA-bindend domein (Tly) van <i>Bacillus subtilis</i>	Een hemolysine dat indirect leidt tot porievorming	2.00E-56
Protease				
	EFX47002	Een klasse III stressrespons gerelateerd ATPase (ClpC) van <i>Bacillus subtilis</i>	Speelt mogelijk een rol bij de productie van virulentiefactoren	0
	EFX46420	Een metaalafhankelijk carboxypeptidase van <i>Bacillus subtilis</i>	Een zink afhankelijk carboxypeptidase	8,00E-149
	EFX45284	Een klasse III ATP-afhankelijk hiteschok LonA protease van <i>Bacillus subtilis</i>	Voornamelijk bestudeerd bij Gram-negatieve bacteriën, waar het een rol speelt in de regulatie van het type III secretie-apparaat en van quorum sensing	0
	EFX44427	Een oligoendopeptidase F van <i>Bacillus subtilis</i>		8,00E-144
	EFX44779	Een germinatie protease van <i>Bacillus subtilis</i>		1,00E-110

Antibioticaresistente eiwitten				
EFX47080	Een multidrug ABC transporter van <i>Bacillus subtilis</i>	Een ABC transporter dat betrokken is bij de signalisatiepathway die leidt tot de activatie van KinA bij het begin van de sporulatie		1,00E-129
EFX45532	Een multidrug efflux eiwit van <i>Bacillus subtilis</i>			1,00E-114
EFX45333	Een putatieve ABC transporter (MdlB) van <i>Bacillus subtilis</i>	Een multidrug ABC transporter		6,00E-107
Flageleiwitten				
EFX46102	Het flagellair biosynthese eiwit FlhA van <i>Bacillus subtilis</i>	Biosynthese van de flagel		0
EFX46098	Een histidine kinase (CheA) van een twee-component-systeem betrokken bij chemotaxis van <i>Bacillus subtilis</i>	Sensor kinase		1,00E-180
EFX46498	Een responsregulator (CheY/CheZ) van een twee-component-systeem betrokken bij chemotaxis van <i>Bacillus subtilis</i>	Responsregulator		3,00E-91
EFX44501	De sigmafactor van het RNA polymerase voor het flageloperon (FliA) van <i>Bacillus subtilis</i>	Regulatie van de flagelbiosynthese		1,00E-111

5.3.5. Primer design

Voor al de genen in Tabel 5.3 en 5.4 werden de nucleotidesequenties opgezocht in de annotatielijst opgesteld door Chan *et al.* (submitted) en primers werden ontwikkeld met Primer 3 software [6]. De standaardinstellingen werden behouden (o.a. Tm 60°C), alleen de grootte van het amplicon werd aangepast naar 100-150 bp. De amplicons van een Q-PCR zijn kort, zodat het Taq polymerase tijd genoeg heeft om tijdens elke cyclus een volledig product aan te maken. In tegenstelling tot een klassieke PCR is er dus geen finale elongatiestap. In Tabel 5.5 worden de primersequenties weergegeven.

Tabel 5.5: De primerparen die getest zijn voor kwantitatieve PCR.

