

Zusammenfassung

Die Amerikanische Faulbrut ist die weit verbreitetste bakterielle Brutkrankheit der Honigbiene, die von dem GRAM-positiven und sporenbildenden Bakterium *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*) ausgelöst wird, und somit eine Bedrohung für die Honigbiene darstellt. Daher ist es umso wichtiger, die Pathogenese der Amerikanischen Faulbrut auf molekularer Ebene zwischen Wirt und Pathogen zu verstehen und Lösungsstrategien zur Bekämpfung der Krankheit zu finden.

Das Pathogen *P. larvae* wird in fünf verschiedene *Enterobacterial-Repetitive-Intergenic-Consensus*-Genotypen (ERIC-Genotypen) unterteilt, wobei die Typen ERIC I und ERIC II von epidemiologischer Relevanz sind. Aufgrund der unterschiedlichen Zeitverläufe der Virulenz sowie des unterschiedlichen genomischen und metabolischen Aufbaus beider Typen verfolgen diese jeweils andere Virulenzstrategien. Bisherige Studien haben gezeigt, dass einige Enzyme wie das Chitin-abbauende Enzym und AB-Toxine als Virulenzfaktoren von *P. larvae* fungieren. Auch Sekundärmetabolite können eine Rolle als Virulenzfaktoren spielen. *P. larvae* ERIC II produziert ein noch unbekanntes und vier bereits bekannte Sekundärmetaboliten (Bacillibactin, Sevadicin, Paenilamicin, Paenilarvin), die allesamt über nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) hergestellt werden. Die hier vorliegende Arbeit behandelt zunächst die Modifizierung von Paenilamicin durch die Gcn5-verwandte *N*-Acetyltransferase PamZ, welche dem Biosynthese-Gencluster von Paenilamicin zugehörig ist. Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit liegt in der Strukturaufklärung der letzten unbekanntes, durch NRPS synthetisierten Verbindung aus *P. larvae* ERIC II. Abschließend werden die potenziellen Funktionen von *P. larvae* im Zusammenhang mit dessen Sekundärmetaboliten in Bezug auf die ökologische Nische für beide Themenkomplexe im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausführlich diskutiert.

Paenilamicin ist ein kationisches, lineares und potentes Peptidantibiotikum, welches insbesondere gegen GRAM-positive Bakterien und Pilze wirkt. *P. larvae* produziert diese Verbindung, um seine ökologische Nische zu verteidigen, und hat zum Eigenschutz einen Selbstresistenz-Mechanismus entwickelt. In diesem deaktiviert PamZ das Peptidantibiotikum Paenilamicin durch eine *N*-Acetylierung und fungiert dabei als Selbstresistenz-Faktor. Mithilfe der Tandem-Massenspektrometrie und 2D-Kernspinresonanzspektroskopie wurde in dieser Arbeit die regioselektive *N*-Acetylierung an der N-terminalen Aminogruppe der Agmatin-Säure (Aga) bestimmt. Zusätzlich wurde die stereoselektive *N*-Acetylierung mithilfe synthetischer Diastereomere von Paenilamicin B2 bestätigt. In einem Ribosomen-Inhibitionstest konnte zum einen Paenilamicin als Inhibitor und zum anderen eine deutlich verminderte Inhibition durch die *N*-Acetylierung gezeigt werden. Die vorliegenden Ergebnisse heben das Pharmakophor von Paenilamicin hervor. Um tiefere Einblicke in das aktive Zentrum des Selbstresistenz-Faktors PamZ zu bekommen, wurde weiterhin die Kristallstruktur bei einer Auflösung von 1.34 Å als binärer Komplex mit Acetyl-CoA gelöst. Die Substratbindungstasche wies einige charakteristische, negativ-geladene Aminosäurereste auf, die potenziell mit dem kationischen Peptidantibiotikum Paenilamicin interagieren können. Für die weitere Untersuchung des Selbstresistenz-Mechanismus wurde eine Metabolom-Analyse von *P. larvae* ERIC II und der dazugehörigen Deletionsmutante *P. larvae* ERIC II Δ pamZ nach dem Zellaufschluss durchgeführt. Diese zeigten, dass Paenilamicin durch PamZ in der Zelle umgesetzt wird und das resultierende *N*-Acetylpae nilamicin in der Zelle akkumuliert. Des Weiteren wiesen bioinformatische Analysen dieser Arbeit darauf hin, dass der Biosynthese-Gencluster von Paenilamicin einen zusätzlichen Prodrug-Resistenz-Mechanismus besitzt, der vermutlich die N-terminale Aminogruppe

mit einer *N*-Acyl-D-Asparagin-Einheit maskiert. Im Rückschluss wird aus diesen Ergebnissen ein doppelter Resistenzmechanismus für dessen selbstproduziertes Paenilamicin postuliert.

