

Aus dem

Department für Diagnostische Labormedizin der  
Universität Tübingen  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

***Galleria mellonella* als Replacementorganismus:  
Immune Priming bei *Salmonella enterica*  
Serovar Typhimurium - Infektionen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Gronowski, Jasper Maximilian  
2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Wagner, Ph.D.

2. Berichterstatterin: Professorin Dr. S. M. Bélard, Ph.D.

Tag der Disputation: 26.09.2025

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabellenverzeichnis</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>1 Einleitung</b> .....   | <b>7</b>  |
| 1.1 <i>Galleria mellonella</i> .....  | 7         |
| 1.2 Immunsystem der <i>G. mellonella</i> .....                                    | 8         |
| 1.3 <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium.....                           | 11        |
| 1.4 Immune Priming .....  | 14        |
| 1.5 Forschungsfragen.....   | 15        |
| <b>2 Material und Methoden</b> .....  | <b>17</b> |
| 2.1 Materialien .....   | 17        |
| 2.1.1 Organismus – <i>G. mellonella</i> : Anzucht und Monitoring.....             | 17        |
| 2.1.2 Bakterienstamm – S. Typhimurium.....  | 17        |
| 2.1.3 Geräte und Hilfsmittel .....  | 19        |
| 2.1.4 Programme/ Software .....   | 19        |
| 2.1.5 Verbrauchsmaterialien .....   | 19        |
| 2.1.6 Puffer, Medien, Reagenzien und Primer.....                                  | 20        |
| 2.2 Methoden.....   | 23        |
| 2.2.1 Systemische Infektion der <i>G. mellonella</i> .....                        | 23        |
| 2.2.2 Titration der Infektionsdosis .....   | 23        |
| 2.2.3 Abnahme von Hämolymphe der <i>G. mellonella</i> .....                       | 23        |
| 2.2.4 Immune Priming der <i>G. mellonella</i> mit S. Typhimurium.....             | 24        |
| 2.2.5 Survival - Analyse von <i>G. mellonella</i> .....                           | 25        |
| 2.2.6 Quantifizierung von S. Typhimurium in <i>G. mellonella</i> -Hämolymphe..... | 26        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.2.7    | Hemmstofftest zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen in <i>G. mellonella</i> -Hämolymphe.....  | 27        |
| 2.2.8    | Analyse von immunrelevanten Genexpressionen in <i>G. mellonella</i> durch die qRT-PCR .....  | 28        |
| 2.2.9    | Bestimmung der Hämozytenzahl in der <i>G. mellonella</i> -Hämolymphe mittels Lichtmikroskopie.....   | 33        |
| 2.2.10   | Statistische Mittel und Visualisierung .....   | 34        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>35</b> |
| 3.1      | Infektion: Die Letalität der <i>G. mellonella</i> ist abhängig von der <i>S. Typhimurium</i> Injektionsdosis .....   | 35        |
| 3.2      | Survival-Analyse: <i>G. mellonella</i> mit Immune Priming überleben.....   | 36        |
| 3.3      | Quantifizierung: <i>S. Typhimurium</i> kann in <i>G. mellonella</i> mit Immune Priming nicht proliferieren.....  | 37        |
| 3.4      | Hemmstofftest: Die Hämolymphe der <i>G. mellonella</i> mit Immune Priming hemmt die Proliferation von Bakterien .....  | 40        |
| 3.5      | Genregulation nach Infektion: Die Injektion von <i>S. Typhimurium</i> in <i>G. mellonella</i> -Hämocoel bewirkt eine differentielle Expression antimikrobiell wirksamer Substanzen ..... | 42        |
| 3.6      | Immune Priming beeinflusst die Anzahl der Immunzellen in <i>G. mellonella</i> -Hämolymphe.....   | 48        |
| 3.6.1    | PBS in <i>G. mellonella</i> -Hämocoel induziert nicht den Anstieg der Hämozytenanzahl .....  | 49        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>52</b> |
| 4.1      | Überleben der <i>G. mellonella</i> nach <i>S. Typhimurium</i> Infektion .....  | 52        |
| 4.2      | Überleben der <i>G. mellonella</i> mit Immune Priming.....   | 53        |
| 4.3      | Effektive Clearance der <i>S. Typhimurium</i> .....  | 53        |
| 4.4      | Bakterizide Wirkung der Hämolymphe in vitro.....   | 54        |
| 4.5      | Zelluläre Abwehr - Hämozyten .....   | 56        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.6      | Gesteigerte RNA-Expression immunrelevanter Proteine .....                    | 60        |
| 4.7      | Trained Immunity und Immune Priming .....                                    | 66        |
| 4.8      | <i>G. mellonella</i> als Ersatzmodell – Begrenztheit und Möglichkeiten ..... | 68        |
| <b>5</b> | <b>Fazit und Perspektiven.....</b>   | <b>72</b> |
| 5.1      | Immune Priming und Überlebensvorteil .....                                   | 72        |
| 5.2      | Molekulare Mechanismen des Immune Priming.....                               | 72        |
| 5.3      | Zelluläre Immunantwort .....   | 73        |
| 5.4      | <i>G. mellonella</i> als alternatives In-vivo-Modell .....                   | 73        |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>75</b> |
| <b>7</b> | <b>Literaturverzeichnis: .....</b>   | <b>77</b> |
| <b>8</b> | <b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b>  | <b>84</b> |
| <b>9</b> | <b>Danksagung .....</b>  | <b>85</b> |

## **Tabellenverzeichnis**

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Verwendete Geräte .....                                       | 19 |
| Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....                                   | 20 |
| Tabelle 3: Reagenzien .....  | 20 |
| Tabelle 4: Kits .....  | 21 |
| Tabelle 5: Substratherstellung für G. mellonella .....                   | 21 |
| Tabelle 6: Primerliste .....   | 22 |
| Tabelle 7: Versuchsaufbau Doppelstimulation.....                         | 24 |
| Tabelle 8: Versuchsaufbau Einfache Stimulation .....                     | 25 |
| Tabelle 9: Versuchsaufbau Genexpression bei zweifacher Stimulation ..... | 29 |
| Tabelle 10: Mastermix.....   | 31 |
| Tabelle 11: Programm qRT-PCR.....  | 31 |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Übersicht der Methodik.....  | 25 |
| Abbildung 2: Berechnung der Genexpression .....   | 32 |
| Abbildung 3: Dosisabhängiges Überleben von <i>G. m.</i> -Larven nach systemischer Infektion mit <i>S. T.</i> .....  | 36 |
| Abbildung 4: Survival-Analyse von <i>G. mellonella</i> nach systemischer Injektion einer subletalen und letalen Dosis von <i>S. Typhimurium.</i> .....  | 37 |
| Abbildung 5: CFU aus <i>G. mellonella</i> -Hämolymphe nach einfacher oder zweifacher systemischer Infektion mit <i>S. Typhimurium.</i> .....  | 39 |
| Abbildung 6: Hemmstofftest nach Kundrat zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen in der <i>G. mellonella</i> Hämolymphe nach einfacher oder zweifacher Infektion mit <i>S. Typhimurium.</i> ..... | 41 |
| Abbildung 7: <i>S. Typhimurium</i> induzierte RNA-Expressionen in <i>G. mellonella</i> der Gene für Cecropin, Galiomycin und Gallerimycin im Zeitverlauf. ....  | 45 |
| Abbildung 8: <i>S. Typhimurium</i> induzierte RNA-Expressionen in <i>G. mellonella</i> der Gene für Hemolin, IMPI und Gloverin im Zeitverlauf. ....   | 46 |
| Abbildung 9: <i>S. Typhimurium</i> induzierte RNA-Expressionen in <i>G. mellonella</i> der Gene für Lysozym, NOS, und Apolipophorin im Zeitverlauf. ....  | 47 |
| Abbildung 10: Bestimmung der Hämozytenzahl in <i>G. mellonella</i> -Hämolymphe nach einfacher und zweifacher Infektion mit <i>S. Typhimurium.</i> .....   | 49 |
| Abbildung 11: Vergleich der <i>G. mellonella</i> -Hämozytenzahl bei Injektion mit PBS und Punktion des Hämocoel. ....   | 51 |

## Abkürzungsverzeichnis

|              |  |
|--------------|--|
| AMP          | Antimikrobielles Peptid                                      |
| BCP          | 1-Bromo-3-chloropropan                                       |
| CFU          | Colony Forming Unit  |
| Ct           | Cycle threshold  |
| DNA          | Desoxyribonukleinsäure                                       |
| <i>G. m.</i> | <i>Galleria mellonella</i>                                   |
| GST          | Glutathion-S-Transferase                                     |
| IMPI         | Insekten-Metalloproteinase-Inhibitor                         |
| IPS          | Insektenphysiologische Kochsalzlösung                        |
| LB           | Luria-Bertani-Medium   |
| LPS          | Lipopolysaccharide   |
| MAMP         | Mikroben-assoziierte molekulare Muster                       |
| NOS          | Stickoxidsynthase  |
| PAMP         | Pathogen-assoziierte molekulare Muster                       |
| PBS          | Phosphat-gepufferte Salzlösung                               |
| PCR          | Polymerase Kettenreaktion                                    |
| qRT-PCR      | Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion |
| RNA          | Ribonukleinsäure   |
| RT           | Raumtemperatur   |
| <i>S. T.</i> | <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium               |

# 1 Einleitung

## 1.1 *Galleria mellonella*

*Galleria mellonella* (*G. m.*), die Große Wachsmotte aus der Familie der *Lepidoptera*, hat sich zu einem erfolgreichen und zuverlässigen Wirtsmodell unter den Insekten entwickelt (Mukherjee et al., 2014). Der Einsatz des wirbellosen Organismus *G. m.* im Larvenstadium findet in der Wissenschaft zunehmend an Bedeutung, da er zahlreiche experimentelle Vorteile bietet. *G. m.* kann unter einfachen Laborbedingungen gezüchtet werden und ist durch eine kurze Reproduktionszeit frühzeitig vor der Verpuppung für Experimente verfügbar. Zusätzlich ermöglicht die Größe der Larven eine einfache Handhabung, die mühelose Injektion von Pathogenen (Inokulation) und die Entnahme von Hämolymphe. Überdies toleriert *G. m.* eine Temperatur von 37°C, was die Nachahmung der thermalen Bedingungen im menschlichen Körper ermöglicht und somit die Relevanz für die Erforschung humanpathogener Prozesse erhöht (Wu et al., 2014). Auf Grund dieser Eigenschaften erweist sich *G. m.* als ein zeit- und kostensparendes Versuchsmodell in der Erforschung bakterieller Pathogenesen (Brennan et al., 2002). Darüber hinaus stellt *G. m.* als wirbelloser Organismus eine ethisch vertretbare Alternative zu Experimenten an Wirbeltieren dar (Mukherjee et al., 2014). Außerdem wurde das Genom von *G. m.* bereits sequenziert und von Lange et al. (2018) veröffentlicht. Dies ermöglicht die differentielle Genexpression nach Inokulation in *G. m.* zu untersuchen, um beispielsweise Homologien zu Wirbeltieren zu identifizieren (Lange et al., 2018). In vorangehenden Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Virulenz einiger humaner Pathogene in *G. m.* positiv mit der in Mäusen und Makrophagen korreliert (Brennan et al., 2002, Wand et al., 2011) und dass die Ergebnisse der Infektion durch die Injektion der Pathogene direkt in die Hämolymphe Homologien mit denen ähnlicher Studien an Säugetieren aufweisen (Barros et al., 2019).

*G. m.* Larven werden bereits vielfältig eingesetzt: Sie eignen sich für das schnelle Screening neuartiger Bakterien, die Untersuchung antimikrobieller Wirksamkeit, die Bestimmung der Toxizität von Medikamenten und als Bioindikator für die

mikrobielle Qualität von Wasser (Barros et al., 2019, Hernandez et al., 2019). Durch die Infektion von *G. m.* mit humanpathogenen Erregern wie *Pseudomonas aeruginosa* (Benthall et al., 2015, Chadwich, 1971, Koch et al., 2014), *Enterococcus faecium* (Lebreton et al., 2011), *Staphylococcus aureus* (Gibreel et al., 2013), *Streptococcus pyogenes* (Loh et al., 2013) und *Candida albicans* (Jacobsen, 2014) konnte die Virulenz dieser Erreger weiter charakterisiert werden. Darüber hinaus kann *G. m.* zur Untersuchung der angeborenen Abwehrreaktionen auf Krankheitserreger verwendet werden, da das angeborene Immunsystem von *G. m.* Parallelen, mit dem der Wirbeltiere und des Menschen aufweist, wie es nachfolgend ausführlicher beschrieben wird.

## **1.2 Immunsystem der *G. mellonella***

Ein interessantes Merkmal des Immunsystems von Insekten ist, dass es im Vergleich zu Wirbeltieren keine spezifische Immunantwort auf Pathogene, basierend auf Lymphozyten und Immunglobulinen, besitzt (Ratcliffe, 1985). Das angeborene Immunsystem verfügt über in der Keimbahn kodierte Faktoren zur Identifizierung und Abtötung von Fremdkörpern. Das erworbene Immunsystem indessen bildet durch somatische Rekombination Immunzellrezeptoren und Immunglobuline zur hochspezifischen Erkennung von Antigenen und schafft die Grundlage für die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses (Lavine et al., 2002). Das bedeutet, dass der Abwehrreaktion von Invertebraten die hohe Spezifität von Vertebraten fehlt (Boman et al., 1987). Dennoch ist das Immunsystem der Invertebraten aufgrund schnell mobilisierbarer und effektiver humoraler und zellulärer Komponenten und ihrer komplexen Interaktion äußerst effizient (Ratcliffe, 1985, Mowlds et al., 2010, Vilmos et al., 1998). Die Körperhöhle der Insekten wird als Hämocoel bezeichnet. Darin befindet sich die Hämolymphe, die funktionell mit dem Blut der Wirbeltiere vergleichbar ist. Sie transportiert Nährstoffe, Abfallprodukte und Signalmoleküle (Bergin et al., 2003). Außerdem enthält sie zelluläre Bestandteile, die Hämocyten, und humorale Bestandteile, wie antimikrobielle Peptide (AMP), wodurch das Immunsystem in der Lage ist den Organismus vor Eindringlingen zu schützen (Bergin et al., 2003).

Die Abwehrzellen der *G. m.*, die Hämozyten, können in verschiedene Typen unterteilt werden. Dazu gehören unter anderen die Plasmatozyten und die Granulozyten. Diese stimulieren die Interaktion zwischen Immunzellen und Fremdkörpern und sind am Prozess der Phagozytose beteiligt (Tojo et al., 2000). Ein Teil der Hämozyten zirkulieren frei im Hämocoel, während die Mehrzahl in Organen wie dem Fettkörper und dem Darm stationiert sind und bei Entzündungsgeschehen mobilisiert werden können (Ratcliffe, 1985). Die Verkapselung stellt neben der Phagozytose einen weiteren wichtigen Verteidigungsmechanismus bei Infektionen dar. Parasiten oder eine große Anzahl an Mikroorganismen, die in den Organismus eindringen und für die phagozytierenden Zellen zu groß sind, können durch den Mechanismus der Verkapselung mit mehrschichtigen Hüllen aus Zellverbänden isoliert werden. Durch diesen komplexen und interaktiven Prozess ist es möglich innerhalb kürzester Zeit eine große Anzahl von Bakterien vor dem Kreislauf abzuschirmen. Toxische Produkte sorgen dann für die Abtötung des Kapselinhalts (Ratcliffe, 1985). Darüber hinaus, ähnlich wie die Neutrophilen bei Wirbeltieren, sind Hämozyten von *G. m.* nach einer Injektion von Bakterien in der Lage sogenannte Extracellular Traps (ET), in Form von extrazellulären Geflechten aus DNA und toxischen Granula-Inhalten zu produzieren, um den Organismus vor einer bakteriellen Infektion zu schützen (Chen et al., 2021). Als zusätzliche Reaktion des Immunsystems können eindringende Pathogene im Rahmen der enzymatischen Melanisierung von einer Melaninschicht überzogen werden. Es entsteht ein dunkles, den Erreger umhüllendes Proteingeflecht. In dieser Isolation werden die Erreger durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Nahrungskarenz abgetötet oder können phagozytiert oder durch die Nodulation vernichtet werden. Dabei werden viele Enzyme und Pattern Recognition Receptors der Melanisierungsreaktionen von den Hämozyten gebildet (Hillyer, 2016). Diese Melanisierung kann bei einer letalen Infektion der *G. m.* mit *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*S. T.*) makroskopisch beobachtet werden. Die Larven verfärben sich mit der Zeit von weiß bis gräulich-schwarz, woraufhin sie versterben. Bei dem Prozess der Nodulation (Knötchenbildung) können ebenfalls große Anhäufungen von Bakterien durch Hämozyten und deren Degranulation

gebunden und umhüllt werden. Die dabei entstehende Bakterienaggregate melanisieren zu knotenähnlichen Strukturen (Hillyer, 2016).

Zu der humoralen Immunantwort gehört die durch eine Infektion induzierte Bildung von Abwehrmolekülen, die Gerinnung der Hämolymphe und der Mechanismus der Wundheilung (Dekkerová-Chupáčová et al., 2018). Da Insekten ausschließlich auf das angeborene Immunsystem angewiesen sind, müssen die dazugehörigen antimikrobiell wirksame Substanzen (wie AMPs) der humoralen Immunantwort sehr effizient sein (Bolouri Moghaddam et al., 2016). AMPs wirken häufig gegen ein breites Spektrum an Mikroben und verhindern eine Infektion (Barros et al., 2019). Zu den Wirkmechanismen der AMPs gehören die Störung der Membranintegrität der mikrobiellen Zellwand und die Suppression intrazellulärer Prozesse einschließlich der Proteinbiosynthese und DNA-Synthese der Pathogene. Insekten produzieren strukturell und funktionell unterschiedliche antimikrobiell wirksame Substanzen. Dabei ermöglicht deren Kombination molekulare Wechselwirkungen und erhöht die Effektivität und Robustheit der AMPs und eine im Kollektiv erfolgreiche Bekämpfung der Pathogene (Bolouri Moghaddam et al., 2016).

*G. m.* bildet mindestens 18 bekannte oder mutmaßliche AMPs verschiedener Arten. Dazu gehört Cecropin A, ein starkes AMP welches durch den Einbau in die Zellmembran oder deren direkte Zerstörung das Pathogen schwächt (Bolouri Moghaddam et al., 2016). Bei dem hydrolytischen Enzym Lysozym von *G. m.* wurde eine geringe enzymatisch antimikrobielle Aktivität gegen gramnegative Bakterien dokumentiert. Außerdem wird vermutet, dass Lysozym durch eine synergistische Wirkung mit anderen Substanzen (wie Cecropin und Defensinen) deren Aktivität gegen gramnegative Bakterien erhöhen könnte (Zdybicka-Barabas et al., 2013). Cecropin D ist ein wichtiges AMP der Lepidoptera. Es interagiert effektiv mit bakteriellen Zellhüllen, wie Lipopolysaccharide (LPS), und führt dadurch zu einer Diskontinuität und Permeabilität der Zellmembran (Zdybicka-Barabas et al., 2019). Gloverin ist ein weiteres wirksames AMP gegen Bakterien. Es wird vermutet, dass dessen antimikrobielle Aktivität ebenfalls auf Interaktionen mit bakteriellen LPS basiert, die zu einer Permeabilität der bakteriellen Zellmembran führt oder die Bildung der bakteriellen Außenmembran

hemmt (Zitzmann et al., 2017). Weitere bekannte AMPs sind Gallerimycin und Galiomycin (Dekkerová-Chupáčová et al., 2018). Apolipoprotein III spielt sowohl bei der Immunantwort als auch bei dem Lipidtransport eine Rolle. Es erkennt und bindet Zellbestandteile von Bakterien und Pilzen. Zusätzlich ist es an der Interaktion zwischen Hämolymphe, Hämocyten und Fettkörperzellen beteiligt. Es wurde eine antimikrobielle Aktivität gegen grampositive und gramnegative Bakterien nachgewiesen und außerdem, dass die antimikrobielle Aktivität von Lysozym in Gegenwart von Apolipoprotein III erhöht ist (Zdybicka-Barabas et al., 2013). Zu der humoralen Immunantwort gehören auch Opsonine. Sie erkennen und markieren Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) und begünstigen die Anhaftung humoraler oder zellulärer Bestandteile des angeborenen Immunsystems an die Oberfläche der Pathogene. Opsonine liegen frei um den Fremdkörper oder sind an dessen Oberflächenrezeptoren gebunden. Zu diesen Molekülen gehören Agglutinine, komplementähnliche Faktoren und Produkte der Prophenolaseaktivierung (Ratcliffe, 1985). Hemolin der *G. m.* dient als Opsonin zur Verteidigung gegen potenzielle Pathogene. Es wird in verschiedenen Organen produziert und nach einer Infektion verstärkt exprimiert (Shaik et al., 2009). Es gibt weitere weniger spezifische immunmodulierende Faktoren. Dazu gehört Stickstoffmonoxid (NO). NO übernimmt als Vorläufer der reaktiven Stickstoffspezies (RNS) bei der Immunantwort sowohl eine Signalfunktion als auch eine zytotoxische Rolle. Ein mutmaßlich durch eine Infektion induziertes Enzym, welches NO in der Hämolymphe produziert, ist die Stickstoffsynthase (NOS) (Semenova et al., 2014). Der Metalloprotease-Inhibitor der Insekten (IMPI) wird von *G. m.* eingesetzt, um Erregern, die über Proteasen in den Organismus eindringen, entgegenzuwirken (Grizanova et al., 2021).

### **1.3 *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium**

Mit dem Ziel, Experimente an Mausmodellen zu reduzieren und aufgrund von Ähnlichkeiten zwischen dem Immunsystem von Wirbeltieren und dem angeborenen Immunsystem von Insekten, wird *Galleria mellonella* zunehmend verwendet, um die Virulenz von bakteriellen Krankheitserregern wie *Salmonella* Typhimurium zu untersuchen (Seribelli et al., 2020).

Nicht-typhoide Salmonellen (NTS) sind gramnegative Enterobakterien und gehören weltweit unter den humanpathogenen Erregern zu den häufigsten Verursachern von akuten Darmerkrankungen (Haraga et al., 2008, Majowicz et al., 2010). Speziell der Serovar Typhimurium der *Salmonella enterica* ist eine der Hauptursachen für eine Enterokolitis beim Menschen (Barthel et al., 2003). Nach einer Schätzung gab es im Jahr 2017 weltweit 535.000 Fälle von invasiven Salmonellosen mit 77.500 Todesfällen (Collaborators, 2019). Eine Salmonellose wird meistens durch die orale Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln (Eier, Fleisch, Milchprodukte oder Gemüse) oder Wasser erworben (Haraga et al., 2008). Außerdem ist die Übertragung über den fäkal-oralen Kontakt von Mensch zu Mensch möglich. Auch kontaminierte symptomfreie Haustiere können Überträger sein (Seribelli et al., 2020).

Durch spezifische Virulenzfaktoren sind Salmonellen in der Lage auch bei ungünstigen Bedingungen zu überleben und sich zu vermehren (Álvarez-Ordóñez et al., 2011). Sie können die saure Magenpassage überwinden, in das Darmlumen gelangen, dort die Darmbarriere durchdringen und das Darmepithel infizieren. Ein grundlegende Fähigkeit dabei ist das intrazelluläre Überleben und die intrazelluläre Proliferation der *S. T.* (Richter-Dahlfors et al., 1997).

Die Immunantwort des Wirts auf eine *S. T.*-Infektion beginnt mit der Aktivierung der angeborenen Immunabwehr, wobei Makrophagen und Neutrophile zur Phagozytose angeregt werden. Ein wesentliches Virulenzmerkmal der phagozytierten Salmonellen ist es, in den Makrophagen zu überleben, indem sie spezielle Mechanismen wie das Salmonella Pathogenicity Island 2 (SPI-2) nutzt, die es vor der Zerstörung durch antimikrobielle Substanzen schützen. *S. T.* sind in der Lage sich zu reproduzieren und die Apoptose der Makrophagen einzuleiten (Dougan, 2011, Figueiredo et al., 2015). Die Interaktion mit der Wirtszelle und deren Manipulation, mit Veränderung von intrazellulären Wirtsreaktionen und schließlich die Kolonisation, führen zu einer lokalen Entzündungsreaktionen im Darm oder sogar zu einem systemischen Entzündungsprozess. Es ist wichtig anzumerken, dass das Spektrum von Pathomechanismen in den verschiedenen Salmonellenstämmen sehr unterschiedlich sein kann (Haraga et al., 2008).

Zu den Symptomen einer Salmonellose beim Menschen gehören Diarrhoe, Magenkrämpfe und Fieber (Seribelli et al., 2020). Die Gastroenteritiden sind meist selbstlimitierend. Bei bis zu 5 % der Betroffenen kann es zu Bakteriämien und schweren Infektionen kommen. Dabei sind vorwiegend immunkompromittierte Patienten und Patientinnen betroffen. Nur bei schweren Salmonellosen oder infizierten immunsupprimierten Patienten und Patientinnen ist eine antibiotische Therapie in Abhängigkeit vom Antibiogramm indiziert. Eine Gefahr stellen dabei die zunehmenden Resistenzen der Salmonellen gegen Erstlinientherapeutika dar (Hohmann, 2001).

Die Virulenz der *S. T.* kann sich auch unter den Wirbeltieren verschieden darstellen. Eine Infektion beim Menschen kann, wie bereits erläutert, zu einer Enterokolitis führen. Einige Isolate von promiskuitiven NTS-Serovaren, wie *S. T.*, können bei empfänglichen Mäusen hingegen eine invasive und systemische typhusähnliche Infektion durch den Befall des darmassoziierten lymphatischen Gewebes verursachen. Folglich wurde das *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium-Modell der Maus in der Wissenschaft erfolgreich als Surrogat für eine typhoide und allgemeine Salmonellose verwendet (Hormaeche, 1979, Barthel et al., 2003, Dougan, 2011).