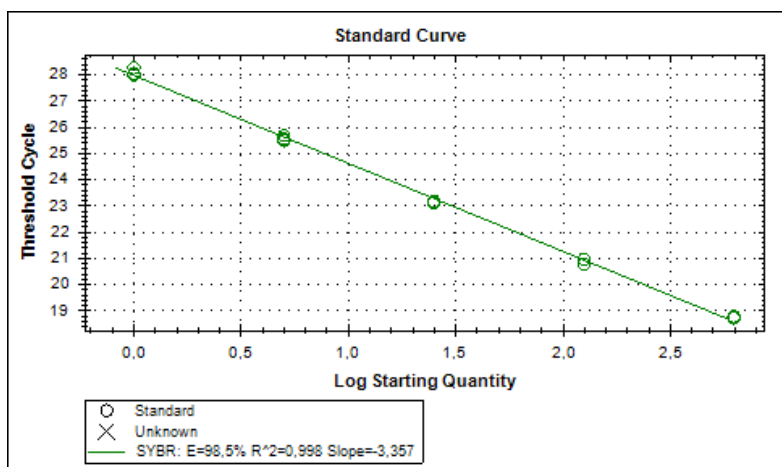
Naam van het gen	Primersequenties forward/reverse (5' naar 3')	Naam van de primers	Grootte van het amplicon (bp)
<i>gyrA</i>	TATGAAATTCGGAGCTTGG/AGAAAATGTCCGC TCTTCGAA en ATGCGGTCATCCCTATTGAG/GGTCATCTCCCGC AAATTA	DDK_001/ DDK_002 en DDK_063/ DDK_064	125 en 147
<i>rpoD</i>	GGTTCTTTGGACGAGGATGA/CCATAATCCGTTTG GCAAGT en AACTTGCCAAACGGATTGAG/AAGCCCCATGTTA CCTTCCT	DDK_003/ DDK_004 en DDK_065/ DDK_066	136 en 149
<i>eftu</i>	GGCATCGTAAAAGGCATGAT/GCACCAGTTGTGG AAGGAAT en TGTTGAAGCTGGTGAAGGTG/TCCGCTTTTCTTT TGCAGT	DDK_005/ DDK_006 en DDK_067/ DDK_068	131 en 150
<i>purH</i>	TTCTCTCGGGGCTTTTGATA/CTACTGTTGGCTCA CGGTCA	DDK_007/ DDK_008	149
<i>cmk</i>	TAACATCGGTGCCCTTCTTC/CCACCCTCTTCGCT AGTCAG	DDK_009/ DDK_010	135
<i>mbl</i>	TCAACAGGTGATGCTTTTTCG/TGTGATTTCGTCAG GAACCA	DDK_011/ DDK_012	105
<i>adk</i>	ATTGCCAAGGGTGTGTAGC/TTCAGCCCGGATTC ATTTAG	DDK_013/ DDK_014	119
<i>gapdh</i>	GTACAGGGCGATTACCTGGA/GCCATCAACGAAT ACCTGCT	DDK_015/ DDK_016	136
<i>sucB</i>	CCAAAATATGCGGAGCTGAT/GTGAACCGCAATT TCCCTTA	DDK_017/ DDK_018	144
<i>fum</i>	GACTTGGGAACAGCGAATGT/TGTCCGTCCTACC ATTTTCC en TGCGCCCCTACAAACATTAC/CATATTTCCGCTCG GTTGAT	DDK_019/ DDK_020 en DDK_069/ DDK_070	141 en 150
<i>mdh</i>	CGGTTGTAGGTGCTGGTTTT/AGCATGTCCAATGC TTTTCC	DDK_021/ DDK_022	130
<i>etx_mtx2</i>	CAAATCCCTCTGTGGGAGA/TCCACAGACGAAT GTGCAG	DDK_023/ DDK_024	143
<i>vip2</i>	AAGGGGGTAATGCTGGGTAT/TCTGCGATCCACC ATTACA	DDK_025/ DDK_026	126
<i>binair toxineB/PA (1)</i>	CCGTTAAAGGAAGTCCGACA/GTTTTCCATGTCC CCAAATG	DDK_027/ DDK_028	146
<i>binair toxineB/PA (2)</i>	TCCGTTCTGTCTGATGACCA/TTTCGCCGCTAAAG AGTCAT en ACTTTGGTCCCATTCCATT/GACCGCCCTCCTTA ATTTTC	DDK_029/ DDK_030 en DDK_071/ DDK_072	150 en 141