Weiterführend wurde auch die unbekannt, NRPS-abstammende Verbindung hinsichtlich ihres potenziellen Einflusses auf die Virulenz und Pathogenität untersucht und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass es sich um ein 2,5-Diisopropylpyrazin handelte, welches durch das NRPS-ähnliche Protein StAM hergestellt wird. Dieses Protein besteht aus einer C-terminalen Kondensations-, einer Adenylierungs-, einer Thiolierungs- und einer Reduktionsdomäne. Pyrazine sind als flüchtige organische Verbindungen bekannt, die zur Kommunikation über große Distanzen zwischen Bakterien dienen. 2,5-Diisopropylpyrazin wurde im heterologen Produktionsstamm *E. coli* hergestellt und anschließend die chemische Struktur der Verbindung über Tandem-Massenspektrometrie und 2D-Kernspinresonanzspektroskopie charakterisiert. Die Sekretome von *P. larvae* ERIC II und der dazugehörigen Deletionsmutante *P. larvae* ERIC II Δ *stam* bestätigten die Existenz von 2,5-Diisopropylpyrazin. Die dazugehörige Biosynthese wurde mit StAM und dem nativen Substrat L-Valin *in vitro* rekonstituiert. Die symmetrische Struktur von 2,5-Diisopropylpyrazin deutete auf eine Biosynthese mit einer Dimerisierung von zwei Einheiten L-Valin hin, welche durch einen dimeren Zustand von StAM erfolgen könnte. Erste Ergebnisse konnten für diesen Zustand mittels Größenausschlusschromatographie-Mehrwinkel-Lichtstreuung (SEC-MALS) und *Crosslinking*-Interaktionsexperimente gezeigt werden. Des Weiteren wiesen bioinformatische Analysen darauf hin, dass das Gen *stam* in der Gattung *Paenibacillus* weitestgehend konserviert vorliegt, aber auch ein weiteres, benachbartes Gen, welches für ein Methyl-akzeptierendes Chemotaxis-Protein (MCP) kodiert. Diese Erkenntnis wirft Fragen in Bezug auf die Rolle und Funktion sowie das *Target* von 2,5-Diisopropylpyrazin in *P. larvae* auf und wird näher erläutert.

Abstract

The devastating honey bee disease American Foulbrood is the most widespread and destructive brood disease caused by the honey bee larvae pathogen *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*), a GRAM-positive and spore-forming bacterium, and poses a serious threat to the honey bees. Hence, it is important to understand American Foulbrood on molecular level including host-pathogen interactions and to find strategies to combat this disease.

This pathogen is classified in five different enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) genotypes, in which ERIC I and ERIC II are of epidemiologic importance. Due to their different killing time in terms of virulence as well as their different genomic and metabolomic setup, the genotypes ERIC I and ERIC II follow different virulence strategies. Previous studies have demonstrated that a few enzymes such as the chitin-degrading enzyme and AB toxins are virulence factors of *P. larvae*. Besides, secondary metabolites are also well-known to act as virulence factors. *P. larvae* ERIC II produces one currently unknown and four already known secondary metabolites derived from non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) such as bacillibactin, sevadicin, paenilamicin and paenilarvin. This work addresses firstly the modification of paenilamicin by the Gcn5-related *N*-acetyltransferase PamZ harbored in the biosynthetic gene cluster of paenilamicin and secondly the structure elucidation of the unknown NRPS-derived compound from *P. larvae* ERIC II. Their potential roles and functions of *P. larvae* related to its secondary metabolites will be discussed in context of the ecological niche for both cases thoroughly.

Paenilamicin is a highly active antibiotic, particularly against GRAM-positive bacteria and fungi, and presumably used to protect the ecological niche of *P. larvae*. Thus, *P. larvae* must have developed a mechanism to protect itself against the self-produced antibiotic. PamZ acts as self-resistance factor by modifying and deactivating the self-produced antibiotic, paenilamicin. Tandem mass spectrometry and 2D nuclear magnetic spectroscopy revealed the regioselective *N*-acetylation at the N-terminal half of paenilamicin, particularly at the N-terminal amino group of the agmantinamic acid (Aga). In addition, stereoselective *N*-acetylation was confirmed by using synthetic diastereomers of paenilamicin B2. These results emphasize the pharmacophore region of paenilamicin potentially inhibiting the bacterial ribosome which has been shown in a cell-free system including a ribosome derived from *E. coli*. To gain more insights into the active site of the resistance factor PamZ, its structure was solved at a resolution of 1.34 Å in a binary complex with acetyl-CoA by X-ray crystallography. The substrate-binding pocket contains several characteristic, negatively-charged residues potentially interacting with the cationic aminopolyol peptide antibiotic paenilamicin. The metabolome analysis of *P. larvae* ERIC II and the corresponding deletion mutant *P. larvae* ERIC II Δ pamZ after cell disruption suggested the conversion of paenilamicin by PamZ and the accumulation of *N*-acetylpaenilamicin in the cell, respectively. Bioinformatic analysis has further indicated that the biosynthetic gene cluster also encodes for a prodrug resistance mechanism which similarly relies on masking the N-terminal amino group with an *N*-acyl-D-asparagine cap. Conclusively, a dual-resistance strategy of *P. larvae* was proposed against its own antibiotic agent specifically addressing the pharmacophore region.

Due to the high potential of secondary metabolites involved in virulence and pathogenesis, the unknown NRPS-derived compound was revealed as 2,5-diisopropylpyrazine produced by the

NRPS-like protein termed StAM, which consists of a C-terminal condensation, an adenylation, a thiolation and a reduction domain. This volatile organic compound is generally known for long-distance communication in bacterial interactions. It was produced heterologously in *E. coli* as well as confirmed by tandem mass spectrometry and 2D nuclear magnetic spectroscopy. The secretome of *P. larvae* ERIC II and the corresponding deletion mutant *P. larvae* ERIC II Δ *stam* approved the existence of 2,5-diisopropylpyrazine. The corresponding biosynthesis was reconstituted by using StAM and the native substrate L-valine *in vitro*. Due to its symmetric structure of 2,5-diisopropylpyrazine, a biosynthesis route was proposed including a dimerization of two units of L-valine that potentially requires StAM as a dimer. First evidence of the dimeric state could be achieved by using size exclusion chromatography-multi angle light scattering (SEC-MALS) and crosslinking interaction experiments, but the state needs to be further investigated and verified. Additional bioinformatic analysis have not only revealed that the *stam* gene is highly conserved within the genus *Paenibacillus* but also a gene encoding a methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) located adjacent to *stam*. This finding has raised questions about the role and function, but also the target of 2,5-diisopropylpyrazine in *P. larvae*.