Da die durch Pathogene ausgelöste komplexe Immunreaktion wirbelloser Tiere begrenzt Homologien zur angeborenen Immunreaktion von Wirbeltieren (Barros et al., 2019) und des Menschen aufweist (Bergin et al., 2003), wurden Salmonellen bereits mit verschiedenen Fragestellungen auch im *G. m.*-Versuchsmodell erforscht. Dazu gehören zum Beispiel die Untersuchung von: reaktiven Sauerstoffspezies als Schutzmechanismus gegen *Salmonella enterica* (Bismuth et al., 2021), speziellen Virulenzfaktoren der *S. T.* als Abwehrmechanismus gegen das Immunsystems des Wirts (Viegas et al., 2013), der Schutzfunktion probiotischen Bakterien gegen *S. T.* (Scalfaro et al., 2017), des Potentials von Phagentherapien gegen Salmonellen (Nale et al., 2020), des Einflusses von Quorum-Sensing-Induktoren auf die Virulenz der Salmonellen (Luiz de Freitas et al., 2021) und bakterieller Resistenzmechanismen gegen AMPs (Silva et al., 2021).

## 1.4 Immune Priming

Die Koevolution von Pathogenen und dem Immunsystem ihrer wirbellosen Zielorganismen ist ein sehr altes und komplexes Phänomen. Es entstanden hochspezialisierte Angriffsmechanismen der Erreger und Verteidigungsstrategien der Wirte (Grizanova et al., 2021). Wie bereits dargelegt, weist das Immunsystem wirbelloser Tiere keine adaptive Immunantwort oder Gedächtniszellen vor, wie das der Vertebraten (Fearon, 1997). Dennoch sind Insekten in der Lage nach einer Exposition mit einem pathogenen Erreger eine Art Resistenz gegen eine spätere Infektion mit dem gleichen Erreger zu entwickeln. Dieses Phänomen wird als Immune Priming bezeichnet (Wu et al., 2014). Das Immune Priming basiert auf einer Zunahme der Anzahl zirkulierender Hämozyten in der Hämolymphe und einer erhöhten Produktion antimikrobieller Peptide (Sheehan et al., 2020). Außerdem besitzen Insekten eine besondere Form des immunologischen Gedächtnisses, welches als Transgenerational Immune Priming (TgIP) bezeichnet wird. Dieses bewirkt die Weitergabe einer Schutzreaktion nach einem Pathogenkontakt des Elterninsekts an dessen Nachkommen über einen Anstieg differenzierter Hämozyten und deren Produktion spezifischer AMPs, welche die bakterielle Clearance erhöhen (Sheehan et al., 2020). Arbeiten aus den letzten Jahren zeigen, dass der Mechanismus des Immune Priming ebenfalls in *G. m.* vorzufinden ist. Dieser wurde beschrieben im Zusammenhang mit Pathogenen wie *Photorhabdus luminescens* (Wu et al., 2014), *Candida albicans* (Vertyporokh et al., 2020), *Bacillus thuringiensis* (Taszkow et al., 2017) und außerdem mit probiotischen Bakterienstämmen (Vilela et al., 2015, Upadhyay et al., 2016, Ribeiro et al., 2017, Scalfaro et al., 2017). Obwohl das Immune Priming letztlich keine funktionelle Äquivalenz der adaptiven Immunantwort mit B- und T-Zellreaktion von Vertebraten darstellt, ist es mit einer Bildung von Immunität und Stresstoleranz verbunden (Sheehan et al., 2020).

## 1.5 Forschungsfragen

In der vorliegenden Doktorarbeit standen Forschungsfragen im Mittelpunkt, die das Verständnis des Immune Priming und seine Anwendungsmöglichkeiten in der Infektionsforschung vertiefen sollten. Diese Forschungsfragen zielten darauf ab, das Potenzial von *Galleria mellonella* als alternatives In-vivo-Modell für die Untersuchung von Infektionen mit *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium zu erforschen, molekulare und zelluläre Mechanismen des Immune Priming aufzuklären und die Relevanz dieses Modells für zukünftige Studien zu evaluieren.

**Immune Priming und Überlebensvorteil:** Kann eine erste Exposition von *G. m.* mit einer nicht-letalen Dosis von *S. T.* das Überleben der Larven bei einer späteren Infektion mit einer letalen Dosis signifikant erhöhen? Diese Frage war von zentraler Bedeutung, da sie direkt auf die Effektivität des Immune Primings abzielte. Es wurde erwartet, dass das Immune Priming das Immunsystem der Larven so konditionieren konnte, dass es auf eine spätere Infektion effizienter reagierte.

**Molekulare Mechanismen des Immune Priming:** Welche spezifischen Gene und deren Produkte (insbesondere antimikrobielle Peptide) sind an der verstärkten Immunantwort nach einem Immune Priming beteiligt und korreliert deren Expression mit der Bakterienlast in den geprimten Larven? Diese Untersuchung war entscheidend, um Grundlagen des Immune Priming zu verstehen. Eine verstärkte AMP-Expression, die mit einer verringerten Bakterienlast einhergeht, würde darauf hinweisen, dass das Immune Priming auf molekularer Ebene eine robuste Schutzwirkung entfalten und die Pathogenvermehrung effektiv eindämmen könnte.

**Zelluläre Immunantwort:** In welchem Umfang trägt die erhöhte Präsenz von Hämocyten nach einem Immune Priming zur Abwehr von *S. T.* bei, und verändert sich die zelluläre Immunantwort im Vergleich zu nicht geprimten Larven? Diese Frage war besonders relevant, da Hämocyten eine Schlüsselrolle bei der Phagozytose und der Abwehr von Pathogenen spielen. Eine erhöhte

Hämozytenaktivität würde darauf hindeuten, dass das Immune Priming nicht nur die humorale, sondern auch die zelluläre Immunabwehr beeinflussen könnte.

Zusammenfassend zielten die Forschungsfragen dieser Arbeit darauf ab, das Phänomen des Immune Priming in *G. m.* umfassend zu untersuchen. Die Ergebnisse könnten nicht nur das Verständnis der angeborenen Immunität vertiefen, sondern auch neue Perspektiven für die Entwicklung innovativer Therapieansätze und den Einsatz von *G. m.* als alternatives Modell in der Infektionsforschung eröffnen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Organismus – *G. mellonella*: Anzucht und Monitoring**

Die *Galleria mellonella*-Larven wurden von der b.t.b.e. Insektenzucht GmbH erworben. Bei der Lieferung befanden sich die Larven in verschiedenen Entwicklungsstadien. Zur Anzucht wurden die Larven nach Größe (klein, mittel, groß) sortiert und jeweils bis zu 50 Tiere in einer 2,3 l großen Anzuchtbox untergebracht, die bis zu einem Drittel mit Nährmedium gefüllt war. Die Boxen wurden bei einer konstanten Temperatur von 30 °C im Dunkeln inkubiert. Um die Lebensbedingungen zu optimieren, wurden die Futterboxen regelmäßig gelüftet, und die Larven wurden visuell auf ihr Wachstum und ihre Gesundheit überprüft. Vor Beginn der Experimente wurden die Larven mittels einer Präzisionswaage gewogen. Larven mit einem Gewicht von 130-250 µg wurden für die Versuche ausgewählt, um eine homogene Testpopulation zu gewährleisten. Nach dem Wiegen und während der Experimente wurden die Larven einzeln in 6-Well-Cell-Culture-Plates mit Nährsubstrat platziert, um eine individuelle Überwachung zu ermöglichen. Diese Platten wurden bei einer Temperatur von 30 °C bzw. 37 °C im Dunkeln inkubiert, je nach den spezifischen Anforderungen der Versuche.

#### **2.1.2 Bakterienstamm – *S. Typhimurium***

Zur Induktion des Immune Priming-Mechanismus in *Galleria mellonella* diente der Wildtypstamm *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (Stamm SB300), der intern unter der Bezeichnung CS274 geführt wurde. Dieser Bakterienstamm wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wagner vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt. Vor den Experimenten mussten die Bakterien zunächst angezüchtet und auf die gewünschte Bakterienkonzentration eingestellt werden.

#### **Wachstumsbedingungen und Kultivierung**

Die Aufbewahrung des *S. T.*-Stammes erfolgte bei -80 °C in LB-Bouillon mit einem Glycerolanteil von 20 %. Zur Reaktivierung der Bakterien wurde eine Impföse verwendet, um eine Übernachtskultur in einem 14-ml-

Rundbodenröhrchen mit 2 ml LB-Medium anzusetzen. Diese Kultur wurde über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die gezüchteten Bakterien bei 6 °C gelagert und innerhalb von maximal fünf Tagen für die Versuche verwendet. Um die Bakterien für die Experimente in die Log-Phase (maximale Teilungsrate) zu bringen, wurden täglich 100 µl der Übernachtskultur in einem 14-ml-Rundbodenröhrchen mit 5 ml LB-Medium inokuliert und für zwei Stunden im Schüttler bei 37 °C inkubiert, bis eine leichte Trübung des Mediums erreicht wurde. Dieses Vorgehen sollte sicherstellen eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen.

### **Einstellung der Zielkonzentrationen für die Infektion von *Galleria mellonella***

Zur Einstellung der Zielkonzentration für die Infektion der *G. m.*-Larven wurde die Tageskultur von *S. T.* bei 4000 g für 5 Minuten zentrifugiert, um die Bakterien vom LB-Medium zu trennen. Der Überstand wurde entfernt, und das verbleibende Bakterienpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert. Die Konzentration der *S. T.*-Suspension wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm mit einem Photometer bestimmt. Die optische Dichte von zwei entsprach einer Konzentration von  $10^9$  Bakterien/ 1 ml. Um die gewünschte Injektionsdosis herzustellen, wurde eine Verdünnungsreihe der *S. T.*-Suspension in PBS durchgeführt. Das Mischverhältnis betrug 1:10. Zur Kontrolle der hergestellten Infektionsdosen wurden bei jedem Versuch die Colony Forming Units (CFU) aus den *S. T.*-Suspensionen bestimmt, um die tatsächliche Bakterienkonzentration zu überprüfen.

### 2.1.3 Geräte und Hilfsmittel

Die in dieser Studie verwendeten Geräte und Hilfsmittel sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Verwendete Geräte**

| <b>Gerät</b>                      | <b>Produzent</b>                        |
|-----------------------------------|---|
| Sicherheitswerkbank               | BDK, Luft- und Reinraumtechnik          |
| Inkubator                         | Heraeus, Thermo Scientific<br>Heratherm |
| BioPhotometer                     | Eppendorf                               |
| Vortexmischer, Vortex 2 Genie     | Scientific Industries                   |
| Zentrifuge, Multizentrifuge 3 S-R | Heraeus                                 |
| Zentrifuge, mini Spin plus        | Eppendorf                               |
| Manual Microsyringe Pump (MMP)    | World Precision Instruments, Inc.       |
| Päzisionswaage, CPA225D-0CE       | Sartorius                               |
| Inkubationsschüttler, AK82        | Infors HT                               |
| Lichtmikroskop, Axiovert 25       | Zeiss                                   |
| Zählkammer, 0,1 mm Tiefe          | Neubauer                                |
| NanoDrop™ One                     | Thermo Fisher Scientific                |
| Lightcycler 480                   | Roche                                   |

### 2.1.4 Programme/ Software

Der *Lightcycler 480* wurde für die Auswertung der qRT-PCR verwendet, *Microsoft Office Excel* für die Dokumentation der Methoden und Berechnungen der Ergebnisse, *GraphPadPrism 8* für die Graphische Darstellung und statistische Auswertung, und *Adobe Photoshop CS6 Extended* für die Visuelle Darstellung.

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Studie verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

| <b>Material</b>                                  | <b>Produzent</b>           |
|--|----------------------------|
| Columbia-Blutagar, COLS+ 5% Schafsblut           | ThermoFisher Scientific    |
| Handelsübliche Nahrungsboxen, 2,3 l              |                            |
| Küvetten   | Sarstedt                   |
| LB Bouillon                                      | BD                         |
| Micro-Fine™+ Demi U-100 Spritze 0.3 x 8 mm (30G) | BD                         |
| Mikrotiterplatte 96 x 0,2 ml                     | Nerbe plus                 |
| Polystyrene Round-Bottom-Tube, 14 ml             | Falcon                     |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml                  | Eppendorf                  |
| Test-Agar nach Kundrat                           | Merck                      |
| 6-Well-Cell-Culture-Plate                        | Greiner bio-one, CELLSTAR® |

**2.1.6 Puffer, Medien, Reagenzien und Primer**Puffer

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline von Gibco® (folgend nur PBS genannt).

IPS: Insect Physiological Saline. Der Puffer wurde nach Wago und Ichikawa (1988) hergestellt: 150 mM NaCl, 5 mM KCl und 0,1 M Tris-HCl. Der pH-Wert betrug 6,9 nach Titration mit NaOH.

Reagenzien und Kits

Die in dieser Studie verwendeten Reagenzien und Kits sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 3: Reagenzien**

| <b>Reagenz</b>                | <b>Produzent</b> |
|-------------------------------|------------------|
| TRizol                        | Sigma Aldrich    |
| 1-Bromo-3-Chloropropan (BCP)  | Sigma Aldrich    |
| RNasin Ribonuclease Inhibitor | Promega          |

**Tabelle 4: Kits**

| <b>Kit</b>                        | <b>Produzent</b>                     |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| RNeasy-Kit                        | Qiagen                               |
| DNA-free™ Kit                     | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific |
| QuantiFast SYBR®Green qRT-PCR Kit | Qiagen                               |

### Medien

Das Substrat für *G. mellonella* wurde aus den in Tabelle 5 aufgeführten Zutaten angesetzt.

**Tabelle 5: Substratherstellung für *G. mellonella***

| <b>Zutaten</b>     | <b>Anteil in %</b> |
|--------------------|--------------------|
| Maisgrieß          | 22                 |
| Weizenschrot       | 22                 |
| Magermilchpulver   | 11                 |
| Trockenhefeflocken | 5,5                |
| Bienenwachs        | 17,5               |
| Honig              | 11                 |
| Glycerin           | 11                 |

Alle Zutaten wurden durchmischt und für 60 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die Zutaten stammten aus ökologischer Produktion, um eine Pestizidbelastung der Nahrungsbestandteile zu vermeiden.

### Primer

Die in dieser Studie für die RT-qPCR (siehe Methoden 2.2.8) verwendeten Primer sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6: Primerliste**

| <b>Gen</b>    | <b>Primer</b> | <b>Sequenz 5'-3'</b>           | <b>Referenznummer/<br/>Quelle</b> |
|---------------|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Ubiquitin     | Forward       | TCAATGCAAGTAGTCCGGTTC          | LOC113509582                      |
|               | Reverse       | CCAGTCTGCTGCTGATAAACC          |                                   |
| Cecropin      | Forward       | CTGTTTCGTGTTTCGCTTGTGT         | Dr. Anna Lange<br>AG Frick        |
|               | Reverse       | GTAGCTGCTTCGCCTACCAC           |                                   |
| Gallerimycin  | Forward       | GAAGTCTACAGAATCACACGA          | LOC113523440                      |
|               | Reverse       | ATCGAAGACATTGACATCCA           |                                   |
| IMPI          | Forward       | ATACGTTTCGCGTCGTTCCAT          | (Mukherjee et al.,<br>2012)       |
|               | Reverse       | GGGGAATGTTGCATTTGTGGA          |                                   |
| Hemolin       | Forward       | CTCCCTCACGGAGGACAAAC           | LOC113510107                      |
|               | Reverse       | GCCACGCACATGTATTCACC           |                                   |
| NOS           | Forward       | ATGAAGGTGCTGAAGTCACAA          | LOC113517211                      |
|               | Reverse       | GCCATTTTACAATCGCCACAA          |                                   |
| Galiomycin    | Forward       | GGATCCATGGCGAAAAATTTCCAGTCC    | (Mukherjee et al.,<br>2012)       |
|               | Reverse       | GTCGACTTACTCGCACCAACAATTGACGTT |                                   |
| Apolipophorin | Forward       | AGACTTGCACGCCATCAAGA           | LOC113521068                      |
|               | Reverse       | TGCATGCTGTTTGTCACTGC           |                                   |
| Gloverin      | Forward       | GTGTTGAGCCCGTATGGGAA           | LOC113523269                      |
|               | Reverse       | CCGTGCATCTGCTTGCTAAC           |                                   |
| Lysozym       | Forward       | GGACTGGTCCGAGCACTTAG           | LOC113510919                      |
|               | Reverse       | CGCATTTAGAGGCAACCGTG           |                                   |

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Systemische Infektion der *G. mellonella***

Die systemische Infektion beschreibt die direkte Injektion einer *S. T.* - Suspension in das Hämocoel des Organismus. Diese Methode, auch als Hämocoel-Injektion (HI) bezeichnet, ermöglicht eine künstliche Infektion des Organismus.

Für die Injektion wurden eine Insulinspritze sowie eine Manual Microsyringe Pump verwendet. Pro Larve wurden 10 µl der Bakteriensuspension oder PBS in den rechten oder linken letzten Bauchfuß injiziert. Larven wurden vom Experiment ausgeschlossen, wenn ein Teil der Injektion oder Hämolymphe aus dem Stichkanal austrat, Anzeichen einer versehentlichen inneren Verletzung auftraten, wie eine anhaltende Immobilität, oder die Nadel versehentlich den gesamten Körper der Larve durchdrang. Diese Ausschlusskriterien sollten sicherstellen, dass nur unversehrte Larven in die Analyse einbezogen wurden, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

### **2.2.2 Titration der Infektionsdosis**

Für die Experimente wurden sowohl subletale als auch letale Dosierungen von *S. T.* ermittelt. Dazu wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve mittels einer Survival-Analyse erstellt. Es wurden Infektionsdosierungen von  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  und  $10^5$  *S.T./ ml* verwendet. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe angelegt, in der die Larven PBS injiziert bekamen. Jede Versuchsgruppe umfasste 10 Larven. Nach der Injektion wurden die Larven über einen Zeitraum von fünf Tagen alle 24 Stunden auf ihr Überleben untersucht. Larven, die sich schwarz verfärbten und auf taktile Reize mit einer Pinzette nicht mehr reagierten, wurden als verstorben gewertet. Diese Methodik ermöglichte es, die letale und subletale Dosis präzise zu bestimmen, was für die nachfolgenden Immune Priming-Experimente von zentraler Bedeutung war.

### **2.2.3 Abnahme von Hämolymphe der *G. mellonella***

Die Hämolymphe der Larven enthält sowohl humorale als auch zelluläre Bestandteile des Immunsystems und ist ein Ort, an dem *S. T.* proliferiert. Daher

war die Entnahme von Hämolymphe aus dem Hämocoel der Larven ein wesentlicher Schritt der Experimente.

Um die Hämolymphe zu entnehmen, wurde die Larve distal an einer Seite des Körpers gezielt mit einer Kanüle punktiert, wodurch die gelblich klare Hämolymphe austrat. Ein Tropfen von 10 bis 13  $\mu\text{l}$  wurde mithilfe einer Pipette gesammelt. Die entnommene Hämolymphe wurde für verschiedene nachfolgende Analysen verwendet, darunter die Quantifizierung von *S. T.* in *G. m.*-Hämolymphe, der Hemmstofftest zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen in *G. m.*-Hämolymphe und die Bestimmung der Hämozytenzahl in *G. m.*-Hämolymphe mittels Lichtmikroskopie.

#### **2.2.4 Immune Priming der *G. mellonella* mit *S. Typhimurium***

Um das Immune Priming in *G. mellonella* zu untersuchen, wurde den Larven zunächst eine subletale Dosis von  $10^5$  *S. T.*/ml injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C im Dunkeln in 6-Well-Cell-Culture-Plates mit einer kleinen Menge Futter, erhielten die Larven eine zweite Injektion mit einer letalen Dosis von  $10^7$  *S. T.*/ml (siehe Tabelle 7: Versuchsgruppe C). Zusätzlich wurden drei Kontrollgruppen eingeführt (siehe Tabelle 7: A, B und D), um die Ergebnisse interpretieren zu können.

**Tabelle 7: Versuchsaufbau Doppelstimulation**

| <b>Gr.</b> | <b>1. Injektion (10 <math>\mu\text{l}</math>) am Tag 0</b> | <b>2. Injektion (10 <math>\mu\text{l}</math>) am Tag 1</b> |
|------------|--|--|
| A          | PBS  | PBS  |
| B          | $10^5$ <i>S. T.</i> / ml                                   | PBS  |
| C          | $10^5$ <i>S. T.</i> / ml                                   | $10^7$ <i>S. T.</i> / ml                                   |
| D          | PBS  | $10^7$ <i>S. T.</i> / ml                                   |

Um die Immunantwort der *G. m.* nach einer einfachen Stimulation mit *S. T.* zu bewerten und diese mit der durch die zweifache Stimulation hervorgerufene Antwort zu vergleichen, wurde ein ergänzendes Experiment durchgeführt. Hierbei wurden die Larven mit 10  $\mu\text{l}$  einer Suspension von  $10^5$  *S. T.*/ ml,  $10^7$  *S. T.*/ ml oder PBS als Kontrolle injiziert (siehe Tabelle 8: E-G).

**Tabelle 8: Versuchsaufbau Einfache Stimulation**

| Gr. | Injektion (10 µl) am Tag 0 |
|-----|----------------------------|
| E   | PBS                        |
| F   | 10 <sup>5</sup> S. T./ ml  |
| G   | 10 <sup>7</sup> S. T./ ml  |

Auf der Grundlage dieser Stimulationsprotokolle wurden verschiedene immunologische und mikrobiologische Parameter untersucht, um die Wirkung des Immune Priming umfassend zu charakterisieren. Zu den durchgeführten Experimenten zählten die Survival-Analyse, die Quantifizierung von *S. T.*-CFU, der Hemmstofftest nach Kundrat, die Analyse der immunrelevanten Genexpressionen und die Bestimmung der Hämozytenzahl (Abbildung 1). Die Parameter wurden in einer Zeitreihe zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden nach der ersten und zweiten Injektion ermittelt.

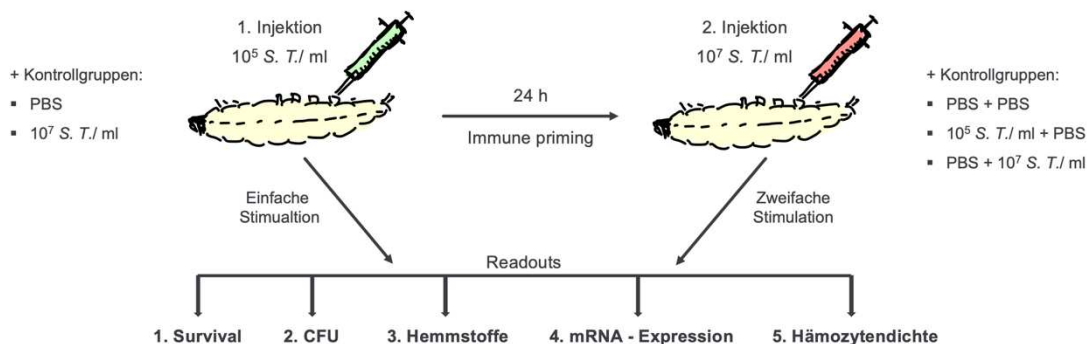


Abbildung 1: Übersicht der Methodik.

Die Aktivität des Immunsystems der *G. m.*-Larven wurde sowohl nach einfacher als auch nach zweifacher Stimulation durch verschiedene Experimente untersucht. Zusätzlich wurden den Versuchen Kontrollgruppen hinzugefügt.

### 2.2.5 Survival - Analyse von *G. mellonella*

Zu Beginn der Experimente wurde eine Survival-Analyse durchgeführt, um die Überlebensrate der Larven nach der Infektion mit *S. T.* zu bestimmen. Zusätzlich wurde eine parallelaufende Survival-Analyse während der weiteren Experimente durchgeführt, um die Stabilität und Reproduzierbarkeit der Immune Priming-

Versuche sicherzustellen. Dazu wurden vier Versuchsgruppen erstellt, mit der Systematik wie in Tabelle 7.

Die Larven wurden nach der ersten Injektion mit *S. T.* für 24 Stunden in 6-Well-Cell-Culture-Plates mit Futter bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erhielten sie die zweite Injektion und wurden unter denselben Bedingungen erneut inkubiert. Das Überleben der Larven wurde alle 24 Stunden über einen Zeitraum von fünf Tagen visuell und taktil überprüft. Insgesamt wurden fünf Replikate mit einer Anzahl von vier bis zehn Larven pro Experiment durchgeführt.

### **2.2.6 Quantifizierung von *S. Typhimurium* in *G. mellonella*-Hämolymphe**

Der Versuch der Quantifizierung der CFU von *S. T.* in der Hämolymphe wurde erstellt, um die Proliferation der Bakterien nach einfacher und doppelter Stimulation zu messen und deren Einfluss auf das Überleben der Larven zu analysieren.