<i>tylC</i>	TAAAGTCCGCCAATCCAGAC/CTATCCAACCGAG TCCGAGA	DDK_031/ DDK_032	149
<i>hlyIII</i>	TGGGATGGCTCATCATTTTT/CCAGATAGCATGGT GGAAGG	DDK_033/ DDK_034	149
<i>duf37</i>	ACTGGAAGCCATTGAAGAGC/CAAGTTTGTGGC TGCCTGA en TATGCACTGGAAGCCATTGA/TTTGTGGTGCCT GAATGT	DDK_035/ DDK_036 en DDK_073/ DDK_074	147 en 148
<i>tly</i>	GGATCTTCAACGGGAGGATT/TAGCGGAAATTGG TTCGTTC	DDK_037/ DDK_038	146
<i>clpC</i>	CGACGAATCCTGCTTACACA/AATACCCGTGCTG CTACACC	DDK_039/ DDK_040	148
<i>zink afhankelijk carboxypeptidase</i>	AGCAACGTTCCGAAGTGATT/TGCATTCCAGCAC CATTTTA en GAGCAACGTTCCGAAGTGAT/ATTCCAGCACCAT TTACGG	DDK_041/ DDK_042 en DDK_075/ DDK_076	150 en 148
<i>ATP-afhankelijk Lon protease</i>	GAGAGGATGCCCTAATGCAA/AATCCCCTTGGG CACTTCC en GGTTCGCCGAAATTCAGATA/CAAGGTCAGCTTA CCGCTTC	DDK_043/ DDK_044 en DDK_077/ DDK_078	150 en 141
<i>oligoendopeptidase F</i>	AATACCGCAATGCCAATAC/GGTACGGAAGTGG TCAGCAT	DDK_045/ DDK_046	149
<i>germinatie protease</i>	GATTACGCGGCATTATTTTCG/TCGGGCTTTGATT ATCCAC	DDK_047/ DDK_048	147
<i>multidrug ABC transporter</i>	CGATGCCCTTTTGTATCCTA/CAGATCAGCATGCC CAGATA	DDK_049/ DDK_050	147
<i>multidrug efflux protein</i>	GCCATAGGCATGGCTTGAT/CTGCATCAAACAG CTGGAAG	DDK_051/ DDK_052	145
<i>mdlB</i>	CATGAACGGATTTCAGGGACT/CATTGATAACGGC AAACGTG	DDK_053/ DDK_054	148
<i>flhA</i>	ATGAAGGGGATGTCACTTGC/TCCCAGATTTCCCT CTGATG	DDK_055/ DDK_056	147
<i>cheA</i>	AACGGGACAGTCCGATGTAA/AGAAGGACGGAC TGCTGAAA	DDK_057/ DDK_058	150
<i>cheY/Z</i>	GACGGCTTTCTGTCCAAAG/ACCGCCAGATAAT GCAGAAG	DDK_059/ DDK_060	150
<i>fliA</i>	CACGGTGACCCGAAATAAAG/CTGAGATTGCCAT TCACCAA	DDK_061/ DDK_062	150

5.3.6. PCR-efficiëntie

Bij een Q-PCR zal tijdens de eerste cyclus slechts één primer binden en wordt de tweede streng van het cDNA aangemaakt. De amplicons zijn kort en er wordt gezocht naar primers met een efficiëntie tussen de 80% en 120%, zodat vanaf de tweede cyclus het aantal kopijen ongeveer verdubbeld wordt. Indien elke cyclus niet tot een verdubbeling van het aantal kopijen zou leiden, dan zou dit leiden tot een verkeerde inschatting van het mRNA niveau.

Om de PCR-efficiëntie van elk primerpaar te bepalen, werd voor elk paar een standaardcurve opgesteld (Figuur 5.1). Hiervoor werd een vijfvoudige verdunningsreeks van het cDNA gemaakt. De efficiënties van de primerparen van de huishoudgenen werden getest op cDNA afkomstig van een niet-*gespikte* cultuur. De efficiënties van de primerparen van de potentiële virulentiegenen werden bepaald op een cDNA *pool* waarin cDNA aanwezig was van de volgende culturen: 1 u, 3 u, 9 u *gespiket* met hemolymfe en 1 u, 3 u, 9 u *gespiket* met PTU. De efficiënties van de primerparen werden berekend door de Bio-Rad CFX Manager op basis van de richtingscoëfficiënt (rico) van de standaardcurven met de volgende formule: $E = (10^{-1/\text{rico}}) - 1$ (Figueiredo *et al.*, 2009).



Figuur 5.1: Een standaardcurve op basis van een vijfvoudige verdunningsreeks van cDNA. Een richtingscoëfficiënt van -3,32 komt overeen met een PCR-efficiëntie van 100%.