Für diese Experimente wurden die Versuchsgruppe C ( $10^5$  *S. T.*/ ml +  $10^7$  *S. T.*/ ml) und die Kontrollgruppen B und D ( $10^5$  *S. T.*/ ml + PBS und PBS +  $10^7$  *S. T.*/ ml) erstellt. Die Injektionen erfolgten im Abstand von 24 Stunden. Zusätzlich wurden die CFU in Larven nach einer einfachen Injektion von  $10^5$  *S. T.*/ ml bestimmt. Zu festgelegten Zeitpunkten (0, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden nach der ersten bzw. zweiten Injektion) wurden 13 µl Hämolymphe entnommen und in PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt. Aus diesen Ansätzen wurde eine serielle Verdünnungsreihe mit einer 10-fachen Verdünnung erstellt. Von den Verdünnungen wurden jeweils 100 µl auf Blutagarplatten aufgetragen und für 24 Stunden bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die CFU wurden anschließend manuell ausgezählt und auf die ursprüngliche Menge der entnommenen Hämolymphe (10 µl) zurückgerechnet.

Die Experimente zur einfachen und doppelten Stimulation wurden jeweils zweimal durchgeführt, wobei bei der einfachen Stimulation je 6 Tiere und bei der doppelten Stimulation 10 bzw. 5 Tiere verwendet wurden. Die unregelmäßige Anzahl der Versuchstiere erklärt sich durch die Verfügbarkeit der Larven.

### **2.2.7 Hemmstofftest zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen in *G. mellonella*-Hämolymphe**

Der Hemmstofftest wurde durchgeführt, um die Hämolymphe von *G. m.* auf antimikrobielle Aktivität zu untersuchen, die als mögliche Ursache für die Hemmung der Proliferation von *S. T.* bis hin zur Eradikation dienen könnte.

Zwei unabhängige Experimente wurden durchgeführt: Im ersten Experiment wurden die Larven zwei Mal im Abstand von 24 Stunden stimuliert, wobei die Versuchsgruppe C und die drei Kontrollgruppen A, B, und D (Tabelle 7) verwendet wurden. Ergänzend wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem die Larven eine einfache Injektion von PBS oder  $10^5$  *S. T.*/ ml erhielten. Die Larven wurden nach der ersten bzw. zweiten Injektion entsprechend einer Zeitreihe (0, 2, 4, 6, 8 oder 24 Stunden) bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 10 µl Hämolymphe entnommen und auf Test-Agar nach Kundrat von Merck pipettiert. Sechs unbehandelte (native) Larven dienten als zusätzliche Kontrolle. Die Testorganismen auf den Agarplatten waren Sporen von *Geobacillus stearothermophilus*, die ursprünglich zum Nachweis antimikrobieller Rückstände verwendet wurden. *Geobacillus stearothermophilus* wurde aufgrund seiner spezifischen Eigenschaften für unseren Hemmstofftest ausgewählt. Es ist besonders empfindlich gegenüber Hemmstoffen und seine thermophilen Eigenschaften ermöglichen gezielte Beobachtungen, da sein Wachstum weniger durch andere Mikroorganismen gestört wird. Dank einer hohen Stoffwechselaktivität liefert es schnelle Testergebnisse und seine reduktometrischen Fähigkeiten erleichtern den Nachweis von Stoffwechselaktivitäten. Als Sporenbildner bietet es eine konsistente und homogene Ausgangsbasis für das Bakterienwachstum, wobei die Sporenkeimung für ein klares und sichtbares Wachstumsmuster sorgt und die eindeutige Unterscheidung zwischen Wachstums- und Hemmzonen erleichtert (Kundrat, 1968).

In unseren Versuchen wird das Wachstum der Bakterien durch antimikrobiell wirksame Substanzen gehemmt, was durch das Auftreten von Hemmhöfen sichtbar wird. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 57 °C im Dunkeln unter anaeroben Bedingungen schlägt die Farbe des Indikators im Agarnährboden,

ausgelöst durch Redoxreaktionen des Bakteriums, von Lila nach Gelb um. Fehlt dieser Farbumschlag, zeigt dies eine Hemmung des Bakterienwachstums an, die als Hemmhof sichtbar und messbar ist. Es wurde eine Nachweisgrenze von 10 mm Durchmesser festgelegt.

Für die Versuche zur Einfachstimulation wurden zwei Replikate mit 4 und 6 Tieren und für die Doppelstimulation zwei Replikate mit jeweils 3 Tieren durchgeführt.

### **2.2.8 Analyse von immunrelevanten Genexpressionen in *G. mellonella* durch die qRT-PCR**

Um potenziell entscheidende Gene in der Immunantwort gegen *S. T.* zu identifizieren, wurde deren differenzielle Expression nach einfacher und zweifacher Stimulation mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) untersucht.

#### **Versuchsaufbau**

Die Experimente zur einfachen Stimulation mit  $10^5$  *S. T.* /ml wurden mit sechs Tieren pro Versuch durchgeführt. Die RNA-Isolation erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 2, 4 oder 6 Stunden) nach der Injektion, wobei "0 Stunden" den Zeitpunkt unmittelbar (Sekunden bis wenige Minuten) nach der ersten Injektion markiert. Für den Versuch der zweifachen Stimulation wurden ebenfalls 6 Tiere pro Versuchsgruppe eingesetzt (Tabelle 9: A1-D4). Auch hier wurde die RNA-Isolation zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 oder 6 Stunden nach der zweiten Injektion durchgeführt. Der Zeitpunkt "0 Stunden" bezieht sich hierbei auf den Moment direkt nach der zweiten Injektion, was gleichzeitig 24 Stunden nach der ersten Injektion entspricht. Parallel zu den RNA-Isolationen wurde eine Survival-Analyse mit jeweils 6 Tieren pro Versuchsgruppe durchgeführt, um die experimentellen Ergebnisse zu validieren.

**Tabelle 9: Versuchsaufbau Genexpression bei zweifacher Stimulation**

| Gruppe         | 1. Injektion (10 µl)      | 2. Injektion (10 µl)      | RNA-Isolation<br>(h nach 2. Injektion) |
|----------------|---------------------------|---------------------------|--|
| A <sub>1</sub> | PBS                       | PBS                       | 0                                      |
| A <sub>2</sub> | PBS                       | PBS                       | 2                                      |
| A <sub>3</sub> | PBS                       | PBS                       | 4                                      |
| A <sub>4</sub> | PBS                       | PBS                       | 6                                      |
| B <sub>1</sub> | S. T. 10 <sup>5</sup> /ml | PBS                       | 0                                      |
| B <sub>2</sub> | S. T. 10 <sup>5</sup> /ml | PBS                       | 2                                      |
| B <sub>3</sub> | S. T. 10 <sup>5</sup> /ml | PBS                       | 4                                      |
| B <sub>4</sub> | S. T. 10 <sup>5</sup> /ml | PBS                       | 6                                      |
| C <sub>1</sub> | S. T. 10 <sup>5</sup> /ml | S. T. 10 <sup>7</sup> /ml | 0                                      |
| C <sub>2</sub> | S. T. 10 <sup>5</sup> /ml | S. T. 10 <sup>7</sup> /ml | 2                                      |
| C <sub>3</sub> | S. T. 10 <sup>5</sup> /ml | S. T. 10 <sup>7</sup> /ml | 4                                      |
| C <sub>4</sub> | S. T. 10 <sup>5</sup> /ml | S. T. 10 <sup>7</sup> /ml | 6                                      |
| D <sub>1</sub> | PBS                       | S. T. 10 <sup>7</sup> /ml | 0                                      |
| D <sub>2</sub> | PBS                       | S. T. 10 <sup>7</sup> /ml | 2                                      |
| D <sub>3</sub> | PBS                       | S. T. 10 <sup>7</sup> /ml | 4                                      |
| D <sub>4</sub> | PBS                       | S. T. 10 <sup>7</sup> /ml | 6                                      |

### RNA-Isolation

Zu den festgelegten Zeitpunkten wurden die Larven in flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit einem Pistill zerkleinert und in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml TRIzol gelöst, um RNA, DNA und Proteine zu extrahieren. Die Lösung wurde durch Vortexen durchmischt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Material bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C konserviert.

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 8000 g für 15 Minuten zentrifugiert, um die RNA vom Zelldetritus zu trennen. Der Überstand wurde in 200 µl BCP (Phasentrennungsreagenz) pipettiert, für 15 Sekunden vortexiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur sowie 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Nach einer Zentrifugation bei 18000 g und 4°C für 15 Minuten wurde die obere wässrige Phase in 500 µl Isopropanol überführt, um die RNA zu präzipitieren. Nach erneutem Vortexen wurden die Proben 5 Minuten invertiert und bei 18000 g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das RNA-Pellet mit 500 µl 75% Ethanol gewaschen. Nach einer abschließenden Zentrifugation bei 18000 g und 4°C für 15 Minuten wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet für 10 Minuten getrocknet und in 100 µl RNasin-Lösung (1:50 mit destilliertem Wasser) gelöst, gevortexiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die RNA-Quantität wurde mit einem Nanodrop in ng/µl gemessen, und die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

### **DNA-Verdau**

Die RNA-Proben wurden auf eine einheitliche Konzentration von 5 µg RNA/50 µl mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Zur Verdauung und Ausfällung der DNA wurden 5 µl DNase-Puffer, 1 µl RNasin und 2 µl DNase hinzugefügt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 6 µl DNase-Inactivation-Lösung hinzugefügt, die Proben für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zwischendurch vortexiert. Nach einer Zentrifugation bei 10000 g für 1 Minute wurde der klare Überstand in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Die RNA-Konzentration wurde auf 1 µg/10 µl eingestellt, und zusätzliche 1:10-Verdünnungen wurden hergestellt.

### **Quantitative Real Time PCR - qRT-PCR**

Als Mock-Sample (Referenzprobe für die Stimulations-Probe) diente die Versuchsgruppe, die bei der ersten und zweiten Injektion nur mit PBS stimuliert wurde. Die quantitative Expression der untersuchten Gene wurde in Relation zu dem Housekeeping-Gen Ubiquitin bestimmt. Untersucht wurden die als immunrelevant diskutierten Gene für folgende Genprodukte: Gallerimycin, Lysozym, Hemolin, Galiomycin, NOS, IMPI, Cecropin, Gloverin und Apolipophorin (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 10: Mastermix**

| Reagenz                                   | Ansatz |
|---|--------|
| QuantiFast SYBR®Green qRT-PCR Master MIX  | 5 µl   |
| Forward Primer                            | 0,1 µl |
| Reverse Primer                            | 0,1 µl |
| Nucleasefreies Wasser                     | 3,7 µl |
| QuantiFast RT Mix (Reverse Transkriptase) | 0,1 µl |
| Gesamt                                    | 9 µl   |

Für die qRT-PCR wurden 9 µl Mastermix (Tabelle 10) und 1 µl der isolierten RNA in 96-Well-Plates pipettiert. Die Well-Plates wurden mit Deckfolien verschlossen, zentrifugiert und anschließend mittels qRT-PCR im LightCycler® quantifiziert (Tabelle 11). Die Quantifizierung erfolgte mittels der SybrGreen-Detektionsmethode. SybrGreen bindet an dsDNA und fluoresziert dann besonders stark. Diese Fluoreszenz wurde gemessen.

**Tabelle 11: Programm qRT-PCR**

| Programm              | Zyklen | Temperatur         | Dauer    |
|-----------------------|--------|--------------------|----------|
| Reverse Transkription | 1      | 50 °C              | 10 min   |
| Denaturierung         | 1      | 95 °C              | 5 min    |
| Amplifikation         | 40     | 95 °C              | 10 s     |
|                       |        | 60 °C              | 30 s     |
| Schmelzkurve          | 1      | 46 °C bis<br>95 °C | 2,5°C/ s |

Die Effizienz der qRT-PCR wurde durch eine Verdünnungsreihe (3 Verdünnungen je 1:5 verdünnt) aus einem Pool isolierter *G. mellonella*-RNA bestimmt. Negative Kontrollen ohne RNA wurden ebenfalls eingeschlossen. Um RNase-Kontaminationen zu vermeiden, wurden RNase-Exitus (zur Neutralisierung von RNasen) und gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Die RNA-

Proben wurden bei -80°C gelagert und nur auf Eis gekühlt transportiert, um den Abbau der RNA zu verlangsamen.

Die Datenanalyse erfolgte mit der LightCycler® 480 Software. Die Schritte umfassten: Berechnung der relativen Quantifizierung der Standardverdünnung zur Kontrolle der qRT-PCR-Spezifität und Bestimmung der qRT-PCR-Effizienz (tatsächliche Replikation pro Zyklus, Idealwert = 2); Bestimmung der relativen Quantifizierung der Stimulus-Proben im Vergleich zum Housekeeping-Gen Ubiquitin sowie Berechnung der entsprechenden Ct-Werte. (Cycle threshold = Anzahl der Zyklen, bei denen eine spezifische Fluoreszenzstärke erreicht wird); Schmelzkurvenanalyse zur Beurteilung der Qualität des Primerdesigns bzw. Spezifität der Reaktion, da SybrGreen an jede dsDNA bindet und jede dsDNA eine spezifische Schmelztemperatur hat.

Die weitere Verarbeitung der Daten beinhaltete: Berechnung der relativen transkriptionellen Unterschiede zwischen den Mock-Sample-Werten und Stimulus-Proben mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode:

$$R = \frac{E_{\text{Testgen}}^{Ct(\text{Mock})_{\text{Testgen}} / E_{\text{Testgen}}^{Ct(\text{Stimulation})_{\text{Testgen}}}}{E_{\text{Ubiquitin}}^{Ct(\text{Mock})_{\text{Ubiquitin}} / E_{\text{Ubiquitin}}^{Ct(\text{Stimulation})_{\text{Ubiquitin}}}}$$

Mock-Samples und Stimulusproben wurden in getrennten Läufen gemessen, wobei beide Effizienzen berücksichtigt wurden. Jeder Mock-Sample-Wert wurde mittels Excel mit jeder Stimulusprobe desselben Zeitpunkts verglichen und daraus wurden Mittelwerte berechnet. Auffällige Ct-Werte, die auf technische Fehler hindeuteten, wurden markiert und gegebenenfalls ausgeschlossen (Abbildung 2).

| Gen       |      |               | Ubiquitin | Hemolin |   | Gen       |                      |        | Ubiquitin | Hemolin |
|-----------|------|---------------|-----------|---------|---|-----------|----------------------|--------|-----------|---------|
| Effizienz |      |               | 19,57     | 2,101   |   | Effizienz |                      |        | 19,95     | 2,101   |
|           | G.m. | Gruppe        |           |         |   |           | G.m.                 | Gruppe |           |         |
|           | 2756 | S.T. + PBS 0h | 19,62     | 16,96   | ← | 2732      | Mock 1: PBS + PBS 0h | 19,95  | 23,25     |         |
|           | 2757 | S.T. + PBS 0h | 19,75     | 17,97   | ← | 2733      | Mock 2: PBS + PBS 0h | 20,1   | 24,65     |         |
|           | 2758 | S.T. + PBS 0h | 19,77     | 15,98   | ← | 2734      | Mock 3: PBS + PBS 0h | 20,09  | 23,16     |         |
|           | 2759 | S.T. + PBS 0h | 19,7      | 15,84   | ← | 2735      | Mock 4: PBS + PBS 0h | 20,27  | 22,55     |         |
|           | 2760 | S.T. + PBS 0h | 19,76     | 16,56   | ← | 2736      | Mock 5: PBS + PBS 0h | 19,93  | 19,81     |         |
|           | 2761 | S.T. + PBS 0h | 19,84     | 17,28   | ← | 2737      | Mock 6: PBS + PBS 0h | 20,53  | 24,04     |         |

Abbildung 2: Berechnung der Genexpression

Die qRT-PCR-Daten wurden zunächst in Excel verarbeitet. Dabei wurden die Mock-Werte eines Zeitpunkts mit allen Werten einer Gruppe desselben Zeitpunkts verglichen. Anschließend wurden Mittelwerte aus den berechneten Ergebnissen ermittelt. Diese Mittelwerte wurden dann in Graphpad Prism für die statistische Analyse und die grafische Darstellung weiterverarbeitet.

### **2.2.9 Bestimmung der Hämozytenzahl in der *G. mellonella*-Hämolymphe mittels Lichtmikroskopie**

Um die Hämozyten, die Immunzellen von *Galleria mellonella*, als entscheidenden Faktor für das Überleben bei einer Infektion mit *Salmonella* Typhimurium zu untersuchen, wurde die Hämozytendichte in der Hämolymphe der Larven mittels Lichtmikroskopie bestimmt.

Nach der einfachen und doppelten Stimulation wurden die Larven in 6-Well-Cell-Culture-Plates bei 37 °C inkubiert. Zu festgelegten Zeitpunkten (0, 2, 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach der ersten oder zweiten Injektion) wurden den Larven jeweils 10 µl Hämolymphe entnommen. Dazu wurden die Larven seitlich mit einer Nadel punktiert, und die austretende Hämolymphe wurde mit einer Pipette aufgefangen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde für jede Larve eine neue Kanüle und Pipettenspitze verwendet. Die 10 µl Hämolymphe wurden in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß mit 90 µl Insektenphysiologischer Lösung (IPS) pipettiert (1:10-Verdünnung) und vorübergehend bei 7 °C gekühlt, um den Zerfall der Hämozyten *in vitro* zu verlangsamen. Von dieser 1:10-Verdünnung wurden 10 µl in ein weiteres Eppendorf-Gefäß mit 40 µl IPS pipettiert (1:50-Verdünnung), um die Zählbarkeit der Zellen unter dem Lichtmikroskop zu gewährleisten. Anschließend wurden 10 µl der 1:10- oder 1:50-Verdünnung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert, und die Hämozyten wurden unter dem Lichtmikroskop in einem definierten Bereich von zwei bis vier Eckquadraten ausgezählt. Aus den gezählten Zellen wurde ein Mittelwert berechnet. Ein Eckquadrat der Neubauer-Zählkammer umfasst 0,1 mm<sup>3</sup> bzw. 0,1 µl. Die Hämozytenzahl wurde als Anzahl pro 10 µl angegeben.

Zusätzlich zu den Kontrollgruppen A, B und D (Tabelle 7) wurde eine weitere Kontrollgruppe ohne jegliche Injektion (nativ) eingeführt, um die Hämozytenzahl nicht stimulierter *G. m.* als Referenzwert zu bestimmen. Die Versuche der Einfach- und Doppelstimulation wurden zweimal durchgeführt. Für die Doppelstimulation wurden 3 und 5 Tiere pro Versuchsgruppe und Zeitpunkt der Zeitreihe eingesetzt. Bei der Einfachstimulation mit PBS oder 10<sup>5</sup> S. T./ ml wurden jeweils 6 Tiere verwendet. Parallel dazu wurde eine Survival-Analyse mit 5 Larven pro Versuchsgruppe durchgeführt.

In einem ergänzenden Versuch wurde die Veränderung der Hämozytenzahl nach einer Punktion mit einer Kanüle im Vergleich zur Injektion von PBS untersucht. Die Larven wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden entweder durch Punktion oder durch Injektion von PBS stimuliert. Anschließend wurden sie nach der zweiten Stimulation gemäß einer festgelegten Zeitreihe (0, 2, 4, 6 oder 8 Stunden) bei 37 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Hämolymphe entnommen und die Hämozytenzahl nach dem oben beschriebenen Verfahren bestimmt. Es wurden 6 Tiere pro Versuchsgruppe eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe eingeführt, die keine Stimulation erhielt, um die Hämozytenzahl nicht stimulierter *G. m.* als Referenzwert zu ermitteln.

#### **2.2.10 Statistische Mittel und Visualisierung**

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Analysen wurden unter Verwendung der Software GraphPad Prism 8.4.0 durchgeführt. Dieser Prozess umfasste mehrere Schritte, um die Daten auf ihre Validität und Aussagekraft hin zu prüfen. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Normalverteilung der Daten durch den Kolmogorov-Smirnov-Test. Für Datensätze, die eine Normalverteilung aufwiesen, wurde der ANOVA-Test (Analysis of Variance) verwendet. Der ANOVA-Test ermöglicht es festzustellen, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten von mehr als zwei unabhängigen Gruppen bestehen, unter der Berücksichtigung der Variabilität innerhalb der Gruppen. Der Kruskal-Wallis-Test ermöglichte den Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Gruppen und war somit eine Alternative zum ANOVA-Test, wenn die Annahme der Normalverteilung nicht erfüllt wurden. Zusätzlich wurde der Vergleich der Ergebnisse der Survival-Analyse mit dem log-rank (Mantel-Cox, conservative) Test durchgeführt. Der log-rank Test ist speziell für den Vergleich der Überlebenszeiten von zwei oder mehr Gruppen im Zeitverlauf konzipiert und liefert Informationen über den Einfluss verschiedener experimenteller Bedingungen auf das Überleben der untersuchten Organismen. Durch die Kombination dieser statistischen Verfahren konnte eine umfassende und differenzierte Analyse der erhobenen Daten gewährleistet werden, die die Grundlage für die Schlussfolgerungen dieser Studie bildet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Infektion: Die Letalität der *G. mellonella* ist abhängig von der *S. Typhimurium* Injektionsdosis

Zu Beginn der Studie wurde die optimale Infektionsdosis ermittelt, um die Grundlage für die folgenden Versuche zu schaffen. Es war notwendig, eine subletale Dosis von *S. T.* zu identifizieren – eine Konzentration, die nahe an der letalen Grenze liegt und eine Immunantwort auslöst, ohne jedoch den Organismus *G. m.* zu töten. Gleichzeitig wurde die Infektionsdosis titriert, die eine hohe Mortalität verursacht. Dazu wurden *G. m.*-Larven PBS und verschiedenen Konzentrationen von *S. T.* injiziert und über fünf Tage hinweg beobachtet (Abb. 3).

Die systemische Infektion von *G. m.* mit *S. T.* führte bei den höchsten getesteten Injektionsdosen von  $10^9$  *S. T.*/ ml und  $10^8$  *S. T.*/ ml zu einer Letalität der Larven von 100 % bzw. 90 % innerhalb der ersten 24 Stunden des Beobachtungszeitraums. Die Injektionsdosis von  $10^7$  *S. T.*/ ml erwies sich als optimale letale Dosis, da die Larven schrittweise über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg starben, was zu einer Gesamtmortalität von 80 % führte. Bei einer Injektionsdosis von  $10^5$  *S. T.*/ ml überlebten alle 10 Larven, weshalb diese Konzentration als subletale Dosis für die Hauptversuche festgelegt wurde. Wie erwartet überlebten alle Larven, die als Kontrolle PBS injiziert bekamen.

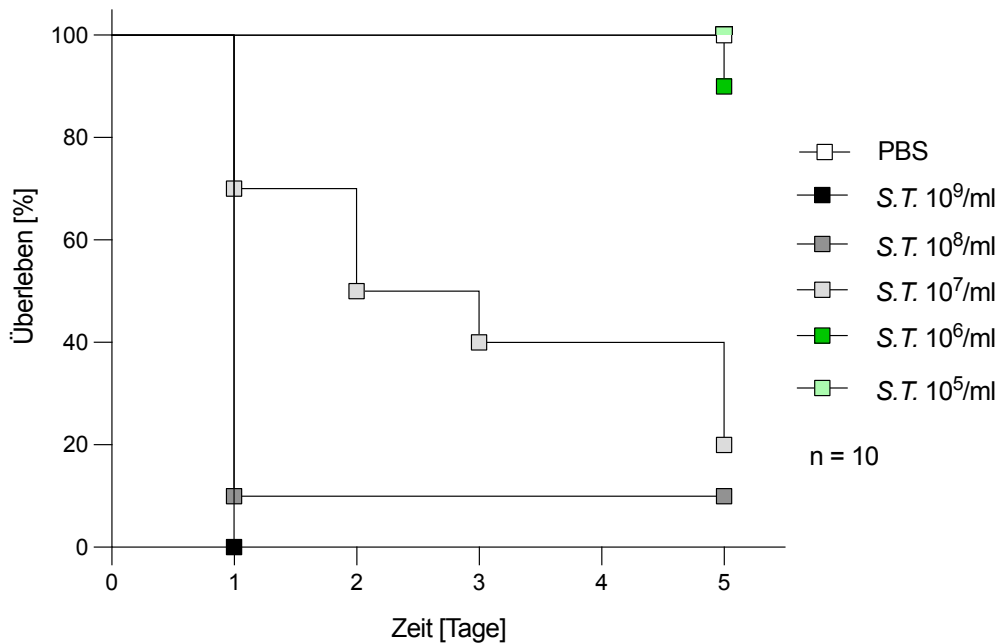


Abbildung 3: Dosisabhängiges Überleben von *G. m.*-Larven nach systemischer Infektion mit *S. T.* *G. m.* wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *S. T.* infiziert, 5 Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert und alle 24 Stunden auf das Überleben begutachtet. Als Kontrolle wurde *G. m.* PBS injiziert. Jede Versuchsgruppe bestand aus 10 Larven.

### 3.2 Survival-Analyse: *G. mellonella* mit Immune Priming überleben

Dieser Versuch zielte darauf ab, die Hypothese zu überprüfen, dass eine erste Infektion der *G. m.* Larven mit einer subletalen Dosis von  $10^5$  *S. T.*/ ml eine Immunantwort auslöst, die die Larven vor einer zweiten, normalerweise letalen Infektionsdosis von  $10^7$  *S. T.*/ ml schützt und somit die Überlebenschance signifikant erhöht. Dazu wurde eine Versuchsgruppe erstellt, bei der die Larven zunächst  $10^5$  *S. T.*/ ml injiziert bekamen und nach 24 Stunden eine zweite Injektion mit  $10^7$  *S. T.*/ ml erhielten. Zusätzlich wurden drei Kontrollgruppen eingeführt (Abb. 4).

Die Larven der Versuchsgruppe, die die Injektion von  $10^5$  *S. T.*/ ml gefolgt von  $10^7$  *S. T.*/ ml erhielten, zeigten eine Überlebensrate von 88,5 % (23/26). In der Kontrollgruppe, die zunächst PBS und anschließend die letale Dosis von  $10^7$  *S. T.*/ ml erhielt, überlebten nur 11,5 % (3/26) der Larven. Die auffallend große Differenz in der Mortalität zwischen diesen beiden Gruppen zeigt deutlich, dass die *G. m.*-Larven mit Immune Priming signifikant häufiger überlebten. Der

Unterschied war statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ). In der Kontrollgruppe, die zweimal PBS erhielt, überlebten 100 % der Larven, während in der Gruppe, die zuerst  $10^5$  *S. T./ ml* und anschließend PBS erhielt, 96 % (24/25) der Larven überlebten.

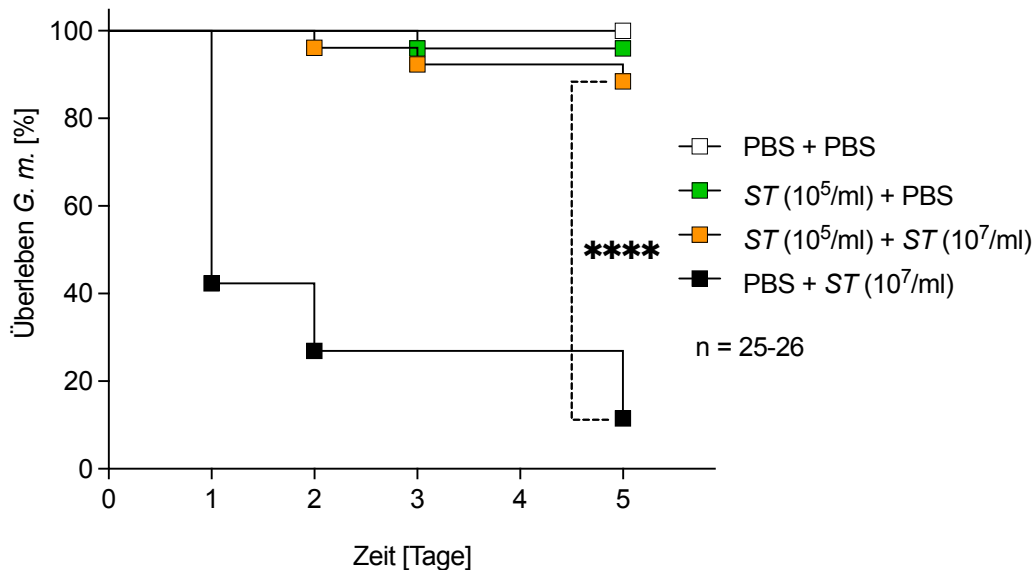


Abbildung 4: Survival-Analyse von *G. mellonella* nach systemischer Injektion einer subletalen und letalen Dosis von *S. Typhimurium*.

Den *G. m.*-Larven wurde eine erste Injektion von  $10^5$  *S. T./ ml* oder PBS und nach 24 Stunden eine zweite Injektion von  $10^7$  *S. T./ ml* oder PBS verabreicht. Zeitpunkt 0 Tage auf der X-Achse entspricht 0 Tage nach der zweiten Injektion. Die *G. m.*-Larven wurden für fünf Tage bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und auf das Überleben begutachtet. Es wurden 5 unabhängige Replikate mit 3-6 Tieren pro Experiment erstellt (insgesamt 25-26 Larven pro Gruppe). Die Unterschiede wurden mit dem Log-rank (Mantel Cox) Test statistisch ausgewertet. \*\*\*\* =  $P \leq 0,0001$ .

### 3.3 Quantifizierung: *S. Typhimurium* kann in *G. mellonella* mit Immune Priming nicht proliferieren

Um die Unterschiede in der Bakterienlast zwischen den Versuchsgruppen von *G. mellonella* zu ermitteln, wurden die CFU von *S. Typhimurium* in der Hämolymphe der Larven während des Infektionsverlaufs bestimmt (Abb. 5).

Nach einer einzelnen Injektion von  $10^5$  *S. T./ml* (entsprechend  $10^3$  Bakterien pro Larve bei einem Injektionsvolumen von  $10 \mu\text{l}$ ) zeigte sich lediglich ein geringfügiger Anstieg der Bakterienkonzentration in der Hämolymphe über einen

Zeitraum von 8 Stunden. Der höchste durchschnittliche CFU-Wert wurde 2 Stunden nach der Injektion mit  $1,16 \times 10^3$  CFU/10  $\mu$ l gemessen. Innerhalb von 24 Stunden reduzierte sich die Bakterienzahl auf einen durchschnittlichen Wert von 1,18 CFU/10  $\mu$ l Hämolymphe, wobei bei vier von elf Larven (4/11) die CFU/ $\mu$ l unterhalb der Nachweisgrenze lag, und daher wahrscheinlich von einer vollständigen Eradikation des Pathogens ausgegangen werden kann.

In der Kontrollgruppe, der zunächst PBS und anschließend  $10^7$  S. T./ml injiziert wurde, stieg die Bakterienlast in den ersten 8 Stunden nach der zweiten Injektion kontinuierlich von durchschnittlich  $7,03 \times 10^3$  auf  $4,75 \times 10^5$  CFU/10  $\mu$ l Hämolymphe an. Nach 24 Stunden wurde ein leicht reduzierter Wert von  $1,94 \times 10^5$  CFU/10  $\mu$ l gemessen. An diesem Zeitpunkt waren jedoch nur noch 2 von 14 Larven (2/14) am Leben und konnten ausgewertet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Versuchsgruppe, der zuerst  $10^5$  S. T./ml und nach 24 Stunden  $10^7$  S. T./ml injiziert wurde, keinen signifikanten Anstieg der CFU-Werte. Der höchste durchschnittliche Wert lag bei  $1,99 \times 10^2$  CFU/10  $\mu$ l 4 Stunden nach der zweiten Injektion. Innerhalb von 24 Stunden sank die Bakterienzahl drastisch auf 1,4 CFU/10  $\mu$ l, nahe der Nachweisgrenze, und lediglich eine Larve (1/15) verstarb. Der Unterschied in der Bakterienlast zwischen dieser Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe war statistisch signifikant ( $p = 0,0037$ ). In der Kontrollgruppe, die zuerst  $10^5$  S. T./ml und anschließend PBS injiziert bekamen, wurde nach 4 Stunden der zweiten Injektion ein unerwartet leichter Anstieg der Bakterienlast auf 53 CFU/10  $\mu$ l Hämolymphe beobachtet. Dieser Wert überschritt jedoch nicht die CFU-Werte der geprimten Versuchsgruppe und sank nach 24 Stunden wieder nahe an die Nachweisgrenze auf einen durchschnittlichen Wert von 4,6 CFU/10  $\mu$ l ab.

Die Ergebnisse dieser Quantifizierung zeigen, dass eine initiale subletale Infektion mit S. T. bei G. m. die Entwicklung einer hohen Keimlast nach einer Zweitinfektion mit einer letalen Dosis verhindert. Dies deutet darauf hin, dass das Immunsystem von G. m. in der Lage ist, durch Immune Priming eine schützende Antwort gegen eine sekundäre S. T.-Infektion aufzubauen.

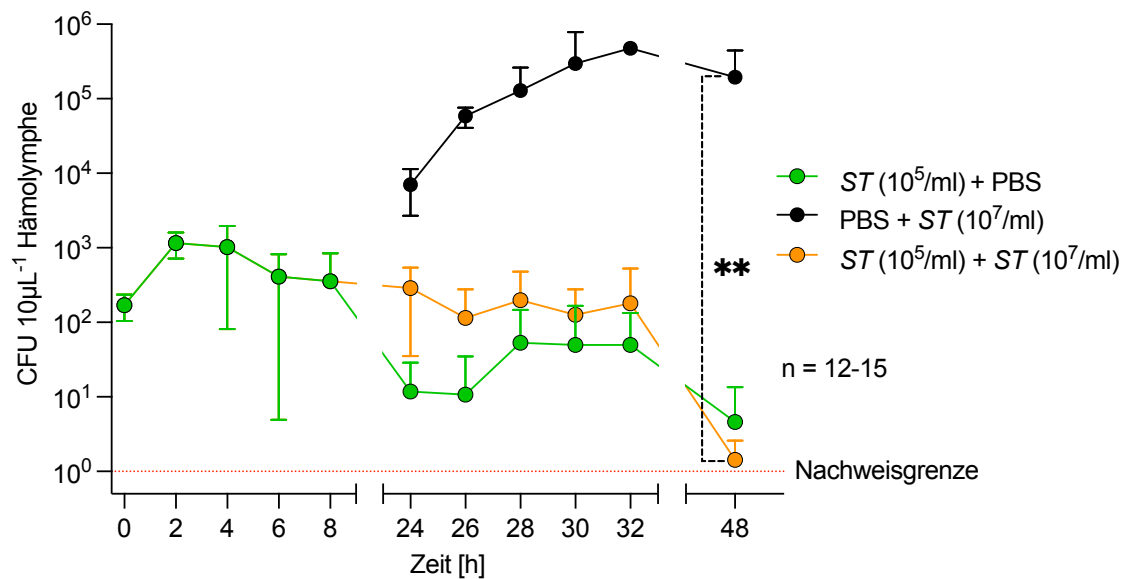


Abbildung 5: CFU aus *G. mellonella*-Hämolymphe nach einfacher oder zweifacher systemischer Infektion mit *S. Typhimurium*.

Darstellung von zwei verschiedenen Versuchen in einer Graphik. Den *G. m.*-Larven wurde eine subletale Dosis von  $10^5$  *S. T.*/ ml injiziert und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. In einem zweiten Experiment wurde den *G. m.*-Larven eine subletale Dosis von  $10^5$  *S. T.*/ ml oder PBS injiziert und nach 24 Stunden eine zweite letale Dosis von  $10^7$  *S. T.*/ ml oder PBS injiziert und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Entsprechend der Zeitreihe wurde den Larven bei beiden Versuchen nach 0, 2, 4, 6, 8 oder 24 Stunden Inkubation die Hämolymphe abgenommen, auf Blutagar ausplattiert und inkubiert. Nach 24 Stunden Wachstum der Bakterienkolonien wurden die CFU ausgezählt. Bei dem 48 h Wert von PBS +  $10^7$  *S. T.*/ ml waren nur noch 2 von 14 Larven am Leben. Zeitpunkt 0 h der X-Achse entspricht 0 h nach der einfachen Injektion von  $10^5$  *S. T.*/ ml in die *G. m.*-Larven. Zeitpunkt 24 h der X-Achse entspricht 0 h nach der zweiten Injektion der Doppelstimulation. Es wurden 2 unabhängige Replikate mit 5 und 10 Larven pro Experiment erstellt. Die Unterschiede wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und, weil die Daten nicht normalverteilt waren (Anzahl der Versuchstiere von PBS +  $10^7$  *S. T.*/ ml zu klein, da verstorben), mit dem Kruskal-Wallis-Test statistisch ausgewertet. \*\* =  $P \leq 0,01$ . Fehlerbalken sind zur Darstellung der Standardabweichung.

### **3.4 Hemmstofftest: Die Hämolymphe der *G. mellonella* mit Immune Priming hemmt die Proliferation von Bakterien**

In diesem Versuch wurde mit dem *Geobacillus stearothermophilus*-Hemmstofftest untersucht, wie sich die antimikrobiellen Eigenschaften in der *G. m.*-Hämolymphe unter verschiedenen Infektionsbedingungen verändern (Abb. 6).

Bereits nach einer Injektion mit PBS zeigte sich ein leichter Anstieg der antimikrobiellen Aktivität in der Hämolymphe, der nach 4 Stunden mit einem Maximum von 129 mm<sup>2</sup> seinen Höhepunkt erreichte, um anschließend wieder auf Werte nahe dem Ausgangsniveau von 102 mm<sup>2</sup>, wie bei nicht stimulierten Larven, abzusinken. Bei einer einzelnen Injektion von 10<sup>5</sup> S. *T.*/ml war hingegen eine kontinuierliche Zunahme der Hemmhof-Fläche von durchschnittlich 118 mm<sup>2</sup> unmittelbar nach der Injektion (0 Stunden) auf 189 mm<sup>2</sup> nach 24 Stunden zu beobachten. Dies deutet auf eine kontinuierliche Zunahme der antimikrobiellen Aktivität in der Hämolymphe hin. Ein Maximum dieser Aktivität wurde im Bereich von 0 bis 4 Stunden nach der zweiten Injektion festgestellt, gefolgt von einem allmählichen Rückgang. Bei den Larven, die zuerst 10<sup>5</sup> S. *T.*/ml und 24 Stunden später 10<sup>7</sup> S. *T.*/ml injiziert bekamen, war der Hemmhof unmittelbar nach der zweiten Injektion am größten und erreichte einen Maximalwert von 214 mm<sup>2</sup>. Dieser Wert nahm im Laufe der nächsten 24 Stunden kontinuierlich auf 168 mm<sup>2</sup> ab. Ähnlich verhielt sich die Hemmhofentwicklung bei der Kontrollgruppe, der zunächst 10<sup>5</sup> S. *T.*/ml und dann PBS injiziert wurde. Hier zeigte sich nach der ersten Injektion kaum ein Unterschied, ob die zweite Injektion mit PBS oder einer letalen Dosis von 10<sup>7</sup> S. *T.*/ml erfolgte. Die Kontrollgruppe, der zuerst PBS und dann 10<sup>7</sup> S. *T.*/ml injiziert wurde, zeigte innerhalb von 24 Stunden nach der zweiten Injektion eine Zunahme des Hemmhofes von 114 mm<sup>2</sup> nahe der Nachweisgrenze auf ein Maximum von 185 mm<sup>2</sup>. Ein signifikant unterschiedlicher antimikrobieller Effekt wurde zwischen den Gruppen 10<sup>5</sup> S. *T.*/ml + 10<sup>7</sup> S. *T.*/ml und PBS + 10<sup>7</sup> S. *T.*/ml festgestellt, insbesondere beim Vergleich der Hemmhofgrößen unmittelbar nach der zweiten Injektion ( $p = 0,0051$ ). Die Larven, die das Immune Priming durchlaufen hatten, zeigten eine ausgeprägte antimikrobielle Aktivität. Bemerkenswert ist, dass diese

Aktivität nach der eigentlich letalen Injektion von  $10^7$  S. T./ml nicht stagnierte oder anstieg, sondern sich der Hemmhof im weiteren Verlauf wieder verringerte.

Die Ergebnisse dieses Hemmstofftests deuten darauf hin, dass die antimikrobielle Aktivität in der Hämolymphe von *G. mellonella* nach einer subletalen Primärinfektion signifikant ansteigt. Diese verstärkte antimikrobielle Aktivität könnte eine entscheidende Rolle dabei spielen, die Mortalität der Larven nach einer letalen Sekundärinfektion deutlich zu reduzieren.

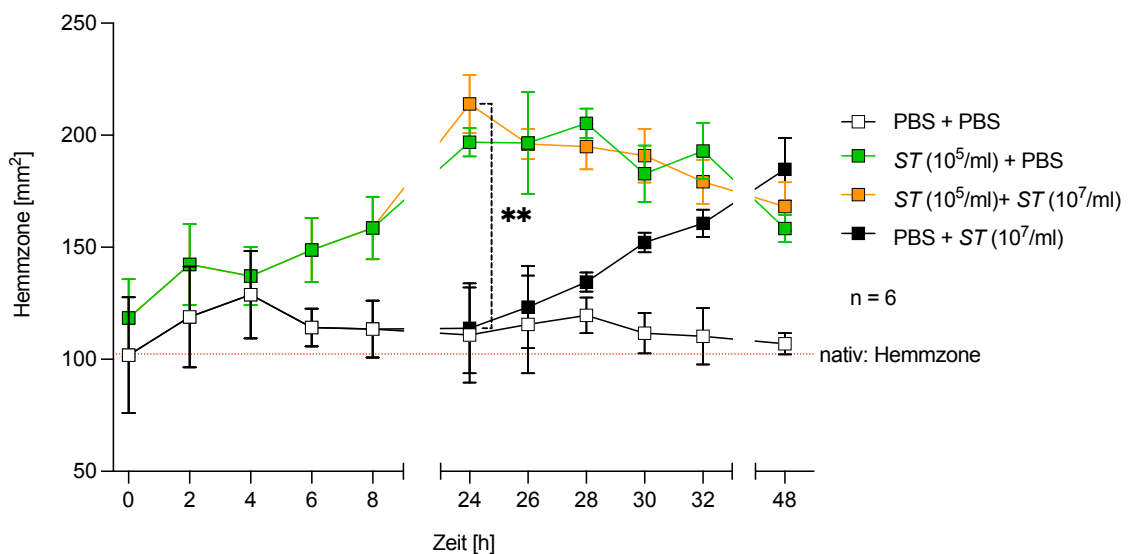


Abbildung 6: Hemmstofftest nach Kundrat zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen in der *G. mellonella* Hämolymphe nach einfacher oder zweifacher Infektion mit *S. Typhimurium*. Darstellung von zwei verschiedenen Versuchen in einer Graphik. Den *G. m.*-Larven wurde eine subletale Dosis von  $10^5$  S. T./ ml oder PBS injiziert und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. In einem zweiten Experiment wurde den *G. m.*-Larven eine subletale Dosis von  $10^5$  S. T./ ml oder PBS injiziert und nach 24 Stunden eine zweite letale Dosis von  $10^7$  S. T./ ml oder PBS injiziert und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Entsprechend der Zeitreihe wurde den Larven bei beiden Versuchen nach 0, 2, 4, 6, 8 oder 24 Stunden Inkubation die Hämolymphe abgenommen und auf Test-Agar nach Kundrat pipettiert und inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Hemmhöfe ausgemessen. Zeitpunkt 0 h der X-Achse entspricht 0 h nach der einfachen Injektion von  $10^5$  S. T./ ml oder PBS in *G. m.* Larven. Zeitpunkt 24 h der X-Achse entspricht 0 h nach der zweiten Injektion der Doppelstimulationen. Bei dem 48 h Wert von PBS +  $10^7$  S. T./ ml waren nur noch 3 von 6 Larven am Leben. Die Hemmzone ist ein Mittelwert der Hemmhöfe der nicht stimulierten *G. m.* Larven. Es wurden 2 unabhängige Replikate mit 3 Larven pro Versuchsreihe durchgeführt. Die Unterschiede wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und, weil die Daten nicht normalverteilt waren (n zu klein), dem Kruskal-Wallis-Test statistisch ausgewertet. \*\* =  $P \leq 0,01$ . Fehlerbalken sind zur Darstellung der Standardabweichung.

### **3.5 Genregulation nach Infektion: Die Injektion von *S. Typhimurium* in *G. mellonella*-Hämocoel bewirkt eine differentielle Expression antimikrobiell wirksamer Substanzen**

Um den Verlauf der Immunreaktion zu untersuchen, wurde die Genexpression von Genen bestimmt, die für antimikrobiell wirksame Substanzen (wie AMPs) kodieren. Zu den untersuchten Genen gehörten diejenigen, die für Cecropin, Gallerimycin, Galiomycin, Hemolin, IMPI, Gloverin, Lysozym, NOS und Apolipophorin kodieren.

Einige antimikrobielle Peptide können praktisch als Marker zur Überwachung des Verlaufs der Immunreaktion verwendet werden. Besonders hervorzuheben sind Cecropin, Gallerimycin, Galiomycin, Hemolin und IMPI, die in ihren Expressionsmustern konsistente Ergebnisse vorweisen konnten.

Bei diesen Genen zeigte sich in den ersten 6 Stunden nach der primären Injektion mit  $10^5$  *S. T.*/ml ein kontinuierlicher Anstieg der Genexpression, der bis zur Sekundärinfektion nach 24 Stunden wieder abnahm. Nach der letalen Infektion stieg die Genexpression der untersuchten Entzündungsmarker in den Gruppen mit Immune Priming teilweise langsamer und weniger stark an und erreichte nicht das Niveau der Primärinfektion mit  $10^5$  *S. T.*/ml. Der starke Anstieg der Genexpression während der primären Infektion scheint ausreichend zu sein, um eine durch die letale Injektion von  $10^7$  *S. T.*/ml ausgelöste Infektion abzuwehren. Besonders auffällig war der starke Anstieg der Genexpression von Gallerimycin und Galiomycin nach der ersten Injektion von  $10^5$  *S. T.*/ml.

Im Gegensatz dazu war die Immunantwort der Kontrollgruppe, die zuerst PBS erhielt, unzureichend, um die letale Infektion zu begrenzen. Dies zeigt sich daran, dass nach der letalen Infektion die Expression der untersuchten Gene kontinuierlich und stark anstieg, ähnlich wie nach der ersten Injektion mit  $10^5$  *S. T.*/ml. Wenn nach einer ersten Injektion mit  $10^5$  *S. T.*/ml die zweite Injektion PBS war, nahm die Genexpression im Vergleich noch weiter ab, was auf eine erfolgreiche Abwehr der Infektion hindeuten könnte.

Interessanterweise zeigte die einfache Injektion mit  $10^5$  *S. T.*/ml bei Galiomycin und Gallerimycin bereits zum Zeitpunkt 0 Stunden ein leicht

über den Werten der Referenzprobe (PBS) liegendes Expressionsniveau (Abb. 7).

Cecropin (Abb. 7): Auffällig ist der niedrige Ausgangswert der Kontrollgruppe PBS +  $10^7$  S. T./ml 0 Stunden nach der zweiten Injektion. Der Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne Immune Priming bei 0 Stunden nach der zweiten Injektion war signifikant ( $p = 0,0015$ ). Ebenso zeigten Gallerimycin (Abb. 7), Galiomycin (Abb. 7), Hemolin (Abb. 8) und IMPI (Abb. 8) signifikante Unterschiede zwischen diesen Versuchsgruppen bei 0 Stunden nach der zweiten Injektion ( $p = 0,0022$ ;  $p = 0,029$  und  $p = 0,0128$ ). Einzig die Genexpression von IMPI (Abb. 8) zeigte nach der zweifachen Stimulation in der Gruppe  $10^5$  S. T./ml + PBS im Vergleich zu  $10^5$  S. T./ml +  $10^7$  S. T./ml ein leicht erhöhtes Expressionsniveau im Verlauf.

Die Gene die für Gloverin, Lysozym, NOS und Apolipoporphin kodieren, zeigten inkongruente Ergebnisse und inkonsistente Verläufe der Genexpression nach den Injektionen.

Gloverin (Abb. 8): Nach der einfachen Stimulation mit  $10^5$  S. T./ml zeigte Gloverin einen ähnlichen Verlauf wie die zuvor beschriebenen AMPs und erreichte das höchste Expressionsniveau aller untersuchten AMPs mit einem Maximum von 10130-facher Expression nach 6 Stunden. Bei der zweifachen Stimulation waren die Genexpressionen in allen Gruppen ähnlich, zeigten jedoch einen deutlichen Abfall nach 2 Stunden, gefolgt von einem erneuten Anstieg nach 6 Stunden. Es konnte ein signifikanter Unterschied 0 h nach der zweiten Injektion festgestellt werden ( $p = 0,0089$ ). Der Verlauf der einfachen Injektion von  $10^5$  S. T./ml war inkongruent im Vergleich zur Versuchsgruppe PBS +  $10^7$  S. T./ml. Auffällig war, dass die Gruppe PBS +  $10^7$  S. T./ml bereits zum Zeitpunkt 0 Stunden nach der letalen Dosis eine 392,72-fach erhöhte Genexpression aufwies, obwohl die Larven zuvor nur mit PBS stimuliert wurden. Darüber hinaus zeigte die einfache Injektion mit  $10^5$  S. T./ml bereits zum Zeitpunkt 0 Stunden ein Expressionsniveau, das deutlich über den Werten der Referenzprobe (PBS) lag.

Lysozym (Abb. 9): Bei Lysozym wurden, mit Werten unter der 10-fach erhöhten Expression innerhalb von 6 Stunden, keine signifikanten Unterschiede in der

Expression festgestellt. Allerdings zeigte die Gruppe  $10^5$  S. T./ml + PBS 0 Stunden nach der zweiten Injektion eine auffällige, 80-fach erhöhte Expression im Vergleich zu  $10^5$  S. T./ml +  $10^7$  S. T./ml, obwohl beide Gruppen vor der zweiten Injektion die gleiche Stimulation erhielten.

NOS (Abb. 9): NOS zeigte nach einfacher Stimulation keinen Anstieg der Expression und blieb unterhalb der Werte der Referenzprobe (PBS). Bei der zweifachen Stimulation stieg die Expression in der Kontrollgruppe PBS +  $10^7$  S. T./ml kontinuierlich auf das 20-fache an, während die Gruppe mit Immune Priming konstant bei etwa 1-fach blieb.

Apolipoprotein (Abb. 9): In den Versuchsgruppen wurden keine deutlichen Veränderungen bei insgesamt niedrigen Genexpressionen beobachtet, abgesehen von einem leichten Abfall im Verlauf von 6 Stunden nach der zweiten Injektion in der Kontrollgruppe PBS +  $10^7$  S. T./ml.

Die Genexpressionsanalysen nach der einmaligen Stimulation von *Galleria mellonella* mit  $10^5$  S.T./ml der Gene, die für NOS und IMPI kodieren, wurden von Dr. Lisa Nagel generiert (Nagel, 2024) und in dieser Studie im Kontext des Immune Priming bei zweifacher Stimulation analysiert (Abb. 8, Abb. 9).