De Q-PCR werd uitgevoerd in 96-well platen (Bio-Rad) op een CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). De hoeveelheid cDNA werd aangepast afhankelijk van de μg RNA die gebruikt werd bij de synthese en werd toegevoegd aan de 2x Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 0,2 μM forward primer (Integrated DNA Technologies), 0,2 μM reverse primer (Integrated DNA Technologies) en gedistilleerd water. Het totaalvolume bedroeg 15 μl per reactie. Het gebruikte amplificatieprogramma bestond uit een initiële activatie van het Platinum Taq polymerase bij 50°C voor 2 min, een initiële denaturatie 95°C voor 2 min, gevolgd door 44 cycli van 20 sec denaturatie bij 95°C en 40 sec hybridisatie en elongatie bij 60°C. Nadien werd een smeltcurve van het geamplificeerde amplicon gemaakt. Hiervoor werd de temperatuur vanaf 65°C elke 5 sec met 0,5°C te verhogen tot 95°C. Tijdens dit proces wordt de fluorescentie constant gemeten. Het dsDNA denatureert bij een welbepaalde temperatuur (afhankelijk van het GC%), waardoor SYBR Green loskomt van het DNA en de fluorescentie drastisch zal dalen. Indien meerdere amplificatieproducten aanwezig zijn in het staal, bv. doordat de primers dimeren vormen, dan resulteert dat in verschillende brede pieken (Scharlaken *et al.*, 2008). De smeltcurven moeten nagekeken worden voor elk primerpaar en mogen slechts t.h.v. één welbepaalde temperatuur pieken vertonen. Elke reactie wordt in triplicaat uitgevoerd en per primerpaar wordt eveneens in triplicaat een ‘no template controle’ (NTC = gedistilleerd water i.p.v. cDNA) meegenomen.

5.3.7. Q-PCR

- **Stabiliteit van de genexpressie van de mogelijke huishoudgenen**

Om de stabiliteit van de mogelijke huishoudgenen te bepalen, werden elf onafhankelijke bacterieculturen (elk 25 ml) gekweekt. Wanneer de cultuur een OD_{590} van $\approx 0,2$ bereikt had, werd 3 ml cultuur geïsoleerd en behandeld met RNAlaterTM (procedure zie § 5.3.1). Daarna werd de cultuur in twee gesplitst en werd één cultuur *gespiket* met hemolymfe (1:25) en de andere met PTU. Eén uur, 3 u en 9 u na *spiken* werd 3 ml van alle culturen geïsoleerd en behandeld met RNAlaterTM. Al de pellets werden bewaard bij -20°C. De C_T -waarden van al de mogelijke huishoudgenen werden bepaald in de zes verschillende stalen van elke onafhankelijke cultuur d.m.v. Q-PCR. De verschillen t.o.v. de Q-PCR om de PCR-efficiënties te bepalen zijn: 1) het cDNA dat toegevoegd werd, is

1/5 verdund en 2) voor elk gen werd een ‘no reverse transcription’ (NRT= RNA ipv cDNA) controle in triplicaat meegenomen. NormFinder, geNorm (versie 3.4) en BestKeeper werden gebruikt om de meest stabiele huishoudgenen te bepalen. De drie programma’s zijn geschreven in *Visual Basic for Applications* (Excel). Elk programma bepaalt op een verschillende manier de stabielste huishoudgenen. GeNorm is gebaseerd op het principe dat de expressieratio’s van twee ideale huishoudgenen identiek moeten zijn in alle stalen, onafhankelijk van de experimentele condities. Variatie in de expressieratio’s wijst er op dat één (of beide) huishoudgen(en) niet stabiel tot expressie komt/komen. De expressiestabiliteit M wordt bepaald voor elk mogelijk huishoudgen op basis van de paarsgewijze variatie van de expressieratio’s van dat gen met al de andere mogelijke huishoudgenen. Stapsgewijs wordt het minst stabiele huishoudgen (hoogste M -waarde) verwijderd, waarna voor de overgebleven genen opnieuw de M -waarden berekend worden. Dit wordt herhaald tot de twee meest stabiele huishoudgenen bekomen worden (Vandesompele *et al.*, 2002). Normfinder is model gebaseerde methode, die zowel een schatting maakt van de intergroep variatie en de intragroep variatie. Op basis van deze twee variaties wordt de stabiliteitswaarde bepaald (hoe lager de stabiliteitswaarde, hoe stabiel het huishoudgen) (Andersen *et al.*, 2004). BestKeeper baseert zich op de variatie van de C_T -waarden (standaard deviatie), waarna een paarsgewijze correlatie analyse uitgevoerd wordt (Pfaffl *et al.*, 2004).