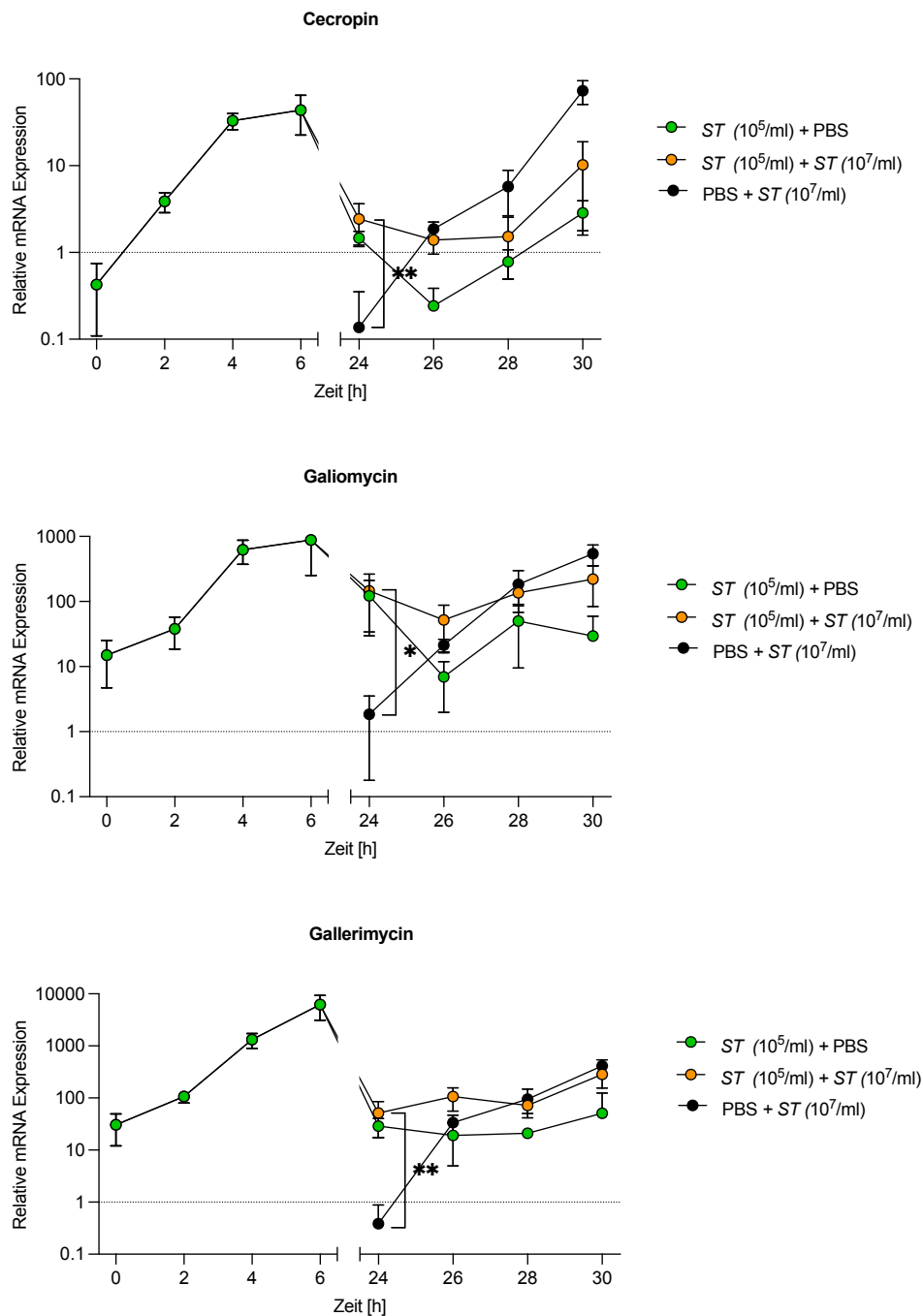


Abbildung 7: *S. Typhimurium* induzierte RNA-Expressionen in *G. mellonella* der Gene für Cecropin, Galiomycin und Gallerimycin im Zeitverlauf. Darstellung von zwei verschiedenen Versuchen in einer Graphik. Abgebildet sind die Genexpressionen nach einfacher Stimulation mit  $10^5$  *S. T.*/ ml und nach zweifacher Stimulation. Bei der zweifachen Injektion wurde zunächst eine subletale Dosis von  $10^5$  *S. T.*/ ml oder PBS injiziert, gefolgt von einer zweiten Injektion mit einer letalen Dosis von  $10^7$  *S. T.*/ ml oder PBS nach 24 Stunden. Die relative Genexpression wurde in beiden Versuchen nach 0, 2, 4 oder 6 Stunden mittels qRT-PCR bestimmt. Der Zeitpunkt 0 h der X-Achse entspricht 0 Stunden nach der einfachen Stimulation mit  $10^5$  *S. T.*/ ml. Der Zeitpunkt 24 h der X-Achse entspricht 0 Stunden nach der zweiten Injektion der Doppelstimulation. Die Genexpression wurde relativ zur Expression bei der Stimulation mit PBS für jeden Zeitpunkt berechnet. Es wurden 6-8 Larven pro Versuchszeitpunkt verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests und der ANOVA. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. \* =  $P \leq 0,05$ ; \*\* =  $P \leq 0,01$ . Fehlerbalken sind zur Darstellung der Standardabweichung.

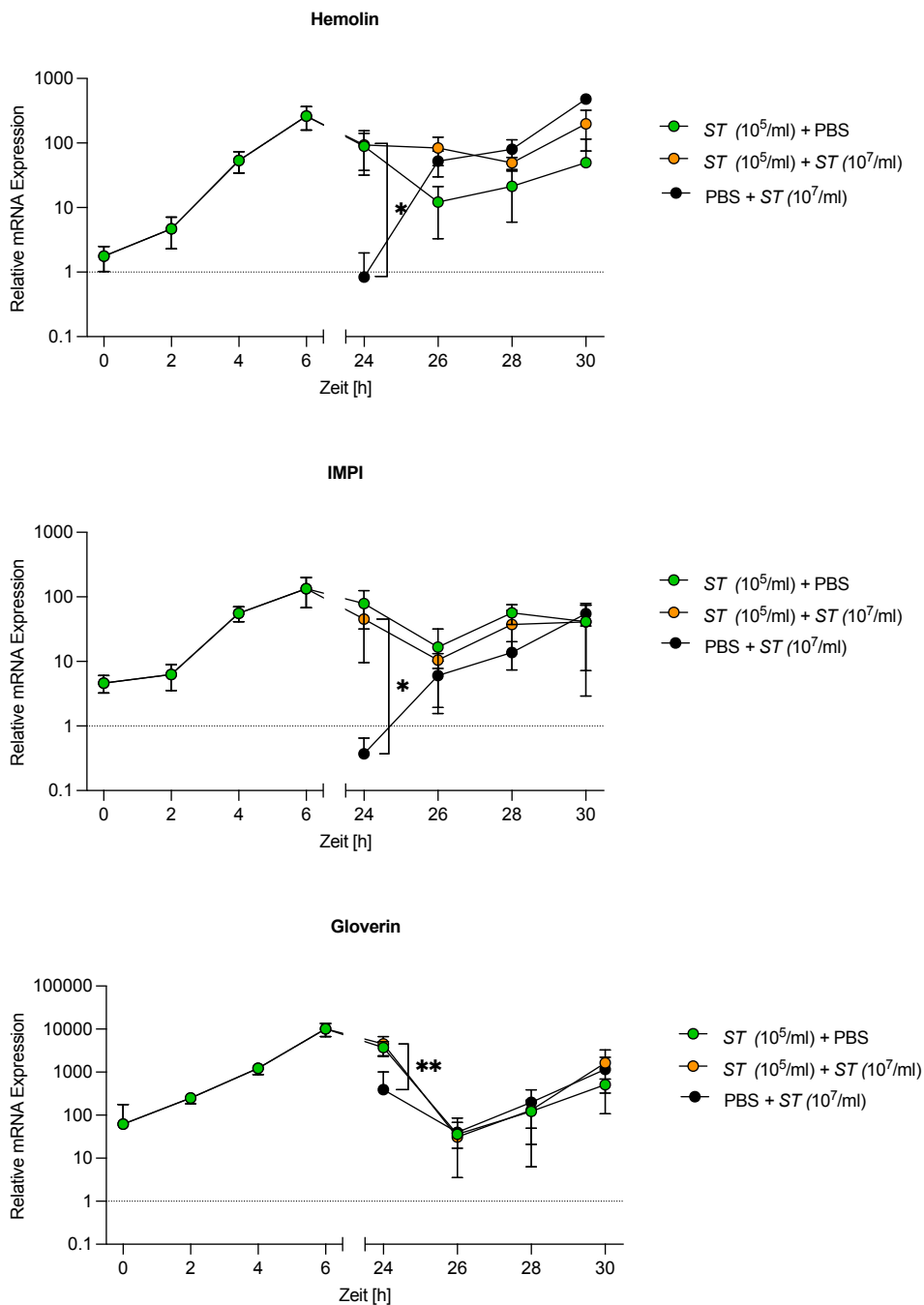


Abbildung 8: *S. Typhimurium* induzierte RNA-Expressionen in *G. mellonella* der Gene für Hemolin, IMPI und Gloverin im Zeitverlauf. Darstellung von zwei verschiedenen Versuchen in einer Graphik. Abgebildet sind die Genexpressionen nach einfacher Stimulation mit  $10^5$  *S. T./* ml und nach zweifacher Stimulation. Bei der zweifachen Injektion wurde zunächst eine subletale Dosis von  $10^5$  *S. T./* ml oder PBS injiziert, gefolgt von einer zweiten Injektion mit einer letalen Dosis von  $10^7$  *S. T./* ml oder PBS nach 24 Stunden. Die relative Genexpression wurde in beiden Versuchen nach 0, 2, 4 oder 6 Stunden mittels qRT-PCR bestimmt. Der Zeitpunkt 0 h der X-Achse entspricht 0 Stunden nach der einfachen Stimulation mit  $10^5$  *S. T./* ml. Der Zeitpunkt 24 h der X-Achse entspricht 0 Stunden nach der zweiten Injektion der Doppelstimulation. Die Genexpression wurde relativ zur Expression bei der Stimulation mit PBS für jeden Zeitpunkt berechnet. Es wurden 6-8 Larven pro Versuchszeitpunkt verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests und der ANOVA. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. \* =  $P \leq 0,05$ ; \*\* =  $P \leq 0,01$ . Fehlerbalken sind zur Darstellung der Standardabweichung. IMPI  $10^5$  *S. T./* ml wurde generiert von L. Nagel (2024).

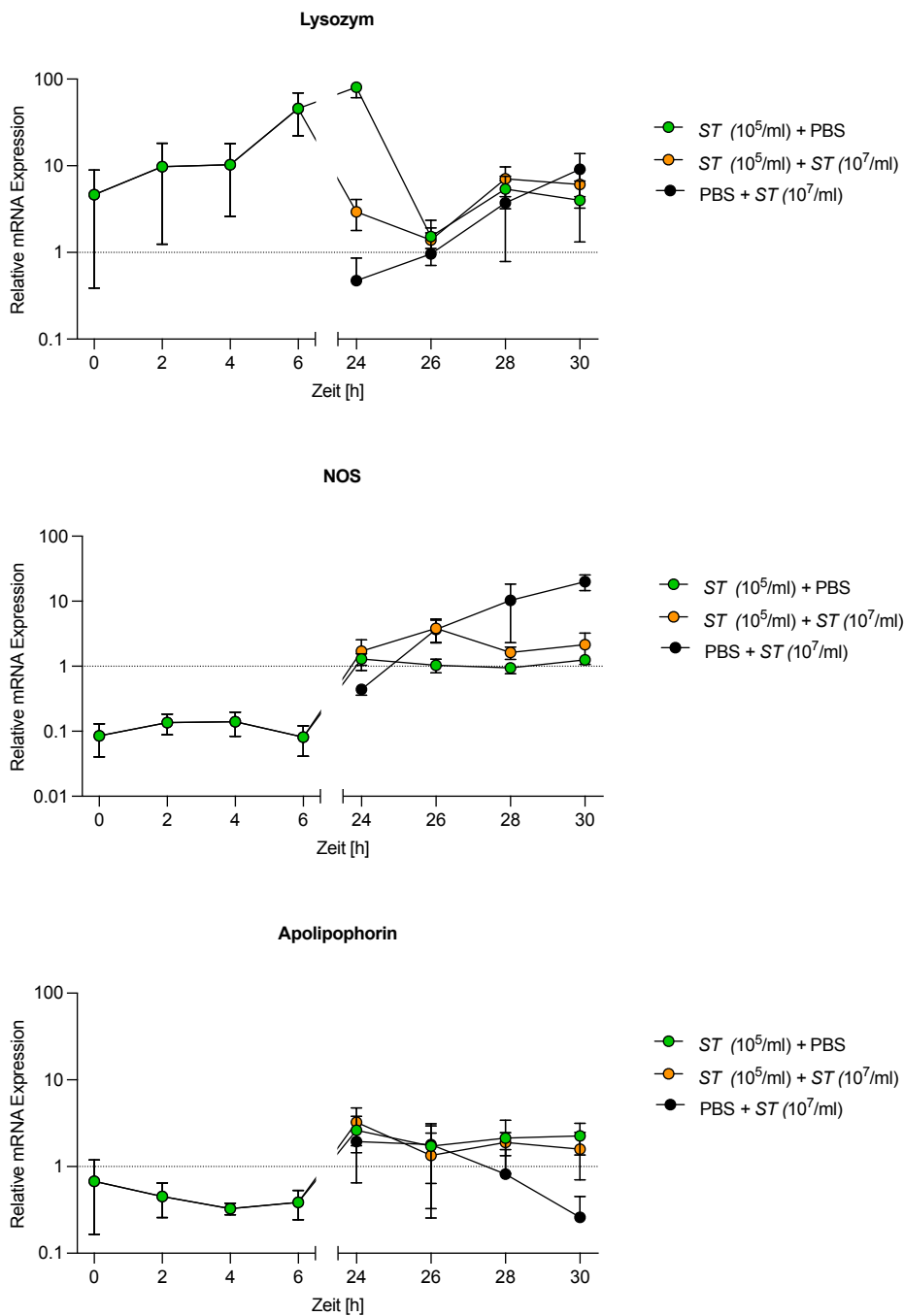


Abbildung 9: *S. Typhimurium* induzierte RNA-Expressionen in *G. mellonella* der Gene für Lysozym, NOS, und Apolipoporphin im Zeitverlauf. Darstellung von zwei verschiedenen Versuchen in einer Graphik. Abgebildet sind die Genexpressionen nach einfacher Stimulation mit 10<sup>5</sup> *S. T./* ml und nach zweifacher Stimulation. Bei der zweifachen Injektion wurde zunächst eine subletale Dosis von 10<sup>5</sup> *S. T./* ml oder PBS injiziert, gefolgt von einer zweiten Injektion mit einer letalen Dosis von 10<sup>7</sup> *S. T./* ml oder PBS nach 24 Stunden. Die relative Genexpression wurde in beiden Versuchen nach 0, 2, 4 oder 6 Stunden mittels qRT-PCR bestimmt. Der Zeitpunkt 0 h der X-Achse entspricht 0 Stunden nach der einfachen Stimulation mit 10<sup>5</sup> *S. T./* ml. Der Zeitpunkt 24 h der X-Achse entspricht 0 Stunden nach der zweiten Injektion der Doppelstimulation. Die Genexpression wurde relativ zur Expression bei der Stimulation mit PBS für jeden Zeitpunkt berechnet. Es wurden 6-8 Larven pro Versuchszeitpunkt verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests und der ANOVA. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Fehlerbalken sind zur Darstellung der Standardabweichung. NOS 10<sup>5</sup> *S. T./* ml wurde generiert von L. Nagel (2024).

### **3.6 Immune Priming beeinflusst die Anzahl der Immunzellen in *G. mellonella*-Hämolymphe**

Um die zelluläre Immunantwort der *G. m.*-Larven auf die Stimulation mit *S. T.* zu untersuchen und deren Rolle im Rahmen des Immune Priming zu charakterisieren, wurde die Anzahl der Hämozyten in der Hämolymphe lichtmikroskopisch bestimmt. Es wurde angenommen, dass die Unterschiede in der Survival-Analyse mit der differentiellen Anzahl der Hämozyten in Zusammenhang stehen könnten.

Bei der einfachen Stimulation, sowohl mit  $10^5$  *S. T.*/ml als auch mit PBS, stieg die Hämozytenzahl nach 24 Stunden auf etwa 250.000 Hämozyten pro 10  $\mu$ l Hämolymphe an. Dies weist darauf hin, dass eine Immunantwort in den Larven ausgelöst wurde, unabhängig davon, ob ein Pathogen injiziert wurde oder nicht. Auffällig ist der Verlauf in der Kontrollgruppe, die nur PBS injiziert bekam: Hier stieg die Hämozytenzahl schnell innerhalb von zwei Stunden auf eine mittlere Anzahl von 175.069 Zellen an, fiel dann nach 8 Stunden auf 107.069 Zellen ab und erreichte nach 24 Stunden den Höchstwert von 241.358 Zellen.

Bei der zweifachen Stimulation zeigten die Kontrollgruppen PBS + PBS und  $10^5$  *S. T.*/ml + PBS unerwartet die höchsten mittleren Hämozytendichten. Diese erreichten 6 Stunden nach der zweiten Injektion ihren Maximalwert mit 194.071 bzw. 274.464 Hämozyten pro 10  $\mu$ l Hämolymphe. Im Gegensatz dazu nahm die Hämozytenzahl in der Versuchsgruppe, der zuerst  $10^5$  *S. T.*/ml und 24 Stunden später  $10^7$  *S. T.*/ml injiziert wurde, innerhalb von 6 Stunden nach der zweiten Injektion kontinuierlich ab und erreichte ein Minimum von 105.156 Hämozyten pro 10  $\mu$ l, ein Wert nahe der Hämozytenzahl von nativen, nicht stimulierten Larven. Bei der Kontrollgruppe PBS +  $10^7$  *S. T.*/ml sank die Hämozytenzahl innerhalb der ersten zwei Stunden nach der zweiten Injektion rasch auf 104.583 Hämozyten pro 10  $\mu$ l und blieb anschließend bis zum Ende der Beobachtungszeit von 24 Stunden im Bereich der Hämozytenzahl der nativen Larven.

Zusammenfassend lässt sich in dieser Studie feststellen, dass die Hämozytenzahlen in den Larven ohne Immune Priming (PBS +  $10^7$  *S. T.*/ml) im Vergleich zur Versuchsgruppe mit Immune Priming ( $10^5$  *S. T.*/ml +  $10^7$  *S. T.*/ml)

zwar tendenziell niedriger ausfielen, jedoch keine gravierenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen ermittelt werden konnten. Bei insgesamt hohen Standardabweichungen der aufgezeichneten Daten konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

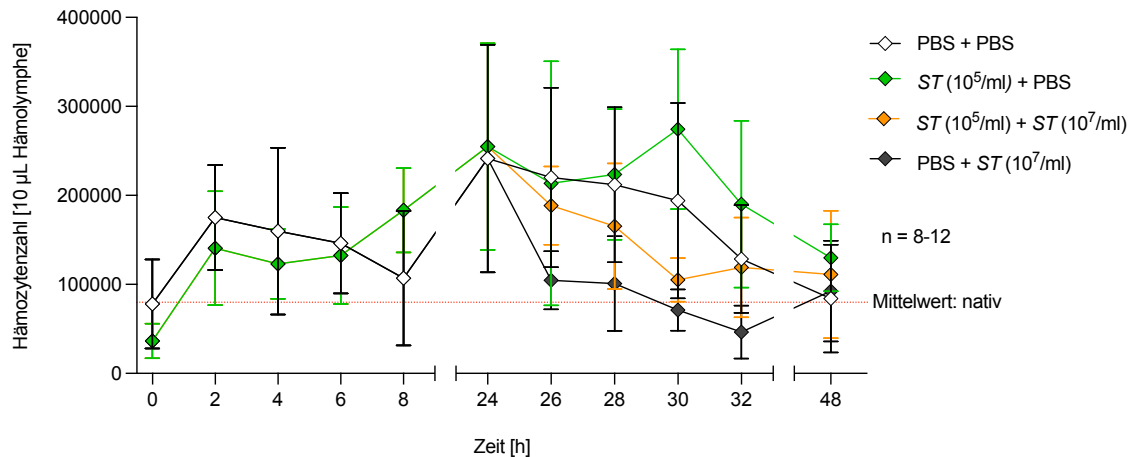


Abbildung 10: Bestimmung der Hämozytenzahl in *G. mellonella*-Hämolymphe nach einfacher und zweifacher Infektion mit *S. Typhimurium*.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse zweier Experimente in einer Grafik. Im ersten Experiment wurde den Larven von *G. mellonella* eine subletale Dosis von  $10^5$  *S. T.*/ ml oder PBS injiziert. Im zweiten Experiment erhielten die Larven zunächst eine subletale Dosis von  $10^5$  *S. T.*/ ml oder PBS, gefolgt von einer letalen Dosis von  $10^7$  *S. T.*/ ml oder PBS nach 24 h. Die Hämolymphe wurde zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden entnommen und die Hämozyten wurden unter einem Lichtmikroskop manuell ausgezählt. Auf der X-Achse entspricht der Zeitpunkt 0 h dem Zeitpunkt unmittelbar nach der ersten Injektion, während der Zeitpunkt 24 h dem Zeitpunkt unmittelbar nach der zweiten Injektion in der Doppelstimulation entspricht. Es ist zu beachten, dass zum Zeitpunkt 48 Stunden in der Gruppe PBS +  $10^7$  *S. T.*/ ml nur noch 4 von 7 Larven überlebten. Die Experimente wurden in zwei unabhängigen Replikaten mit jeweils 3 und 5 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Fehlerbalken sind zur Darstellung der Standardabweichung.

### 3.6.1 PBS in *G. mellonella*-Hämocoel induziert nicht den Anstieg der Hämozytenanzahl

Im vorherigen Experiment (siehe Abb. 10) wurde beobachtet, dass die Injektion von PBS einen starken Anstieg der Hämozytendichte in der Hämolymphe von *G. m.* induzierte. Um diese Beobachtung zu validieren, wurde ein Vergleichsexperiment durchgeführt. Hierbei wurde die Veränderung der Hämozytendichte nach einer PBS-Injektion mit derjenigen nach einer bloßen Punktion des Hämocoels, ohne Injektion von Flüssigkeit, verglichen. Zusätzlich wurde die Hämozytenzahl in 6 nativen Larven bestimmt, um Referenzwerte zu generieren.

Sowohl die PBS-Injektion als auch die bloße Punktion des Hämocoels führten zu einem deutlichen Anstieg der Hämozytenzahl in der Hämolymphe von *G. m.* (Abb. 11). Zwei Stunden nach der Stimulation erreichte die Hämozytenzahl ihren Höchstwert mit einem Durchschnitt von 233.333 Hämozyten pro 10  $\mu$ l Hämolymphe bei der PBS-Injektion und 197.375 Hämozyten pro 10  $\mu$ l bei der reinen Punktion. Danach nahm die Hämozytenzahl innerhalb von 8 Stunden wieder ab und näherte sich den Mittelwerten der unbehandelten Larven an. Die nicht stimulierten Larven wiesen unmittelbar nach der Entnahme einen durchschnittlichen Hämozytenwert von 79.875 pro 10  $\mu$ l Hämolymphe auf, wobei die Werte zwischen 52.000 und 116.500 Hämozyten variierten.

Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Hämozytenzahlen nach der PBS-Injektion und der bloßen Punktion des Hämocoels festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass der beobachtete Anstieg der Hämozytenzahl möglicherweise eher auf den mechanischen Eingriff selbst als auf die PBS-Injektion zurückzuführen ist. Zudem wurden sehr hohe Standardabweichungen in den gemessenen Hämozytenzahlen festgestellt, was die Variabilität der Hämozytendichte in den Larven widerspiegelt.

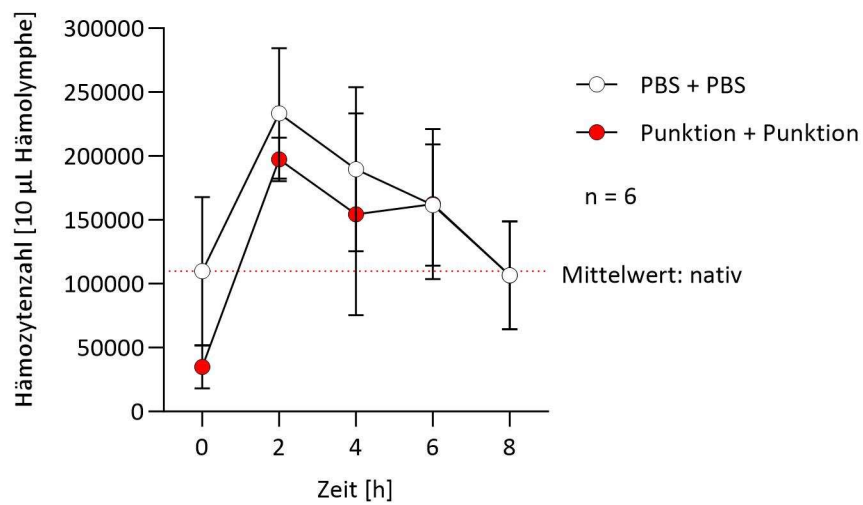


Abbildung 11: Vergleich der *G. mellonella*-Hämozytenzahl bei Injektion mit PBS und Punktion des Hämocoel.

Den *G. m.*-Larven wurde PBS injiziert oder es wurde mit einer Kanüle das Hämocoel punktiert. Entsprechend der Zeitreihe wurde den Larven nach 0, 2, 4, 6 oder 8 h Inkubation die Hämolymphe abgenommen, in IPS verdünnt und mit dem Lichtmikroskop visuell ausgezählt. Es wurden 6 Tiere pro Versuchsgruppe verwendet. Der Mittelwert der nativen Larven betrug 109850. Fehlerbalken sind zur Darstellung der Standardabweichung.

## 4 Diskussion

Mit der vorliegenden Studie konnten wir nachweisen, dass ein Immune Priming der *Galleria mellonella* mit einer nicht letalen Dosis von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium vor einer 24 Stunden später injizierten letalen *S. T.*-Dosis schützt. Die Larven mit Immune Priming zeigen eine erhöhte Überlebensrate, eine geringere Erregerlast und eine erhöhte antimikrobielle Aktivität in der Hämolymphe im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Potenzielle Erklärungen für den Schutz der *G. m.*, 24 bis 48 Stunden nach dem Immune Priming, bieten die erhöhte Präsenz humoraler Faktoren (erhöhte Genexpression immunrelevanter Peptide und Proteine) und zellulärer Immunparameter (Hämozytendichte) als Mechanismen des Immune Priming.

### 4.1 Überleben der *G. mellonella* nach *S. Typhimurium* Infektion

Unsere Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Konzentrationen der humanpathogenen Erreger getestet werden müssen, um die individuelle Konzentration des Pathogens herauszufiltern, die effizient den Schutzmechanismus des Immune Priming auslösen. In der Survival-Analyse der einfachen Infektion zur Bestimmung der subletalen und letalen Infektionsdosis wird ersichtlich, dass die Dosis der Infektion mit der Mortalität der Larven korreliert. Einzig bei einer Injektion von  $10^5$  *S. T.*/ ml überlebten alle Larven. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei einer Infektion der *G. m.* mit  $10^5$  *S. T.*/ ml kein unwiederbringlicher Schaden entstanden ist und sich die *G. m.* erfolgreich gegen die Infektion behaupten konnten. Wu et al. (2014) konnten in ihrer Studie mit dem für Insekten tödliche *Photorhabdus luminescens* nachweisen, dass die Dosis des Immune Priming wesentlich am Schutz vor einer Infektion beteiligt ist. Dabei korrelierte die Höhe der Dosis des Immune Priming sowohl mit dem Überleben der Larven nach einer späteren Injektion als auch mit der Dauer der Schutzwirkung durch das Immune Priming.

Survival-Analysen in einem *Galleria mellonella*-Infektionsmodell mit einem Wildtyp-Stamm der *Salmonella* Typhimurium SL1344 wurden bereits in vergangenen Studien gewonnen (Viegas et al., 2013). Sie beschreiben *G. m.* auch als valides Infektionsmodell für die Charakterisierung der Virulenzfaktoren

von *S. T.*-Stämmen. Auch unsere ergänzenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass *G. m.* für Experimente mit *S. T.* ein stabiles Versuchsmodell ist.

#### **4.2 Überleben der *G. mellonella* mit Immune Priming**

In der vorliegenden Studie bot eine Vorabinjektion einer nicht letalen Dosis des humanen Pathogens *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium bei der Larve *Galleria mellonella* eine protektive Wirkung gegen eine eigentlich letale *S. T.*-Infektion. Dieses Ergebnis bestätigt unsere Hypothese, dass auch der obligat humanpathogene Erreger *S. T.* den Mechanismus des Immune Priming bewirken kann. Vergleichbare Studien mit ähnlichen Ergebnissen bei denen die *G. m.* mit Immune Priming eine schützende Wirkung aufbauten, wurden bereits mit dem opportunistischen humanen Erreger *Candida albicans* (Bergin et al., 2006), das für Insekten tödliche *Photobacterium luminescens* (Wu et al., 2014) und *Bacillus thuringiensis* (Taszwłow et al., 2017) durchgeführt. Zusätzlich führten Scalfaro et al. (2017) eine Studie mit humanpathogenen Erregern wie enteropathogene *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium nach der Vorabbehandlung der *G. m.* mit den Probiotika *Lactobacillus rhamnosus* und *Clostridium butyricum* durch. Ein aktivierender Einfluss auf das Immunsystem der Larve wird als Schutzfaktor beschrieben. Dazu gehören die Produktion antibakterieller Eigenschaften und die Erhöhung der Hämozytendichte (Scalfaro et al., 2017).

Es gibt inzwischen zahlreiche Studien, bei denen eine Vorabexposition der *G. m.* mit diversen abgeschwächten, vorbehandelten oder probiotischen Erregern oder Stoffen (wie LPS) die Larven vor einer anschließend letalen Bakterien- oder Pilz-Infektion schützten (Browne et al., 2014, de Oliveira et al., 2017, Rossoni et al., 2017, Barros et al., 2019, Huang et al., 2020). Dabei kamen alle Autoren und Autorinnen zu derselben Schlussfolgerung: Eine Vorabexposition löst protektive immunmodulatorische Mechanismen aus, die die *G. m.* vor einer letalen Infektion schützen.

#### **4.3 Effektive Clearance der *S. Typhimurium***

Unsere Versuche zeigen, dass das Überleben der infizierten *G. m.* mit der Clearance der *S. T.* im Organismus assoziiert ist. Die Larven mit Immune Priming

sind in der Lage, die *S. T.*-Proliferation nach der Injektion von  $10^7$  *S. T.*/ ml im Verlauf effektiv zu inhibieren und 24 Stunden nach der Infektion die *S. T.*-Population annähernd zu eliminieren. Im Vergleich dazu, kann in der Kontrollgruppe PBS + *S. T.* eine starke Vermehrung der *S. T.* beobachtet werden, sodass ein statistischer Unterschied zwischen diesen Gruppen ermittelt werden konnte. Hier muss angemerkt werden, dass nur 2 von 6 Larven den Zeitpunkt 24 Stunden nach der hohen Injektionsdosis überlebten. Die bakterielle Belastung in verstorbenen *G. m.* wurde nicht erfasst. Die statistische Auswertung war nur begrenzt möglich bei einer geringen Anzahl an vitalen Versuchstieren.

Unsere Studie untermauert ähnliche Versuchsaufbauten mit anderen Erregern. Wu et al. (2016b) konnten nachweisen, dass ein Immune Priming von *G. m.* mit hitzegetöteten *Photobacterium luminescens* 48 Stunden vor einer Infektion mit einer letalen Dosis von *P. luminescens* zu einer signifikant niedrigeren Bakterienzeldichte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe führte. Andere Studien arbeiteten mit bakteriellen Probiotika (*Lactobacillus rhamnosus* und *Lactobacillus paracasei*) als Immune Priming vor einer Infektion mit *Candida albicans*. Sie verzeichneten in den Hämolymphekulturen der *G. m.* ebenfalls ein statistisch signifikant geringeres Wachstum des Pathogens im Vergleich zu den unbehandelten Larven (de Oliveira et al., 2017, Rossoni et al., 2017).

#### **4.4 Bakterizide Wirkung der Hämolymphe in vitro**

Zur Detektion antimikrobieller Aktivität in der Hämolymphe der infizierten *G. mellonella* wurde ein „disc diffusion assay“ angewendet, basierend auf dem von Kundrat (1968) entwickelten Hemmstofftest.

In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von *G. m.* mit *S. T.* zu einer signifikanten Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität in der Hämolymphe führte. Diese antibakterielle Eigenschaft nahm im Verlauf der Zeit nach der Inokulation zu und erreicht 24 Stunden nach dem Immune Priming ein Maximum. Dadurch konnte 0 Stunden nach der letalen Injektion ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe ermittelt werden. Dies bedeutet, dass die Hämolymphe von Larven, die einem Immune Priming unterzogen wurden, bereits vor der letalen Dosis von *S. T.* eine erhöhte antimikrobielle

Eigenschaft aufwiesen. Dieser Effekt könnte einen wichtigen Überlebensvorteil darstellen, der durch das Immune Priming vermittelt wurde. Die Fähigkeit von *G. m.*, nach dem Immune Priming eine antimikrobielle Aktivität zu entwickeln, korreliert mit der Reduktion der Pathogenbelastung in der Hämolymphe und dem verbesserten Überleben der Larven nach einer letalen Infektionsdosis.

Das Immune Priming mit *S. T.* führt eindeutig zu einer verstärkten antimikrobiellen Aktivität, die auch die Proliferation von *Geobacillus stearothermophilus* hemmt. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine initiale Infektion das angeborene Immunsystem zu einer unspezifischen protektiven Antwort stimuliert, die vor verschiedenen pathogenen Erregern schützen könnte. Eine frühere Studie von Scalfaro et al. (2017) untersuchte die Rolle der potenziellen Probiotika *Lactobacillus rhamnosus* und *Clostridium butyricum Miyairi* als Immune Priming und deren schützende Wirkung auf das Immunsystem gegen die gastrointestinalen Erreger EHEC (enteropathogene *Escherichia coli*), *Listeria monocytogenes* und *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Die Studie zeigte, dass die Vorbehandlung mit diesen Bakterien eine unspezifische Immunantwort in den Larven auslöst, die sowohl die Überlebensrate erhöht als auch die Hämozytendichte signifikant steigert (Scalfaro et al., 2017). Es stellt sich die Frage, inwiefern eine unspezifische Immunantwort der *G. m.* durch erregerspezifische Mechanismen ergänzt wird, die es dem Wirt ermöglichen, Pathogene zu erkennen und gezielte Abwehrreaktionen einzuleiten.

Um zu verstehen, wie spezifisch der Schutz nach einer Erstinfektion ist, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Es bleibt zu klären, ob das Immune Priming gegen ein bestimmtes Pathogen einen spezifischen Schutz bietet oder ob es allgemein gegen ein breites Spektrum von Erregern wirkt. Die detaillierte Charakterisierung dieser Schutzwirkung wäre von großem Interesse.

Außerdem ist derzeit unklar, inwieweit *Salmonella enterica*, ein obligat humanpathogener Erreger, in der Umwelt von *G. mellonella* vorkommt und ob gegenseitig spezifische Virulenzfaktoren des Bakteriums oder Abwehrmechanismen des Insekts evolutionär entwickelt wurden. In einer Studie

in der *G. mellonella* mit dem opportunistischen Erreger *Candida albicans* infiziert wurde, vermuteten Vertyporokh et al. (2020), dass allgemeine Virulenzfaktoren dem Erreger die Infektion des Wirts ermöglichen, während allgemeine Verteidigungsmechanismen der *G. mellonella* zur erfolgreichen Bekämpfung des Pathogens beitragen (Vertyporokh et al., 2020).

#### **4.5 Zelluläre Abwehr - Hämocyten**

In vorangehenden Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit pathogener Stimuli im Hämocoel die Anzahl der Hämocyten in *G. m.* verändert. Zudem wurde festgestellt, dass die Hämocyten-dichte als Indikator für eine Infektion herangezogen werden kann (Mowlds et al., 2010, Bergin et al., 2003). In unserer Arbeit haben wir einen Anstieg der Hämocyten-dichte als eine Reaktion auf ein Immune Priming und eine Infektion beobachtet. Es ist vorwegzunehmen, dass auf Grund der hohen Standardabweichungen keine signifikanten Ergebnisse der verschiedenen Testreihen ermittelt werden konnten. Es ließen sich lediglich unterschiedliche Tendenzen der Versuchsgruppen analysieren.

In einer Studie von Barros et al. (2019) ließen sich signifikante Unterschiede des Anstiegs der Hämocyten-dichte beim Immune Priming mit *Bacillus subtilis* und *Bacillus atrophaeus* und deren Sporen im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) erzielen. Wu et al. (2016b) konnten zusätzlich eine positive Korrelation zwischen der Dosis der Stimulation des Immune Priming und der Anzahl der Hämocyten aufzeigen (Wu et al., 2016b). In unserer Studie können wir bis einschließlich 24 Stunden nach der Injektion keine signifikanten Unterschiede der Hämocyten-dichte zwischen der Stimulation mit  $10^5$  *S. T.*/ ml als Immune Priming und der Kontrolle mit PBS ermitteln. Das bedeutet, dass die subletale Dosis von *S. T.* die Quantität von Hämocyten im Hämocoel im Vergleich zu PBS nicht signifikant verändert. Huang et al. (2020) veröffentlichten eine an *G. m.* durchgeführte Studie, bei der ein schützender Effekt vor diversen letalen Pilzinfektionen durch eine *Candida glabrata* Exposition entstand. Sie untersuchten unter anderem als vermutlich protektiven Mechanismus ebenfalls die variierende Hämocytenzahl in der Hämolymphe nach dem Immune Priming mit *Candida glabrata*. Es konnten, wie auch in unseren Versuchen, keine

signifikanten Unterschiede zu der Kontrollgruppe (PBS) ermittelt werden. Huang et al. (2020) ergänzten ihre Versuche, indem zusätzlich aus den *G. m.* extrahierte Hämozyten *in vitro* auf ihre bakterizide Aktivität untersucht wurden. Es konnte festgestellt werden, dass die Hämozyten mit Immune Priming durch *Candida glabrata* im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant höhere bakterizide Aktivität gegen *Candida albicans* und *Candida tropicalis* aufwiesen. Es wurde vermutet, dass die schützende Wirkung des Immune Priming hauptsächlich auf eine Aktivierung der Hämozyten zurückzuführen ist (Huang et al., 2020). Daraus lässt sich schließen, dass nicht nur die Anzahl der Hämozyten, sondern auch eine spezifische Hämozyten-Aktivierung ein Aspekt des protektiven zellulären Geschehens des Immune Priming darstellt.

In unseren Versuchen konnten wir beobachten, dass es in allen Versuchsgruppen bereits 2 Stunden nach den Injektionen zu einem Anstieg der Hämozyten kommt. Dieser erste schnelle Anstieg der Hämozytendichte könnte auf die Punktion des Hämocoel zurückgeführt werden. Es wird davon ausgegangen, dass bei den Lepidoptera neben humoralen Faktoren der Hämolymphe auch die Hämozyten an der Hämolymphegerinnung und dem Wundverschluss bei Verletzungen beteiligt sind (Hoffmann, 1995). Eine Funktion der Hämozyten ist, dass sie durch eine Ansammlung an der Wunde zur Gerinnung beitragen und durch eine Degranulation ein unlösliches Gel im Hämocoel bilden (Lavine et al., 2002, Hoffmann, 1995). Eine erhöhte Hämozytendichte nach Nadelstichverletzungen bei *G. m.*, im Vergleich zu den unbehandelten *G. m.*, wurde ebenfalls in einer Studie von Titball et al. (2020) beobachtet. Auch wurde die Injektion von PBS mit der reinen Punktion des Hämocoel verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied in dem Anstieg der Hämozytendichte bei der Injektion von PBS ermittelt werden (Senior et al., 2020). Unsere Ergebnisse in 3.6.1 stützen die Hypothese, dass PBS als Trigger für den Anstieg der Hämozytenzahl ausgeschlossen werden kann, da sich keine signifikanten Unterschiede der Hämozytendichte zwischen PBS-behandelten und rein punktierten Larven feststellen lassen. Dieser Versuch lässt ebenfalls vermuten, dass die Punktion der *G. m.* der hauptsächliche Induktor für den anfänglichen Anstieg der Hämozytenzahl in der Hämolymphe ist. Senior et Titball

(2020) konnten keine Anzeichen für Wachstum oder Replikation von Hämocyten nach Nadelstichverletzungen beobachten, was bedeutet, dass Hämocyten nach einer Injektion oder Verletzung aus Organen freigesetzt werden müssen (Senior et al., 2020). Auch Ratcliffe (1985) stellte die Hypothese auf, dass bei Entzündungsgeschehen Hämocyten als Immunreaktion schnell aus Organen mobilisiert werden können. Bereits physischer Stress der Larven oder eine Temperaturveränderung führt dazu, dass die Anzahl der zirkulierenden Hämocyten im Hämocoel steigt (Mowlds et al., 2008a, Mowlds et al., 2008b). Die Hämocyten können in an Organe gebundene sessile und im Hämocoel zirkulierende Hämocyten unterschieden werden. Die sessilen Hämocyten können sich lösen und in den Kreislauf gelangen (Hillyer, 2016). Außerdem werden Hämocyten in strukturell und funktionell unterschiedliche Unterpopulationen differenziert (Hillyer, 2016). Trotz des Erkennens morphologischer Unterschiede der Hämocyten bei der mikroskopischen Bestimmung der Hämocyten-dichte, wurden in dieser Studie die Hämocyten nicht differenziert betrachtet oder bestimmt. In einer Studie von Wu et al. (2016a) wurden vier Typen von im Hämocoel zirkulierenden Hämocyten identifiziert. Dazu gehören Plasmatozyten, Granulozyten, Spherulozyten und Oenozyten. Im Verlauf der *G. m.*-Larvenentwicklung konnte eine signifikante Veränderung des jeweiligen Anteils der Hämocyten beobachtet werden. Es wurde angenommen, dass die Hämocyten an der Entwicklung der *G. m.* beteiligt sind (Wu et al., 2016a).

Die Gegebenheiten, dass es sich bei den Versuchen um lebendige Organismen handelt, die sich zwar im Allgemeinen als widerstandsfähig erweisen, jedoch sensibel auf äußere Einflüsse wie Temperaturveränderungen, Nahrungsangebot und taktile Reize reagieren, sowie die Verwendung eines breiten Spektrums an Larven in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (130 bis 250 mg), werden die Anzahl der freien Hämocyten im Hämocoel beeinflusst und zu der hohen Standardabweichung in den Experimenten beigetragen haben. Unsere Ergebnisse legen dennoch die Vermutung nahe, dass ein Zusammenhang besteht zwischen der höheren Anzahl an Hämocyten im Hämocoel und der Fähigkeit *S. T.* zu bekämpfen. Dies lässt sich dadurch belegen, dass in der

Versuchsgruppe mit Immune Priming ( $10^5$  S. T./ ml +  $10^7$  S. T./ ml) nach der zweiten Injektion eine höhere Hämozytendichte im Vergleich zu der Kontrollgruppe (PBS +  $10^7$  S. T./ ml) vorliegt. Ein Erklärungsansatz für diese Beobachtung wäre, dass die erste Infektion vermutlich dazu führt, dass Hämozyten dem Hämocoel durch protektive Mechanismen entzogen werden und dem Immunsystem als freie Hämozyten im Hämocoel nicht mehr zur Verfügung stehen, wodurch sowohl deren Mobilisierung aus Organen als auch ihre Proliferation angeregt werden könnte.

Es konnte bereits festgestellt werden, dass die höhere Anzahl an Hämozyten im Hämocoel positiv mit der Fähigkeit eindringende Krankheitserreger erfolgreich zu phagozytieren oder abzutöten (Wu et al., 2016a) sowie mit dem Überleben gegenüber infektiösen Erregern (Bergin et al., 2003) korreliert. De Oliveira et al. (2017) analysierten die immunmodulatorischen Effekte des Immune Priming mit *Lactobacillus rhamnosus* auf eine *Candida albicans*-Infektion im *G. m.*-Modell. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass eine vorherige Exposition mit *Lactobacillus rhamnosus* eine Immunantwort auslöst, die es ermöglicht eine letale Infektionsdosis mit *Candida albicans* zu überleben. Diese Reaktion wird von den Autoren und Autorinnen neben anderen immunmodulatorischen Mechanismen ebenfalls auf eine Zunahme der zirkulierenden Hämozyten zurückgeführt, welche pathogene Erreger eliminieren können (de Oliveira et al., 2017). In einer Studie von Bergin et al. (2003) konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Hämozytendichte und der Überlebensrate von *G. m.* nach Inokulation aufgezeigt werden. Eine hohe Pathogenität der Mikroben konnte mit einer hohen Mortalität, einer hohen Erregerlast sowie einer geringeren Hämozytendichte im Hämocoel der inokulierten Larven in Zusammenhang gebracht werden. Eine Infektion mit Erregern niedrigerer Pathogenität wurde von den Larven überlebt, wobei eine geringere Erregerlast und eine geringere Variation der Hämozytenzahl im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu beobachtet wurde. Die Ergebnisse der Studie lassen den Schluss zu, dass eine Inokulation von Erregern geringerer Pathogenität eine effektive Immunantwort des Organismus zur Folge hatte. Demgegenüber konnten Erreger mit einer hohen Pathogenität die zelluläre Immunantwort überwinden. Als Ergebnis konnte eine

verringerte Hämozytendichte sowie eine weitere Proliferation der Erreger in der Hämolymphe beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Pathogenität der Erreger mit dem Überleben und der Hämozytendichte korreliert (Bergin et al., 2003).

#### **4.6 Gesteigerte RNA-Expression immunrelevanter Proteine**

Wir analysierten durch das Monitoring differentieller RNA-Expressionen immunmodulierender Gene in *G. m.*, inwiefern eine Infektion der Larven mit einer nicht letalen Dosis von *S. T.* Genprodukte wie AMPs induziert. Diese antimikrobiell wirksamen Substanzen könnten einen protektiven Einfluss auf *S. T.*-Reinfektionen haben. Dazu untersuchten wir die RNA-Expression nach der Infektion mit *S. T.* in subletaler Dosierung und zusätzlich in letalen Dosierungen mit oder ohne vorherigem Immune Priming in Relation zur Stimulation mit PBS. Zudem sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Regulation der RNA-Expression und dem Überleben der inokulierten Larven besteht.

Antimikrobielle Peptide sind kurze Ketten von Aminosäuren, die natürlicherweise in Insekten vorkommen und eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern wie Bakterien, Viren und Pilzen spielen (Yi et al., 2014). Zu den wichtigsten Orten dieser Produktion gehören im Insekt der Fettkörper, die Hämozyten, der Verdauungstrakt, die Speicheldrüsen und der Fortpflanzungstrakt (Ratcliffe, 1985). AMPs können die Zellmembranen von Mikroorganismen durchdringen und diese abtöten oder ihr Wachstum hemmen. Sie werden viel schneller produziert als die IgM der Wirbeltiere und sie können durch ihre geringe Größe leicht durch die Hämolymphe diffundieren und Eindringlinge bekämpfen, um einer Infektion entgegenzuwirken. AMPs sind Teil der humoralen Antwort des angeborenen Immunsystems und bieten somit eine schnelle Verteidigung gegen Infektionen. Ähnliche Peptide sind auch bei Wirbeltieren, wirbellosen Tieren und Pflanzen bekannt (Salzet, 2001, Mowlds et al., 2008b, Yi et al., 2014).

In unseren Versuchen zeigten wir, dass nur die Larven, die primär  $10^5$  *S. T.*/ml injiziert bekamen, die Infektion mit der letalen Dosis erfolgreich bekämpfen konnten. Diese Beobachtungen legten nahe, dass eine einmalige Stimulation mit

10<sup>5</sup> S. T./ml ausreicht, um eine effektive und präventive Immunreaktion auszulösen.

Zu den von uns untersuchten antimikrobiell wirksamen Substanzen gehörten die *G. m.*-spezifischen Defensin-ähnlichen Abwehrmoleküle Galiomycin und Gallerimycin. Diese Abwehrmoleküle weisen signifikante Ähnlichkeiten zu den humanen, dem angeborenem Immunsystem angehörigen, cysteinreichen Peptiden aus der Gruppe der Defensine auf (Dekkerová-Chupáčová et al., 2018). Defensine wurden in fast allen lebenden Organismen nachgewiesen (Yi et al., 2014). In unseren Versuchen zeigten wir, dass die Gene, die für Galiomycin und Gallerimycin kodieren, bei der einfachen subletalen Stimulation der Larven mit *S. T.* in Relation zur PBS-Kontrolle deutlich erhöht exprimiert wurden. Dabei stieg das Expressionsniveau nach der Infektion auf ein Vielfaches an. Die Genexpression der Larven mit Immune Priming zeigten deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Larven, die 24 h zuvor keine Exposition mit *S. T.* erfahren haben. Unmittelbar nach der letalen Infektionsdosis bestand bereits eine deutlich erhöhte Expression dieser Gene auf Grund der vorherigen Exposition mit dem Erreger. Larven ohne Immune Priming begannen dagegen bei einem Expressionsniveau nahe der PBS-Kontrollgruppe. Dies könnte darauf hindeuten, dass das bereits bestehende hohe Maß an RNA zum Zeitpunkt der letalen Infektion einen Überlebensvorteil darstellte. Erhöhte mRNA-Werte von Genen, die für antimikrobielle Peptide kodieren, wurden bereits in vergangenen Arbeiten bei Larven festgestellt, die mit Bakterien infiziert wurden. Bergin et al. (2006) haben mit ihrer Studie nachgewiesen, dass eine Infektion von *G. m.* mit *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* in nicht letalen Dosierungen zu erhöhten Expressionen der Gene von Galiomycin, Gallerimycin, Transferrin und IMPI führte. In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass die Gallerimycin-Genexpression zwar durch bakterielle Infektionen stark induziert wurde, dass Gallerimycin als AMP an sich jedoch keinen direkten Effekt gegen Bakterien vorweisen konnte. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Gallerimycin gramnegative Bakterien durch die Induktion einer Membrandepolarisation angreifbar machte und dadurch die eigentlich vernachlässigbare Wirkung von AMPs wie Cecropin verstärkte (Bolouri Moghaddam et al., 2016).

Cecropine sind die am längsten bekannten AMPs bei Insekten. Sie weisen eine breites Wirkspektrum gegen Bakterien, Viren und Pilze auf. (Yi et al., 2014). Die erhöhte Genexpression nach bakterieller Exposition von Cecropin ähnelt unseren Ergebnissen der Genexpressionsanalysen von Gallerimycin, Galiomycin und Hemolin. Wu et al. (2016b) zeigten in ihren Versuchen, dass die Expression von Cecropin, Gallerimycin und Galiomycin von dem Immune Priming mit hitzegetöteten *Photorhabdus luminescens* abhängt. Je höher die Priming-Dosis, desto stärker die Expression der für AMPs kodierenden Gene (Wu et al., 2016b).