Voor NormFinder en geNorm werden de gemiddeldes van de C_T -waarden (per triplicaat) omgezet naar ruwe data met de formule: $[(\text{PCR-efficiëntie van het huishoudgen} \times 2)/100]^{\wedge}(\text{laagste } C_T\text{-waarde van het betreffend huishoudgen in al de replicaten} - \text{de } C_T\text{-waarde van het huishoudgen in een bepaald replicaat, met een bepaalde behandeling en op een bepaald tijdstip})$. BestKeeper vereist als input de gemiddeldes van C_T -waarden (per triplicaat) en de PCR-efficiënties (bepaald volgens de procedure in § 5.3.6).

- **Genexpressie van de potentiële virulentiegenen**

In het finale experiment werd de genexpressie van de potentiële virulentiegenen bepaald. De methode is vergelijkbaar met deze beschreven voor het bepalen van de stabiliteit van de huishoudgenen op enkele verschillen na: 1) er werd slechts 1 bacteriecultuur (120 ml) gekweekt 2) er werd 18 ml gecollecteerd van elke cultuur op elk tijdstip en 3) voor elk gen (zowel huishoud- als potentieel virulentiegen) werd een standaardcurve gemaakt op een cDNA *pool* (samengesteld uit cDNA van al de condities waarin het gen gekwantificeerd werd) volgens de methode beschreven in § 5.3.6.

De mRNA hoeveelheid van de potentiële virulentiegenen na 1 u, 3 u, 9 u *gespiket* met hemolymfe werd bepaald relatief t.o.v. de overeenkomstige cultuur die *gespiket* werd met PTU (= de referentie). Hiervoor werd voor elk staal de ΔC_T -waarde bepaald met de volgende formule: C_T -waarde van de referentie (= van de cultuur *gespiket* met PTU) - C_T -waarde van het desbetreffend staal. Om de genormaliseerde relatieve expressieniveaus te bekomen werd de volgende formule gebruikt: $(1,95^{\Delta C_T})/\text{normalisatiefactor}$ De normalisatiefactor is het geometrisch gemiddelde van de expressieniveaus van de huishoudgenen op het desbetreffend tijdstip.

Referenties

Boeken:

Hoff M. *Pollination*. First edition. Minnesota: Creative Education; 2004.

Madigan MT, Martinko JM. *Brock biology of microorganisms*. Eleventh edition. U.S.: Pearson; 2006.

White GF. *The Bacteria of the Apiary, with Special Reference to Bee Diseases*. Technical Series No. 14. Washington DC: U.S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology; 1906.

Winston ML. *The Biology of the Honey Bee*. First edition. Cambridge: Harvard University Press; 1991.

Websites:

[1] <http://www.konvib.eu/>

[2] <http://www.uniprot.org/taxonomy/1464>

[3] <http://www.bioconductor.org/help/course-materials/2009/EMBLJune09/Talks/RNAseq-Paul.pdf>

[4] http://bioinformatics.psb.ugent.be/courses/ggs/bioinformatics_yves/online/

[5] <https://www.msu.edu/~debruijn/>

[6] http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi.

Artikels

Alippi AM, Albo GN, Reynaldi FJ, De Giusti MR (2005) In vitro and in vivo susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin. *Veterinary Microbiology* **109**(1-2): 47-55

Alippi AM, Lopez AC, Reynaldi FJ, Grasso DH, Aguilar OM (2007) Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. *Veterinary Microbiology* **125**(3-4): 290-303

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**(15): 5245-5250

Antunez K, Harriet J, Gende L, Maggi M, Eguaras M, Zunino P (2008) Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Veterinary Microbiology* **131**(3-4): 324-331

Antunez K, Piccini C, Castro-Sowinski S, Rosado AS, Seldin L, Zunino P (2007) Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Vet Microbiol* **124**(1-2): 178-183

Ashiralieva A, Genersch E (2006) Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees - a review. *Apidologie* **37**(4): 411-420

Bastos EMAF, Simone M, Jorge DM, Soares AEE, Spivak M (2008) In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**(3): 273-281

Blacqui re T (2009) Visie Bijenhouderij en Insectenbestuiving. *pdf informatiebrochure* 1-58

Capestany CA, Tribble GD, Maeda K, Demuth DR, Lamont RJ (2008) Role of the Clp system in stress tolerance, Biofilm formation, and intracellular invasion in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology* **190**(4): 1436-1446