IMPI, der Insekten-Metalloprotease-Inhibitor, spielt, ähnlich wie bei AMPs, eine wichtige Rolle bei der Immunität. IMPI wurde in infizierten *G. m.*-Larven nachgewiesen und wird als Reaktion auf eine bakterielle oder pilzliche Exposition in die Hämolymphe sezerniert. Er bindet irreversibel an mikrobielle Metalloenzyme und inhibiert deren Aktivität (Grizanova et al., 2021, Wojda et al., 2020a). IMPI zeigt in unseren Versuchen signifikant erhöhte Genexpressionen nach dem Immune Priming der *G. m.* Es konnte bereits bei einer mykotischen Infektion von *G. m.* mit *Beauveria bassiana* eine Induktion von IMPI nach der Infektion nachgewiesen werden. Sie zeigten ebenfalls in ihrer Studie, dass antimykotische Peptide wie Gallerimycin und Galiomycin im Vergleich zu IMPI unterschiedlich stark reguliert werden (Vertyporokh et al., 2017).

Gloverin ist ein AMP, das speziell bei Lepidoptera nachzuweisen ist (Yi et al., 2014). Die Expression des Gens, welches für Gloverin kodierte, wurde bereits durch die Injektion der *G. m.*-Larven mit  $10^5$  *S. T.*/ ml stimuliert und zeigte in der Versuchsreihe mit Immune Priming 0 h nach der letalen Infektionsdosis, einen deutlichen Anstieg. Es konnte zu diesem Messzeitpunkt ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe PBS +  $10^7$  *S. T.*/ ml ermittelt werden. Antimikrobielle Peptide bieten die Möglichkeit, auf Grund ihrer breiten Aktivität gegen Mikroorganismen und unterschiedlichen Wirkweisen eine Alternative zu herkömmlichen Antibiotika zu sein (Aoki et al., 2012). Dabei stellt sich *G. m.* als sehr nützliches Modell zur Identifizierung und Prüfung von AMPs dar (Seitz et al., 2003). Die Gloverine der *G. m.* konnten bereits in Makrophagen-ähnlichen Zellen von *Drosophila melanogaster* (stabile rekombinante S2-Zellen)

effizient und zuverlässig produziert werden, um im nächsten Schritt für die Forschung Verwendung zu finden (Zitzmann et al., 2017).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Vertyporokh and Wojda (2020) wurden nach subletalen und letalen Infektionen von *G. m.* mit *Candida albicans* die variierenden Expressionen der kodierenden Gene für Gallerimycin, Galiomycin, IMPI und Hemolin im Fettkörper untersucht. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass sich die Expression der untersuchten Gene nach der subletalen Infektionsdosis in Relation zu der Kontrolle signifikant erhöhte. Außerdem wurde beobachtet, dass die Verabreichung der letalen Pathogenkonzentration die Genexpression deutlich stärker initiierte als die subletale Infektionsdosis. Die letale Infektion führte zu einer erhöhten Expression immunmodulierender Gene und korrelierte mit einer erhöhten antimikrobiellen Aktivität und einer höheren Menge an Polypeptiden in der Hämolymphe (Vertyporokh et al., 2020). Dazu wurde bereits die These aufgestellt, dass das Expressionsniveau immunrelevanter Gene von der Virulenz der injizierten Pathogene abhängt (Dekkerová-Chupáčová et al., 2018). Hemolin hat selbst keine antibakteriellen Eigenschaften, aber es wurden Zelladhäsionseigenschaften an bakteriellen Zelloberflächen nachgewiesen. Es dient als immunrelevantes Oponin zur Verteidigung gegen potentielle Pathogene (Shaik et al., 2009). In unseren Versuchen verlief die Induktion des Gens, das für Hemolin kodiert, nach den Infektionen nahezu identisch zu Gallerimycin und Galiomycin. Da die Genexpression für Hemolin in der Versuchsreihe mit Immune Priming 0 Stunden nach der letalen Infektionsdosis bereits deutlich erhöht war, konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe PBS +  $10^7$  *S. T.*/ ml ermittelt werden.

Taszwłow et al. (2017) untersuchten die Expression immunrelevanter Gene bei *G. m.* sowohl mit und als auch ohne Immune Priming durch *Bacillus thuringiensis* sowie nach einer Reinfektion mit einer letalen Dosis desselben Erregers. Zu den analysierten Genen gehörten Cecropin, Gallerimycin, Galiomycin, Hemolin, IMPI, anionisches Peptid 2 und Apolipoporphin III. Es zeigte sich, dass die Genexpressionen im Verlauf nach der Inokulation der hohen Dosis anstiegen. Die Larven mit Immune Priming wiesen im Vergleich zu den Larven ohne Immune

Priming keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau auf. Lediglich beim anionischen Peptid 2 und Apolipoprotein III wurde nach der Infektion mit der hohen Dosis ein Rückgang der Genexpression festgestellt. Unter der Verwendung von Antikörpern konnte allerdings in den Versuchsgruppen kein Unterschied der Anzahl des Protein Apolipoprotein III detektiert werden (Taszkow et al., 2017). Apolipoprotein III spielt unter anderem bei der Erkennung von Pathogenen eine Rolle, indem es Komponenten der bakteriellen Zellwand bindet. Außerdem weist es selbst antimikrobielle Aktivität auf (Zdybicka-Barabas et al., 2013). In unseren Versuchen konnten wir keinen Anstieg der Expression von Apolipoprotein III beobachten. Durch einen Abfall des Expressionsniveaus nach der letalen Infektion der Larven ohne Immune Priming konnte zum Zeitpunkt 6 Stunden nach der Infektion ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Larven mit Immune Priming ermittelt werden. Das könnte bedeuten, dass eine konstante Produktion von Apolipoprotein einen Überlebensvorteil für die Larven darstellt. Wie bereits erwähnt konnte nachgewiesen werden, dass ein synergistisches Wirken gegen eindringende Pathogene zwischen den verschiedenen AMPs besteht. In einer früheren Studie war zum Beispiel die permeabilisierende Aktivität von Lysozym gegen gramnegative Bakterien in Gegenwart von Apolipoprotein III verstärkt. Die Vermutung war, dass Apolipoprotein III eine Veränderung der bakteriellen Zelloberfläche induziert, mit der Folge, dass diese angreifbarer für antimikrobielle Enzyme wie Lysozym wurde. Apolipoprotein III der *G. m.* war allein allerdings nicht in der Lage das Wachstum von gramnegativen Bakterien wie *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium zu hemmen (Zdybicka-Barabas et al., 2013).

Lysozym wurde bereits früh als wichtiger antimikrobieller Faktor von Insekten beschrieben (Mohrig, 1968a). Dieses antimikrobielle Enzym kann bakterielle und mykotische Zellwände hydrolysieren. Obwohl die meisten gramnegativen Bakterien gegen die enzymatische Aktivität von Lysozym resistent sind, zeigen Lysozyme von Lepidoptera wie *G. m.* eine geringe antimikrobielle Wirkung gegen diese Bakterien (Wojda et al., 2020a). Wir konnten durch unsere Versuche eine Induktion der Genexpression von Lysozym durch eine Infektion darstellen, aber

eine Interpretation auf Grund des inkonsistenten Verlaufs war nur eingeschränkt möglich.

Die Stickstoffmonoxid-Synthase NOS ist ein Produzent von NO, welches bei Immunreaktionen als Signalmolekül dient oder an zytotoxischen Reaktionen beteiligt ist (Semenova et al., 2014). Wir können durch unsere Studie annehmen, dass NOS ebenfalls an der Immunantwort beteiligt ist und einer Regulation, abhängig von der Virulenz des injizierten Erregers, unterliegt. Semenova et al. (2014) untersuchten in ihrer Studie die Stickstoffoxidproduktion in Hämozyten von *G. m.* und kamen zu dem Schluss, dass Stickstoffoxidproduktion als Immunreaktion nicht von einer erhöhten NOS-Aktivität ausgeht, sondern durch die Aktivierung der Nitritreduktase erfolgt. Die NOS-Aktivität in den Hämozyten von *G. m.*-Larven ist möglicherweise zu gering, um nachgewiesen zu werden (Semenova et al., 2014).

Zusammenfassend können wir folgendes erörtern: Die Genexpression stieg in den ersten 6 Stunden nach der initialen Injektion deutlich an, sank aber im Verlauf bis zum Zeitpunkt 24 Stunden nach der ersten Injektion wieder ab. Daraufhin bewirkte die Sekundärinfektion nur eine quantitativ moderate Hochregulierung der Genexpression. Dieser Ablauf könnte darauf hinweisen, dass das Immune Priming eine schnelle und starke Immunreaktion auslöste, die jedoch wieder abklang. Zum Zeitpunkt der Sekundärinfektion blieb eine effiziente Immunantwort bestehen, welche die Erregerlast direkt reduzieren konnte, was zu einer moderateren Immunreaktion nach der zweiten Injektion führte. Das könnte bedeuten, dass die injizierten Bakterien bei Larven mit Immune Priming schneller eliminiert wurden, wodurch weniger Reize für eine starke Immunreaktion vorhanden waren. Darüber hinaus zeigten die analysierten Entzündungsmarker nach einer Primärinfektion mit einer subletalen Dosis von  $10^5$  *S. T.*/ml und einer Sekundärinfektion mit einer letalen Dosis von  $10^7$  *S. T.*/ml mit vorheriger PBS-Injektion ein ähnliches Muster der Genexpression. Allerdings reichte die Immunreaktion bei der subletalen Dosis aus, um die Infektion zu kontrollieren und das Überleben der Larven zu gewährleisten, während sie bei der Versuchsgruppe der zweifachen Injektion von zuerst PBS und dann der letalen Dosis von  $10^7$  *S. T.*/ml nicht genügte. Dies führt zu einer hohen Mortalität der

Larven, trotz quantitativ vergleichbar erhöhter Genexpression antimikrobieller Peptide.

Bolouri Moghaddam et al. (2016) schlussfolgerten in ihrer Studie, dass *G. m.* ihre Immunantwort auf Pathogene durch die Produktion einer großen Menge an funktionell und strukturell unterschiedlicher AMPs effizienter gestaltet. Durch das Zusammenwirken dieser AMPs gegen eindringende Pathogene erhöhe sich die Effektivität einzelner AMPs (minimale Hemmkonzentration niedriger), während gleichzeitig ein breites Aktivitätsspektrum gegen Erreger entstehe (Bolouri Moghaddam et al., 2016). Taszłow et al. (2017) vermuteten auf Basis ihrer Ergebnisse, dass eine erneute Exposition der *G. m.* mit Erregern die Effizienz der Immunantwort steigern. Eine spezifische Modulation der Synthese von Proteinen des Immunsystems, ausgelöst durch bakterielle Faktoren, optimiere die Abwehraktivität und bleibe gleichzeitig energieeffizient. Diese Modulationen finde unter anderem im Fettkörper statt, in dem auch die Synthese von Hämocyten der Hämolymphe erfolge (Taszłow et al., 2017).

#### **4.7 Trained Immunity und Immune Priming**

Wirbellose Tiere zeigen Anzeichen eines immunologischen Gedächtnisses innerhalb ihrer angeborenen Immunantwort. Eine erhöhte Resistenz gegenüber Zweitinfektionen, ausgelöst durch eine vorherige Infektion, kann durch zwei Hauptmechanismen erklärt werden. Zum einen durch eine unspezifische, quantitative Verstärkung der Immunantwort, wie die Hochregulierung der Toll- und Imd-Signalwege, und zum anderen durch spezifische, qualitative Mechanismen, die zur somatischen Diversität beitragen, wie alternatives Spleißen und Diversifizierung von Rezeptorproteinen (Watson et al., 2005, Netea et al., 2011).

Die Trained Immunity beschreibt eine Form der angeborenen Immunreaktion, die bei Säugetieren sowie einigen wirbellosen Tieren und Pflanzen auftreten kann (Netea et al., 2011). Anders als die adaptive Immunität, die auf B- und T-Zellen basiert, entsteht die Trained Immunity ähnlich wie bei dem Immune Priming in Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen. Diese Immunzellen durchlaufen bei einer ersten

Exposition gegenüber einem Pathogen oder Antigen eine funktionelle Umprogrammierung, die auf epigenetischen und metabolischen Veränderungen beruht. Den Immunzellen wird ermöglicht, auf zukünftige Stimuli mit einer verstärkten und schnelleren Immunantwort zu reagieren (Kurtz, 2005, Netea et al., 2011). Die Trained Immunity stellt eine evolutionär entwickelte Strategie dar, die Effektivität des angeborenen Immunsystems zu verbessern und das Überleben des Organismus zu sichern (Netea et al., 2016).

Die Phänomene der angeborenen Immunität - Immune Priming und Trained Immunity - sind eng miteinander verbunden und überschneiden sich teilweise in ihren grundlegenden molekularen Mechanismen (epigenetisch, transkriptionell und metabolisch). Beide führen zu einer verstärkten Immunantwort bei einer erneuten Pathogenexposition. Dennoch gibt es Unterschiede in der Ausprägung der adaptiven Prozesse und in Bezug auf spezifische Marker und Pfade der molekularen Veränderungen. Der Hauptunterschied besteht in dem Funktionsstatus der Immunzellen, die diese verschiedenen immunologischen Programme durchlaufen, bevor sie eine sekundäre Infektion erfahren (Divangahi et al., 2021).

Durch einen initialen Stimulus werden Zellen des angeborenen Immunsystems in einen aktiven, innerhalb eines Entzündungsprozesses dynamischen Funktionszustand versetzt (Ochando et al., 2023). Bei dem Immune Priming werden die Immunzellen im aktivierten Funktionszustand erneut stimuliert, bevor der durch den ersten Stimulus ausgelöste Immunstatus (die aktive Genexpression) in das Ausgangsniveau zurückgekehrt ist. Die Entzündungsreaktion dieser geprimten Zellen wird additiv oder synergistisch verstärkt (Divangahi et al., 2021, Ochando et al., 2023, Wojda et al., 2020b). Die Trained Immunity basiert auf stabilen epigenetischen und metabolischen Modifikationen, die nach einer primären Infektion oder einem ersten Stimulus auftreten. Obwohl die Zelle funktionell zur Homöostase zurückkehrt, bleiben langanhaltende epigenetische Marker erhalten. Bei einer Restimulation durch homologen oder heterologen Antigenkontakt werden dadurch verstärkte Gentranskriptionen und Zellfunktionen ermöglicht. Dieses Phänomen stellt eine

Form des Immungedächtnisses dar (Aegerter et al., 2020, Divangahi et al., 2021, Ochando et al., 2023).

Insgesamt verdeutlichen die Trained Immunity und das Immune Priming die Vielschichtigkeit des angeborenen Immunsystems. Es lässt sich festhalten, dass Trained Immunity und Immune Priming unterschiedliche Phänomene darstellen, die jedoch ähnliche Mechanismen nutzen. Immune Priming tritt vor allem bei wirbellosen Organismen auf und bietet eine Verstärkung der Immunantwort, die durch eine vorübergehende Genaktivität gesteuert wird. Trained Immunity hingegen kommt vor allem bei Wirbeltieren vor und resultiert aus stabilen epigenetischen und metabolischen Veränderungen, die eine langanhaltende, unspezifische Immunverstärkung bewirken. Beachtenswert ist, dass bei infizierten *G. mellonella*-Larven Veränderungen in der Aktivität von Enzymen der epigenetischen Regulation, wie Methylasen/Demethylasen und Acetylasen/Deacetylasen, beobachtet wurden (Vilcinskas, 2016). Die Erforschung des Immune Priming in wirbellosen Modellen wie *G. mellonella* bleibt wertvoll, da sie hilft, grundlegende Mechanismen des immunologischen Gedächtnisses zu verstehen, die evolutionär sowohl bei Wirbeltieren als auch bei Wirbellosen relevant sind. Epigenetische Veränderungen, wie die oben erwähnten Enzymaktivitäten weisen darauf hin, dass erste adaptive Schritte bereits im Immunsystem von Invertebraten vorhanden sind. So könnte das Immune Priming in Wirbellosen wichtige Hinweise auf die grundlegende Evolution des immunologischen Gedächtnisses liefern, das später bei Wirbeltieren zu einer langfristig stabilen Trained Immunity weiterentwickelt wurde.

#### **4.8 *G. mellonella* als Ersatzmodell – Begrenztheit und Möglichkeiten**

Die Einschränkungen und das Potenzial des *Galleria mellonella*-Modells wirken sich direkt auf die oben genannten Forschungsfragen zur Untersuchung von Immune Priming aus. Dabei ist die Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf höhere Organismen wie Wirbeltiere eine zentrale Herausforderung.

Die Erforschung humaner Infektionen müsste direkt am Menschen durchgeführt werden, um die Interaktion zwischen Pathogen und Wirt bestmöglich beurteilen

zu können. Dies ist auf Grund ethischer, technischer und finanzieller Argumente schwer durchführbar (Garcia-Lara et al., 2005). Deshalb sind Tiermodelle unerlässlich, um mehr Informationen zu Infektionen zu generieren. Dabei stellt kein Versuchsmodell den perfekten Ersatz dar. Es sollte im Rahmen ethischer, wirtschaftlicher und wissenschaftlicher Grundlagen das am besten geeignete Tiermodell ausgewählt werden (Ménard et al., 2021). Um den unangemessenen Einsatz von Tieren in der Forschung zu verringern, wurden die Regulierungen erheblich verschärft und Tierschutzrichtlinien werden routinemäßig, basierend auf den *3R-Regeln* von Russel und Burch, Replace, Reduce und Refine, überprüft (Tannenbaum et al., 2015). Das *Galleria mellonella*-Modell wurde als alternatives Versuchsmodell entwickelt. Es weist allerdings nur eine begrenzte Vergleichbarkeit auf, um komplexe immunologische Mechanismen interpretieren zu können (Ménard et al., 2021).

Eine große Einschränkung der wissenschaftlichen Vergleichbarkeit bei der Verwendung des *G. m.*-Versuchsmodells ist, dass bislang international keine standardisierten Verfahren existieren. Das betrifft besonders den Gewinn, die Lagerung und die Auswahl der Versuchstiere in Bezug auf deren Gewicht und Larvenstadium (Ménard et al., 2021). Diese große Variabilität führt zu inkonsistenten Ergebnissen. Die Tiere haben zum Beispiel in der Aufzucht sehr unterschiedlichen Kontakt zu Hormonen oder Antibiotika, was sich auf die Anfälligkeit für Infektionen auswirken kann (Champion et al., 2018, Tsai et al., 2016). Um einheitliche Wachstumsbedingungen und letztlich vergleichbare Larven für die Forschung bereitzustellen müssten standardisierte Zuchtstationen eingerichtet werden. Bereits bestehende Ansätze wie die *G. m.* TruLarv™ von Biosystem Technology Ltd. zielen darauf ab, Referenzpopulationen mit definierten Genotypen zu kreieren (Ménard et al., 2021). Faktoren wie die Temperatur des Inkubators, die Dauer der Vorinkubation und die verwendeten Lichtquellen beeinflussen die Aktivität des Immunsystems und können dadurch die experimentellen Resultate variieren lassen (Browne et al., 2015). Darüber hinaus löst selbst die Fütterung der Larven eine immunologische Reaktion aus, wie die Veränderung der Hämozytendichte, was wiederum das Überleben mit einer Infektion beeinflussen kann (Banville et al., 2012, Ramarao et al., 2012).

Erste Leitlinien zu der Auswahl von Larven für Experimente, einer standardisierten Inokulation der *G. m.* und Versuche ein an das *G. m.*-Infektionsmodell angepasstes Bewertungssystem des Gesundheitsindex zu etablieren sind bereits entwickelt (Loh et al., 2013, Andrea et al., 2019, Fredericks et al., 2020). Die fehlende Standardisierung bedeutet für unsere Fragestellung nach spezifischen immunmodulierenden Genen und deren Produkte (z.B. AMPs), dass Unterschiede in der Bakterienlast und Immunantwort schwer isoliert und eindeutig zu betrachten sind.

Vorrangig ist die Vergleichbarkeit der Immunsysteme von Wirbeltieren und Lepidoptera begrenzt, da Insekten keine adaptive Immunantwort besitzen. Dennoch weist ihre komplexe angeborene Immunantwort, bestehend aus zellulären und humoralen Faktoren, bemerkenswerte Ähnlichkeiten mit der Immunantwort von Wirbeltieren auf (Tsai et al., 2016). Auf Grund der vergleichbaren strukturellen und funktionellen Homologie der angeborenen Immunsysteme von Insekten und Säugetieren konnten bereits Korrelationen zwischen der Virulenz von Pathogenen in *G. m.* und Mäusen aufgezeigt werden (Brennan et al., 2002). Hämozyten können, wie die Neutrophilen der Säugetiere, reaktive Sauerstoffspezies bilden, um Erreger abzutöten. Hämozyten und Neutrophile besitzen Toll-like-Rezeptoren,  $\beta$ -Glucan- und Interleukin-1-Rezeptoren, und NF $\kappa$ B-Wege dienen der Signalübertragung. Außerdem ähneln sich die von den Hämozyten und Neutrophilen produzierten immunrelevanten Peptide und Proteine. Dazu gehören Lysozym, Transferrin und Defensine. Neben Neutrophilen sind auch Hämozyten in der Lage NETs zu bilden, um Erreger zu bekämpfen (Browne et al., 2013). Zudem ähnelt die Überlebensfähigkeit von *S. T.* in den Hämozyten von *G. mellonella* dem Überleben der *S. T.* in Makrophagen von Wirbeltieren. Die Funktion von Hämozyten weist Gemeinsamkeiten mit den phagozytischen Zellen von Säugetieren auf, und es gibt Hinweise darauf, dass Hämozyten für *S. T.* möglicherweise eine Nische zur Persistenz darstellen könnten (Brennan et al., 2002). Dieses intrazelluläre Überleben könnte helfen chronische oder latente Infektionen zu simulieren, wie sie bei bestimmten Wirbeltieren vorkommen, und könnte Aufschluss über bakterielle Mechanismen zur Immunevasion geben, die auch bei humanen Infektionen eine Rolle spielen.

Die Art der Infektion von *S. Typhimurium* in *G. mellonella* und die damit verbundene Immunantwort variieren je nach Infektionsweg. Wie bereits erwähnt, würden die natürlichen Infektionen durch die orale Aufnahme von kontaminierter Nahrung erfolgen. Im Labormodell wird *S. T.* in der Regel direkt in die Hämolymphe injiziert, um eine systemische Infektion auszulösen und die natürlichen Barrieren zu umgehen. Besonders relevant für die Übertragung der Erkenntnisse auf Wirbeltiere oder den Menschen wäre deshalb die Untersuchung beider Wege, um aufzuzeigen wie sich die Virulenz und Immunreaktion je nach Eintrittspforte unterscheiden. Um den natürlichen Infektionsweg beim Menschen und anderen Wirbeltieren zu simulieren, haben wir *Galleria mellonella*-Larven zunächst oral mit *Salmonella Typhimurium* infiziert. Hierbei war jedoch eine deutlich höhere Dosierung mit einer letalen Dosis von  $10^9$  *S.T./ml* erforderlich. Diese Methode führte zu größeren Standardabweichungen und die orale Infektion der Larven gestaltete sich insgesamt schwieriger und zeitintensiver. Zudem traten häufiger Verletzungen auf, was die Durchführung zusätzlich erschwerte. Für die Vergleichbarkeit unserer Experimente mit der aktuellen Studienlage entschieden wir uns für den systemischen Infektionsweg, da die meisten Studien ebenfalls auf diese Weise arbeiteten.

Zusammengefasst ist das *G. mellonella*-Modell für explorative Infektionsstudien und das Testen von Hypothesen zum Immune Priming und zur Pathogenresistenz nützlich. Die Einschränkungen der Übertragbarkeit auf Wirbeltiere bedeuten jedoch, dass die Ergebnisse, insbesondere wenn ein „künstlicher“ Infektionsweg genutzt wird, in der Untersuchung der zellulären Immunantwort und adaptiver Mechanismen mit Vorsicht interpretiert und bei weiterführenden Studien an höher entwickelten Modellsystemen validiert werden müssen.

## **5 Fazit und Perspektiven**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zentrale Forschungsfragen zur Untersuchung des Immune Primings bei *Galleria mellonella* in Zusammenhang mit *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium bearbeitet. Diese Forschungsfragen zielten darauf ab, das Potenzial des Immune Primings durch *S. T.*-Infektionen bei dem alternativen In-vivo-Modell *G. m.* zu evaluieren, die molekularen und zellulären Mechanismen des Immune Primings aufzuklären und die Bedeutung dieses Modells für zukünftige Studien zu bewerten.

### **5.1 Immune Priming und Überlebensvorteil**

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine initiale Infektion mit einer niedrigen, nicht letalen Dosis von *S. Typhimurium* das Immunsystem von *G. mellonella* auf nachfolgende Infektionen vorbereitet und einen signifikanten Überlebensvorteil bietet. Diese Konditionierung des Immunsystems manifestierte sich in einer verbesserten Immunantwort, die sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene beobachtet werden konnte. Die Hypothese, dass das Immune Priming ein robustes und effektives System zur Verbesserung der Überlebenschancen bei erneuter Infektion darstellt, konnte damit verifiziert werden. Unsere Beobachtungen weisen darauf hin, dass *G. mellonella* in der Lage ist eine Art immunologisches Gedächtnis zu entwickeln, das auf eine erneute Exposition mit dem gleichen Pathogen protektiv reagiert, was für das Verständnis des Immune Primings von entscheidender Bedeutung ist.