- Cerenius L, Babu R, Soderhall K, Jiravanichpaisal P (2010) In vitro effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**(1): 21-23
- Cerenius L, Lee BL, Soderhall K (2008) The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology* **29**(6): 263-271
- 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
- Chan QWT, Cornman RS, Birol I, Liao N, Chan S, Docking R, Taylor G, Jones SJM, de Graaf DC, Evans JD, Foster LJ. (submitted) Updated genome assembly and annotation of *Paenibacillus larvae*, the agent of American foulbrood disease of honey bees.
- Chan QWT, Foster LJ (2008) Changes in protein expression during honey bee larval development. *Genome Biology* **9**(10): -
- Cornelissen B, van der Steen S, Blacqui re T. De broedziekten van honingbijen, herkenning en bestrijding. pdf informatiebrochure broedziekten, pp. 1-15.
- Dancer BN, Chantawannakul P (1997) The proteases of American foulbrood scales. *Journal of Invertebrate Pathology* **70**(2): 79-87
- Davidson EW (1970) Ultrastructure of peritrophic membrane development in larvae of the worker honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **15**: 53-61
- de Graaf DC, Alippi AM, Brown M, Evans JD, Feldlaufer M, Gregorc A, Hornitzky M, Pernal SF, Schuch DM, Titera D, Tomkies V, Ritter W (2006a) Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Lett Appl Microbiol* **43**(6): 583-590
- Dingman DW, Stahly DP (1983) Medium Promoting Sporulation of *Bacillus-Larvae* and Metabolism of Medium Components. *Applied and Environmental Microbiology* **46**(4): 860-869
- Dobbelaere W, de Graaf DC, Peeters JE, Jacobs FJ (2001) Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie* **32**(4): 363-370
- Drevinek P, Holden MTG, Ge ZP, Jones AM, Ketchell I, Gill RT, Mahenthiralingam E (2008) Gene expression changes linked to antimicrobial resistance, oxidative stress, iron depletion and retained motility are observed when *Burkholderia cenocepacia* grows in cystic fibrosis sputum. *Bmc Infectious Diseases* **8**: -
- Evans JD (2004) Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* **85**(2): 105-111
- Evans JD, Armstrong TN (2006) Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecol* **6**: 4
- Evans JD, Pettis JS (2005) Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. *Evolution* **59**(10): 2270-2274
- Figueiredo MD, Salter CE, Andrietti AL, Vandenplas ML, Hurley DJ, Moore JN (2009) Validation of a reliable set of primer pairs for measuring gene expression by real-time quantitative RT-PCR in equine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* **131**(1-2): 65-72
- Frees D, Qazi SNA, Hill PJ, Ingmer H (2003) Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. *Molecular Microbiology* **48**(6): 1565-1578
- Fries I, Lindstrom A, Korpela S (2006) Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Vet Microbiol* **114**(3-4): 269-274
- F nfhaus A, Borriss, Genersch (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. *Environmental Microbiology Reports* **1**: 240-250
- Gaillot O, Pellegrini E, Bregenholt S, Nair S, Berche P (2000) The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* **35**(6): 1286-1294
- Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissiere BE (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* **68**(3): 810-821

- Genersch E (2008) *Paenibacillus larvae* and American Foulbrood - long since known and still surprising. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* **3**: 429-434
- Genersch E (2010) American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**: S10-19
- Genersch E, Ashiralieva A, Fries I (2005) Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Appl Environ Microbiol* **71**(11): 7551-7555
- Genersch E, Forsgren E, Pentikainen 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**(Pt 3): 501-511
- Gochnauer TA (1973) Growth, Protease Formation, and Sporulation of *Bacillus-Larvae* in Aerated Broth Culture. *Journal of Invertebrate Pathology* **22**(2): 251-257
- Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**(6): 1089-1097
- Hansen H, Brodsgaard CJ (1999) American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* **80**: 5-23
- 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*. *Int J Syst Bacteriol* **46**(1): 270-279
- 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. *Journal of Apicultural Research* **37**: 267-271
- Hornitzky MAZ, Nicholls PJ (1993) J-Medium Is Superior to Sheep Blood Agar and Brain Heart Infusion Agar for the Isolation of *Bacillus-Larvae* from Honey Samples. *Journal of Apicultural Research* **32**(1): 51-52
- Hornitzky MAZ, Wilson SC (1989) A System for the Diagnosis of the Major Bacterial Brood Diseases of Honeybees. *Journal of Apicultural Research* **28**(4): 191-195
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* **6**(4): 279-284
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **345**(2): 646-651
- Jandu N, Ho NKL, Donato KA, Karmali MA, Mascarenhas M, Duffy SP, Taylor C, Sherman PM (2009) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Gene Expression Profiling in Response to Growth in the Presence of Host Epithelia. *Plos One* **4**(3): -
- Jian B, Liu B, Bi YR, Hou WS, Wu CX, Han TF (2008) Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *Bmc Molecular Biology* **9**: -
- Julian GS, Bulla LA, Jr. (1971) Physiology of sporeforming bacteria associated with insects. IV. Glucose catabolism in *Bacillus larvae*. *J Bacteriol* **108**(2): 828-834
- Kar NP, Sikriwal D, Rath P, Choudhary RK, Batra JK (2008) *Mycobacterium tuberculosis* ClpC1. *Febs Journal* **275**(24): 6149-6158
- Katznelson H (1950) *Bacillus pulvifaciens* (N. SP.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *J Bacteriol* **59**(2): 153-155
- Keller NP, Turner G, Bennett JW (2005) Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* **3**(12): 937-947
- Kochansky A, Pettis J (2005) Screening additional antibiotics for efficacy against American foulbrood. *Journal of Apicultural Research* **44**(1): 24-28

- Kojetin DJ, McLaughlin PD, Thompson RJ, Dubnau D, Prepiak P, Rance M, Cavanagh J (2009) Structural and Motional Contributions of the Bacillus subtilis ClpC N-Domain to Adaptor Protein Interactions. *Journal of Molecular Biology* **387**(3): 639-652
- Kruger E, Witt E, Ohlmeier S, Hanschke R, Hecker M (2000) The Clp proteases of Bacillus subtilis are directly involved in degradation of misfolded proteins. *Journal of Bacteriology* **182**(11): 3259-3265
- Lee H, Churey JJ, Worobo RW (2009) Isolation and characterization of a protective bacterial culture isolated from honey active against American Foulbrood disease. *Fems Microbiology Letters* **296**(1): 39-44
- Lindstrom A, Korpela S, Fries I (2008a) The distribution of Paenibacillus larvae spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (Apis mellifera) colonies. *Journal of Invertebrate Pathology* **99**(1): 82-86
- Lindstrom A, Korpela, S., Fries, I. (2008b) Horizontal transmission of Paenibacillus larvae spores between honey bee (Apis mellifera) colonies through robbing. *Apidologie* **39**: 1-8
- Liu YH, Ream A (2008) Gene Expression Profiling of Listeria monocytogenes Strain F2365 during Growth in Ultrahigh-Temperature-Processed Skim Milk. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(22): 6859-6866
- Luong TT, Sau K, Roux C, Sau S, Dunman PM, Lee CY (2011) Staphylococcus aureus ClpC Divergently Regulates Capsule via sae and codY in Strain Newman but Activates Capsule via codY in Strain UAMS-1 and in Strain Newman with Repaired saeS. *Journal of Bacteriology* **193**(3): 686-694
- Maroufi A, Van Bockstaele E, De Loose M (2010) Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (Cichorium intybus) using quantitative real-time PCR. *Bmc Molecular Biology* **11**: -
- Mattinen L, Somervuo P, Nykyri J, Nissinen R, Kouvonen P, Corthals G, Auvinen P, Aittamaa M, Valkonen JPT, Pirhonen M (2008) Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen Pectobacterium atrosepticum. *Microbiology-Sgm* **154**: 2387-2396
- McCleskey CS, Melampy RM (1939) Bactericidal properties of royal jelly of the honeybee. *Journal of economic entomology* **32**: 581-587
- Mohr KI, Tebbe CC (2006) Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology* **8**(2): 258-272
- Morse RA, Calderon (2000) The value of honey bee pollination in the United States. *Bee Cult* **128**: 1-15
- Nair S, Milohanic E, Berche P (2000) ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of Listeria monocytogenes. *Infection and Immunity* **68**(12): 7061-7068
- 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* **150**(Pt 7): 2381-2390
- Nordstrom S, Fries I (1995) A comparison of media and cultural conditions for identification of Bacillus larvae in honey. *Journal of Apicultural Research* **34**(2): 97-103
- Olsen PE, Grant GA, Nelson DL, Rice WA (1990) Detection of American Foulbrood Disease of the Honeybee, Using a Monoclonal-Antibody Specific to Bacillus-Larvae in an Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay. *Canadian Journal of Microbiology* **36**(10): 732-735
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* **26**(6): 509-515
- Predich M, Nair G, Smith I (1992) Bacillus-Subtilis Early Sporulation Genes Kina, Spo0f, and Spo0a Are Transcribed by the Rna-Polymerase Containing Sigma-H. *Journal of Bacteriology* **174**(9): 2771-2778
- Qin X, Evans JD, Aronstein KA, Murray KD, Weinstock GM (2006) Genome sequences of the honey bee pathogens Paenibacillus larvae and Ascosphaera apis. *Insect Mol Biol* **15**(5): 715-718
- Randolt K, Gimple O, Geissendorfer J, Reinders J, Prusko C, Mueller MJ, Albert S, Tautz J, Beier H (2008) Immune-Related Proteins Induced in the Hemolymph After Aseptic and Septic Injury Differ in Honey Bee Worker Larvae and Adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **69**(4): 155-167

- 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**(10): 3344-3347
- Reva O, Tumbler B (2008) Think big--giant genes in bacteria. *Environ Microbiol* **10**(3): 768-777
- Robertson GT, Ng WL, Foley J, Gilmour R, Winkler ME (2002) Global transcriptional analysis of *clpP* mutations of type 2 *Streptococcus pneumoniae* and their effects on physiology and virulence. *Journal of Bacteriology* **184**(13): 3508-3520
- Scharlaken B, de Graaf DC, Goossens K, Peelman LJ, Jacobs FJ (2008) Differential gene expression in the honeybee head after a bacteria challenge. *Developmental and Comparative Immunology* **32**(8): 883-889
- Schmidt H, Hensel M (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* **17**(1): 14-+
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**(3): 775-+
- Schotanus A (2009) Bloedernstig. *Maandblad van de Vlaamse imkersbond* **3**: 14-16
- Shapiro-Ilan DI, Fuxa JR, Lacey LA, Onstad DW, Kaya HK (2005) Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* **88**(1): 1-7
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* **75**(2-3): 291-295
- Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B (2002) How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology* **5**(1): 102-110
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**(7): RESEARCH0034
- vanEngelsdorp D, Meixner MD (2010) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**: S80-S95
- Waddell SJ, Butcher PD, Stoker NG (2007) RNA profiling in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology* **10**(3): 297-302
- Woodrow (1942) Susceptibility of honeybee larvae to individual inoculations with spores of *Bacillus larvae*. *Journal of economic entomology* **35**: 892-895
- Wyatt GR (1961) Biochemistry of Insect Hemolymph. *Annual Review of Entomology* **6**: 75-&
- Yamamoto T, Sashinami H, Takaya A, Tomoyasu T, Matsui H, Kikuchi Y, Hanawa T, Kamiya S, Nakane A (2001) Disruption of the genes for ClpXP protease in *Salmonella enterica* serovar typhimurium results in persistent infection in mice, and development of persistence requires endogenous gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity* **69**(5): 3164-3174
- 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**(6): 1612-1620

Bijlagen

1. Medium

De samenstelling en de pH van de drie media die gebruikt werden, worden weergegeven in onderstaande Tabel.

Tabel: Samenstelling van J-, MYPGP- en BHIT-agar. dH₂O = gedistilleerd water.

J-agar	g/l d H₂O	MYPGP-agar	g/l d H₂O	BHIT-agar	g/l d H₂O
Tryptone	5	Mueller-Hinton	10	Brain Heart Infusion	17,5
Yeast extract	15	Yeast extract	15	Tryptone	10
K ₂ HPO ₄	3	K ₂ HPO ₄	3	Glucose	2
Glucose	2	Natriumpyruvaat	1	NaCl	5
Agar	20	Glucose	2	Na ₂ HPO ₄	2,5
		Agar	20	Agar	20
				Thiamine HCl	0,0001
	pH		pH		pH
	7.3-7.5		7.1		6.6