### **5.2 Molekulare Mechanismen des Immune Priming**

Die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen des Immune Priming bei *G. mellonella* zeigte eine signifikante Steigerung der antibakteriellen Aktivität in der Hämolymphe der geprimten Larven. Auf molekularer Ebene führte die erste Infektion zu einer erhöhten Expression von Genen, die für antimikrobiell wirksamen Substanzen (wie AMPs) kodieren, welche eine Schlüsselrolle bei der humoralen Immunantwort spielen. Diese verstärkte Expression korrelierte mit einer signifikant verringerten Bakterienlast in der Hämolymphe. Dies zeigt, dass das Immune Priming auf molekularer Ebene zu einer effizienten Immunantwort

führt, die die Vermehrung des Erregers eindämmt und das Überleben der Larven erhöht.

### **5.3 Zelluläre Immunantwort**

Es konnte gezeigt werden, dass die Hämozytendichte nach dem Immune Priming tendenziell erhöht war, was auf eine verstärkte zelluläre Immunantwort hinweist und darauf hindeutet, dass das Immune Priming nicht nur die humorale, sondern auch die zelluläre Abwehr stimuliert. Beide Mechanismen – die humorale und die zelluläre Immunantwort – tragen somit wesentlich zur protektiven Wirkung des Immune Priming bei. Diese Ergebnisse liefern wichtige Einblicke in die Mechanismen, die *G. mellonella* in die Lage versetzen wiederholte Infektionen effizient zu bekämpfen, und legen nahe, dass ähnliche Mechanismen auch in anderen Modellsystemen vorhanden sein könnten.

### **5.4 *G. mellonella* als alternatives In-vivo-Modell**

Unsere Untersuchungen bestätigen und erweitern die Rolle von *Galleria mellonella* als wertvolles alternatives In-vivo-Modell zur Erforschung des Immune Priming bei Infektionen mit humanpathogenen Erregern. Die Möglichkeit sowohl humorale als auch zelluläre Immunreaktionen zu untersuchen, macht *G. m.* zu einem nützlichen Modell für die Infektionsforschung. Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen die Vielseitigkeit von *G. m.* auf, insbesondere im Hinblick auf die ethische und methodische Überlegenheit gegenüber herkömmlichen Säugetiermodellen.

Die Erkenntnisse dieser Studie eröffnen zahlreiche Möglichkeiten für zukünftige Forschungsprojekte. Eine wichtige Perspektive ist die weiterführende Untersuchung der molekularen Mechanismen, die dem Immune Priming zugrunde liegen. Es wäre von großem Interesse die Signalwege und regulatorischen Netzwerke zu identifizieren, die an der verstärkten Immunantwort durch das Priming beteiligt sind. Diese Untersuchungen könnten dazu beitragen neue Ziele für die therapeutische Modulation des Immunsystems zu identifizieren. Die Erkenntnisse könnten auch auf andere Modellsysteme übertragen werden, was das Potenzial von *Galleria mellonella* als eigenständiges System zur Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktion weiter

unterstreichen würde. Zudem könnte in weiteren Studien das Modell *G. mellonella* auf andere humanpathogene Erreger übertragen werden, um die Generalisierbarkeit der Ergebnisse zu prüfen. Insbesondere die Untersuchungen von multiresistenten Bakterien und die Entwicklung neuer Antibiotika könnten von solchen Modellen profitieren. Durch das bessere Verständnis der Reaktionen des angeborenen Immunsystems auf mikrobielle Erreger könnten neue Therapien entwickelt werden, die gezielt die körpereigene Abwehr stärken und so die Anfälligkeit für Infektionen verringern. Durch den Einsatz alternativer Versuchsmodelle lässt sich das Verständnis von Infektionskrankheiten begrenzt erweitern. Versuche an Wirbeltieren lassen sich niemals vollständig ersetzen, dennoch bietet das *G. m.*-Versuchsmodell einen wertvollen Nutzen für die Forschung, um die Anzahl an Säugetierversuchen zu reduzieren.

## 6 Zusammenfassung

Die Larve der *Galleria mellonella* hat sich als alternatives In-vivo-Modell für die Untersuchung verschiedener menschlicher Krankheitserreger, einschließlich Bakterien und Viren, erwiesen. Im Vergleich zu Säugetiermodellen erfordert die Arbeit mit *G. mellonella* weniger Ressourcen, ist ethisch weniger problematisch und ermöglicht eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Darüber hinaus verfügt *G. mellonella* über ein angeborenes Immunsystem, das dem von Säugetieren ähnelt und sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Reaktion umfasst. In dieser Studie wurde das Potenzial der *G. mellonella*-Larve als innovatives Infektionsmodell für die Untersuchung des Immune Priming durch den menschlichen enteropathogenen Erreger *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium analysiert. Immune Priming beschreibt einen Prozess, bei dem eine erste Exposition mit einem Krankheitserreger das Immunsystem so konditioniert, dass es sich besser gegen eine nachfolgende potenziell tödliche Infektion verteidigen kann. Daher stimulierten wir *G. mellonella*-Larven zunächst mit einer niedrigen, nicht letalen Dosis von lebendem *S. Typhimurium* durch eine Injektion in das Hämocoel, gefolgt von einer zweiten, letalen Injektionsdosis der Bakterien 24 Stunden später. Wir verglichen die Immunreaktion auf zellulärer und humoraler Ebene, sowie die Bakterienlast im Hämocoel und das Überleben der geprimten Larven mit denen, die kein Immune Priming erhalten hatten. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Larven, die einer nicht letalen Dosis von *S. Typhimurium* ausgesetzt waren, einen erheblichen Überlebensvorteil hatten, wenn sie später einer letalen Dosis desselben Erregers ausgesetzt wurden. Auf molekularer Ebene wurde nach der Infektion eine erhöhte Expression von Genen festgestellt, die für die Produktion antimikrobiell wirksamer Substanzen (wie AMPs) verantwortlich sind. Diese Peptide spielen eine Schlüsselrolle bei der humoralen Immunabwehr, indem sie die Vermehrung von Krankheitserregern in der Hämolymphe hemmen. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die erhöhte Genexpression von AMPs mit einer verringerten bakteriellen Belastung in der Hämolymphe und einem Überlebensvorteil der geprimten Larven einhergeht. Darüber hinaus konnten wir auf zellulärer Ebene einen Trend zu einem erhöhten Vorkommen von Hämozyten im Hämocoel der geprimten Larven feststellen.

Hämozyten fungieren als angeborene Immunzellen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Phagozytose und der Abwehr von Krankheitserregern. Diese verstärkte zelluläre Aktivität trägt höchstwahrscheinlich zur wirksamen Bekämpfung des Erregers bei und unterstreicht, dass die schützende Wirkung des Immune Priming sowohl zelluläre als auch humorale Immunreaktionen umfasst. Die Ergebnisse dieser Studie machen *G. mellonella* zu einem wertvollen alternativen In-vivo-Modell für die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die dem Immune Priming zugrunde liegen. Ein besseres Verständnis der Reaktionen des angeborenen Immunsystems auf mikrobielle Krankheitserreger könnte zur Entwicklung neuer Therapien führen, die gezielt die körpereigenen Abwehrkräfte stärken und die Anfälligkeit für Infektionen verringern.

## 7 Literaturverzeichnis:

- AEGERTER, H., KULIKAUSKAITE, J., CROTTA, S., PATEL, H., KELLY, G., HESSEL, E. M., MACK, M., BEINKE, S. & WACK, A. 2020. Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection. *Nat Immunol*, 21, 145-157.
- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A., BEGLEY, M., PRIETO, M., MESSENS, W., LÓPEZ, M., BERNARDO, A. & HILL, C. 2011. Salmonella spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology (Reading)*, 157, 3268-3281.
- ANDREA, A., KROGFELT, K. A. & JENSSEN, H. 2019. Methods and Challenges of Using the Greater Wax Moth (*Galleria mellonella*) as a Model Organism in Antimicrobial Compound Discovery. *Microorganisms*, 7.
- AOKI, W., KURODA, K. & UEDA, M. 2012. Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines. *J Biosci Bioeng*, 114, 365-70.
- BANVILLE, N., BROWNE, N. & KAVANAGH, K. 2012. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence*, 3, 497-503.
- BARROS, P. P., ROSSONI, R. D., RIBEIRO, F. C., SILVA, M. P., SOUZA, C. M., JORGE, A. O. C. & JUNQUEIRA, J. C. 2019. Two sporulated *Bacillus* enhance immunity in *Galleria mellonella* protecting against *Candida albicans*. *Microb Pathog*, 132, 335-342.
- BARTHEL, M., HAPFELMEIER, S., QUINTANILLA-MARTÍNEZ, L., KREMER, M., ROHDE, M., HOGARDT, M., PFEFFER, K., RÜSSMANN, H. & HARDT, W. D. 2003. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun*, 71, 2839-58.
- BENTHALL, G., TOUZEL, R. E., HIND, C. K., TITBALL, R. W., SUTTON, J. M., THOMAS, R. J. & WAND, M. E. 2015. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. *Int J Antimicrob Agents*, 46, 538-45.
- BERGIN, D., BRENNAN, M. & KAVANAGH, K. 2003. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect*, 5, 1389-95.
- BERGIN, D., MURPHY, L., KEENAN, J., CLYNES, M. & KAVANAGH, K. 2006. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes Infect*, 8, 2105-12.
- BISMUTH, H. D., BRASSEUR, G., EZRATY, B. & AUSSEL, L. 2021. Bacterial Genetic Approach to the Study of Reactive Oxygen Species Production in *Galleria mellonella* During *Salmonella* Infection. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 640112.
- BOLOURI MOGHADDAM, M. R., TONK, M., SCHREIBER, C., SALZIG, D., CZERMAK, P., VILCINSKAS, A. & RAHNAMAEIAN, M. 2016. The

- potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides. *Biol Chem*, 397, 939-45.
- BOMAN, H. G. & HULTMARK, D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol*, 41, 103-26.
- BRENNAN, M., THOMAS, D. Y., WHITEWAY, M. & KAVANAGH, K. 2002. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 34, 153-7.
- BROWNE, N., HEELAN, M. & KAVANAGH, K. 2013. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4, 597-603.
- BROWNE, N., SURLIS, C. & KAVANAGH, K. 2014. Thermal and physical stresses induce a short-term immune priming effect in *Galleria mellonella* larvae. *J Insect Physiol*, 63, 21-6.
- BROWNE, N., SURLIS, C., MAHER, A., GALLAGHER, C., CAROLAN, J. C., CLYNES, M. & KAVANAGH, K. 2015. Prolonged pre-incubation increases the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to bacterial and fungal infection. *Virulence*, 6, 458-65.
- CHADWICH, J. S. 1971. An assessment of the ability of individual moieties of *Pseudomonas aeruginosa* endotoxin to induce immunity in larvae of *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol*, 17, 299-300.
- CHAMPION, O. L., TITBALL, R. W. & BATES, S. 2018. Standardization of *G. mellonella* Larvae to Provide Reliable and Reproducible Results in the Study of Fungal Pathogens. *J Fungi (Basel)*, 4.
- CHEN, R. Y. & KEDDIE, B. A. 2021. *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Hemocytes Release Extracellular Traps That Confer Protection Against Bacterial Infection in the Hemocoel. *J Insect Sci*, 21.
- COLLABORATORS, G. B. D. N.-T. S. I. D. 2019. The global burden of non-typhoidal salmonella invasive disease: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Infect Dis*, 19, 1312-1324.
- DE OLIVEIRA, F. E., ROSSONI, R. D., DE BARROS, P. P., BEGNINI, B. E., JUNQUEIRA, J. C., JORGE, A. O. C., LEÃO, M. V. P. & DE OLIVEIRA, L. D. 2017. Immunomodulatory effects and anti-*Candida* activity of lactobacilli in macrophages and in invertebrate model of *Galleria mellonella*. *Microb Pathog*, 110, 603-611.
- DEKKEROVÁ-CHUPÁČOVÁ, J., BORGHI, E., MORACE, G. & BUJDÁKOVÁ, H. 2018. Up-Regulation of Antimicrobial Peptides Gallerimycin and Galiomicin in *Galleria mellonella* Infected with *Candida* Yeasts Displaying Different Virulence Traits. *Mycopathologia*, 183, 935-940.
- DIVANGAHI, M., AABY, P., KHADER, S. A., BARREIRO, L. B., BEKKERING, S., CHAVAKIS, T., VAN CREVEL, R., CURTIS, N., DINARDO, A. R., DOMINGUEZ-ANDRES, J., DUIVENVOORDEN, R., FANUCCHI, S., FAYAD, Z., FUCHS, E., HAMON, M., JEFFREY, K. L., KHAN, N., JOOSTEN, L. A. B., KAUFMANN, E., LATZ, E., MATARESE, G., VAN DER MEER, J. W. M., MHLANGA, M., MOORLAG, S., MULDER, W. J. M., NAIK, S., NOVAKOVIC, B., O'NEILL, L., OCHANDO, J., OZATO, K., RIKSEN, N. P., SAUERWEIN, R., SHERWOOD, E. R., SCHLITZER, A., SCHULTZE, J. L., SIEWEKE, M. H., BENN, C. S., STUNNENBERG, H.,

- SUN, J., VAN DE VEERDONK, F. L., WEIS, S., WILLIAMS, D. L., XAVIER, R. & NETEA, M. G. 2021. Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. *Nat Immunol*, 22, 2-6.
- DOUGAN, G. J., VICTORIA; PALMER, SOPHIE; MASTROENI, PIETRO 2011. Immunity to salmonellosis. *Immunological Reviews*.
- FEARON, D. T. 1997. Seeking wisdom in innate immunity. *Nature*, 388, 323-4.
- FIGUEIREDO, R., CARD, R., NUNES, C., ABUOUN, M., BAGNALL, M. C., NUNEZ, J., MENDONÇA, N., ANJUM, M. F. & DA SILVA, G. J. 2015. Virulence Characterization of Salmonella enterica by a New Microarray: Detection and Evaluation of the Cytotoxic Distending Toxin Gene Activity in the Unusual Host S. Typhimurium. *PLoS One*, 10, e0135010.
- FREDERICKS, L. R., LEE, M. D., ROSLUND, C. R., CRABTREE, A. M., ALLEN, P. B. & ROWLEY, P. A. 2020. The design and implementation of restraint devices for the injection of pathogenic microorganisms into Galleria mellonella. *PLoS One*, 15, e0230767.
- GARCIA-LARA, J., NEEDHAM, A. J. & FOSTER, S. J. 2005. Invertebrates as animal models for Staphylococcus aureus pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 43, 311-23.
- GIBREEL, T. M. & UPTON, M. 2013. Synthetic epidermicin NI01 can protect Galleria mellonella larvae from infection with Staphylococcus aureus. *J Antimicrob Chemother*, 68, 2269-73.
- GRIZANOVA, E. V., COATES, C. J., BUTT, T. M. & DUBOVSKIY, I. M. 2021. RNAi-mediated suppression of insect metalloprotease inhibitor (IMPI) enhances Galleria mellonella susceptibility to fungal infection. *Dev Comp Immunol*, 122, 104126.
- HARAGA, A., OHLSON, M. B. & MILLER, S. I. 2008. Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*, 6, 53-66.
- HERNANDEZ, R. J., HESSE, E., DOWLING, A. J., COYLE, N. M., FEIL, E. J., GAZE, W. H. & VOS, M. 2019. Using the wax moth larva Galleria mellonella infection model to detect emerging bacterial pathogens. *PeerJ*, 6, e6150.
- HILLYER, J. F. 2016. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev Comp Immunol*, 58, 102-18.
- HOFFMANN, J. A. 1995. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol*, 7, 4-10.
- HOHMANN, E. L. 2001. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis*, 32, 263-9.
- HORMAECHE, C. E. 1979. Natural resistance to Salmonella typhimurium in different inbred mouse strains. *Immunology*, 37, 311-8.
- HUANG, X. W., XU, M. N., ZHENG, H. X., WANG, M. L., LI, L., ZENG, K. & LI, D. D. 2020. Pre-exposure to Candida glabrata protects Galleria mellonella against subsequent lethal fungal infections. *Virulence*, 11, 1674-1684.
- JACOBSEN, I. D. 2014. Galleria mellonella as a model host to study virulence of Candida. *Virulence*, 5, 237-9.
- KOCH, G., NADAL-JIMENEZ, P., COOL, R. H. & QUAX, W. J. 2014. Assessing Pseudomonas virulence with nonmammalian host: Galleria mellonella. *Methods Mol Biol*, 1149, 681-8.

- KURTZ, J. 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol*, 26, 186-92.
- LANGE, A., BEIER, S., HUSON, D. H., PARUSEL, R., IGLAUER, F. & FRICK, J. S. 2018. Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). *Genome Announc*, 6.
- LAVINE, M. D. & STRAND, M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol*, 32, 1295-309.
- LEBRETON, F., LE BRAS, F., REFFUVEILLE, F., LADJOUZI, R., GIARD, J. C., LECLERCQ, R. & CATTOIR, V. 2011. *Galleria mellonella* as a model for studying *Enterococcus faecium* host persistence. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 21, 191-6.
- LOH, J. M., ADENWALLA, N., WILES, S. & PROFT, T. 2013. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*, 4, 419-28.
- LUIZ DE FREITAS, L., PEREIRA DA SILVA, F., FERNANDES, K. M., CARNEIRO, D. G., LICURSI DE OLIVEIRA, L., MARTINS, G. F. & DANTAS VANETTI, M. C. 2021. The virulence of *Salmonella* Enteritidis in *Galleria mellonella* is improved by N-dodecanoyl-homoserine lactone. *Microb Pathog*, 152, 104730.
- MAJOWICZ, S. E., MUSTO, J., SCALLAN, E., ANGULO, F. J., KIRK, M., O'BRIEN, S. J., JONES, T. F., FAZIL, A. & HOEKSTRA, R. M. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*, 50, 882-9.
- MÉNARD, G., ROUILLON, A., CATTOIR, V. & DONNIO, P. Y. 2021. *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 782733.
- MOHRIG, W. M., B. 1968a. Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. *Biologisches Zentralblatt*, 87, 439–470.
- MOWLDS, P., BARRON, A. & KAVANAGH, K. 2008a. Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Microbes Infect*, 10, 628-34.
- MOWLDS, P., COATES, C., RENWICK, J. & KAVANAGH, K. 2010. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. *Microbes Infect*, 12, 146-53.
- MOWLDS, P. & KAVANAGH, K. 2008b. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 165, 5-12.
- MUKHERJEE, K., FISCHER, R. & VILCINSKAS, A. 2012. Histone acetylation mediates epigenetic regulation of transcriptional reprogramming in insects during metamorphosis, wounding and infection. *Front Zool*, 9, 25.
- MUKHERJEE, K. & VILCINSKAS, A. 2014. Development and immunity-related microRNAs of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC Genomics*, 15, 705.
- NAGEL, L. 2024. Einsatz des Modellorganismus *Galleria mellonella* zur Bestimmung neuer Therapieansätze bei Infektionen – Untersuchungen auf Basis einer Transkriptom-Sequenzierung. Universität Tübingen.

- NALE, J. Y., VINNER, G. K., LOPEZ, V. C., THANKI, A. M., PHOTHAWORN, P., THIENNIMITR, P., GARCIA, A., ABUOUN, M., ANJUM, M. F., KORBSRISATE, S., GALYOV, E. E., MALIK, D. J. & CLOKIE, M. R. J. 2020. An Optimized Bacteriophage Cocktail Can Effectively Control Salmonella in vitro and in Galleria mellonella. *Front Microbiol*, 11, 609955.
- NETEA, M. G., JOOSTEN, L. A., LATZ, E., MILLS, K. H., NATOLI, G., STUNNENBERG, H. G., O'NEILL, L. A. & XAVIER, R. J. 2016. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352, aaf1098.
- NETEA, M. G., QUINTIN, J. & VAN DER MEER, J. W. 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*, 9, 355-61.
- OCHANDO, J., MULDER, W. J. M., MADSEN, J. C., NETEA, M. G. & DUIVENVOORDEN, R. 2023. Trained immunity - basic concepts and contributions to immunopathology. *Nat Rev Nephrol*, 19, 23-37.
- RAMARAO, N., NIELSEN-LEROUX, C. & LERECLUS, D. 2012. The insect Galleria mellonella as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp*, e4392.
- RATCLIFFE, N. A. 1985. Invertebrate immunity--a primer for the non-specialist. *Immunol Lett*, 10, 253-70.
- RIBEIRO, F. C., DE BARROS, P. P., ROSSONI, R. D., JUNQUEIRA, J. C. & JORGE, A. O. 2017. Lactobacillus rhamnosus inhibits Candida albicans virulence factors in vitro and modulates immune system in Galleria mellonella. *J Appl Microbiol*, 122, 201-211.
- RICHTER-DAHLFORS, A., BUCHAN, A. M. & FINLAY, B. B. 1997. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med*, 186, 569-80.
- ROSSONI, R. D., FUCHS, B. B., DE BARROS, P. P., VELLOSO, M. D., JORGE, A. O., JUNQUEIRA, J. C. & MYLONAKIS, E. 2017. Lactobacillus paracasei modulates the immune system of Galleria mellonella and protects against Candida albicans infection. *PLoS One*, 12, e0173332.
- SALZET, M. 2001. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol*, 22, 285-8.
- SCALFARO, C., IACOBINO, A., NARDIS, C. & FRANCIOSA, G. 2017. Galleria mellonella as an in vivo model for assessing the protective activity of probiotics against gastrointestinal bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Lett*, 364.
- SEITZ, V., CLERMONT, A., WEDDE, M., HUMMEL, M., VILCINSKAS, A., SCHLATTERER, K. & PODSIADLOWSKI, L. 2003. Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (Galleria mellonella) by a subtractive hybridization approach. *Dev Comp Immunol*, 27, 207-15.
- SEMENOVA, A. D., GLAZACHEV, Y. I., SLEPNEVA, I. A. & GLUPOV, V. V. 2014. Quantitative determination of nitric oxide production in haemocytes: nitrite reduction activity as a potential pathway of NO formation in haemolymph of Galleria mellonella larvae. *Nitric Oxide*, 37, 46-52.

- SENIOR, N. J. & TITBALL, R. W. 2020. Isolation and primary culture of *Galleria mellonella* hemocytes for infection studies. *F1000Res*, 9, 1392.
- SERIBELLI, A. A., CRUZ, M. F., VILELA, F. P., FRAZÃO, M. R., PAZIANI, M. H., ALMEIDA, F., MEDEIROS, M. I. C., RODRIGUES, D. D. P., KRESS, M., ALLARD, M. W. & FALCÃO, J. P. 2020. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from humans and foods in Brazil. *PLoS One*, 15, e0237886.
- SHAIK, H. A. & SEHNAL, F. 2009. Hemolin expression in the silk glands of *Galleria mellonella* in response to bacterial challenge and prior to cell disintegration. *J Insect Physiol*, 55, 781-7.
- SHEEHAN, G., FARRELL, G. & KAVANAGH, K. 2020. Immune priming: the secret weapon of the insect world. *Virulence*, 11, 238-246.
- SILVA, F. P. D., FERNANDES, K. M., FREITAS, L. L., CASCARDO, R. S., BERNARDES, R. C., OLIVEIRA, L. L., MARTINS, G. F. & VANETTI, M. C. D. 2021. Effects of sub-lethal doses of nisin on the virulence of *Salmonella enterica* in *Galleria mellonella* larvae. *Res Microbiol*, 172, 103836.
- TANNENBAUM, J. & BENNETT, B. T. 2015. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 54, 120-32.
- TASZŁOW, P., VERTYPOROKH, L. & WOJDA, I. 2017. Humoral immune response of *Galleria mellonella* after repeated infection with *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol*, 149, 87-96.
- TOJO, S., NAGANUMA, F., ARAKAWA, K. & YOKOO, S. 2000. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol*, 46, 1129-1135.
- TSAI, C. J., LOH, J. M. & PROFT, T. 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7, 214-29.
- UPADHYAY, A., UPADHYAYA, I., MOOYOTTU, S. & VENKITANARAYANAN, K. 2016. Eugenol in combination with lactic acid bacteria attenuates *Listeria monocytogenes* virulence in vitro and in invertebrate model *Galleria mellonella*. *J Med Microbiol*, 65, 443-455.
- VERTYPOROKH, L. & WOJDA, I. 2017. Expression of the insect metalloproteinase inhibitor IMPI in the fat body of *Galleria mellonella* exposed to infection with *Beauveria bassiana*. *Acta Biochim Pol*, 64, 273-278.
- VERTYPOROKH, L. & WOJDA, I. 2020. Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*. *J Invertebr Pathol*, 170, 107327.
- VIEGAS, S. C., MIL-HOMENS, D., FIALHO, A. M. & ARRAIANO, C. M. 2013. The virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in the insect model *Galleria mellonella* is impaired by mutations in RNase E and RNase III. *Appl Environ Microbiol*, 79, 6124-33.
- VILCINSKAS, A. 2016. The role of epigenetics in host-parasite coevolution: lessons from the model host insects *Galleria mellonella* and *Tribolium castaneum*. *Zoology (Jena)*, 119, 273-80.

- VILELA, S. F., BARBOSA, J. O., ROSSONI, R. D., SANTOS, J. D., PRATA, M. C., ANBINDER, A. L., JORGE, A. O. & JUNQUEIRA, J. C. 2015. Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence*, 6, 29-39.
- VILMOS, P. & KURUCZ, E. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Lett*, 62, 59-66.
- WAND, M. E., MÜLLER, C. M., TITBALL, R. W. & MICHELL, S. L. 2011. Macrophage and *Galleria mellonella* infection models reflect the virulence of naturally occurring isolates of *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. oklahomensis*. *BMC Microbiol*, 11, 11.
- WATSON, F. L., PÜTTMANN-HOLGADO, R., THOMAS, F., LAMAR, D. L., HUGHES, M., KONDO, M., REBEL, V. I. & SCHMUCKER, D. 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science*, 309, 1874-8.
- WOJDA, I., CYTRYŃSKA, M., ZDYBICKA-BARABAS, A. & KORDACZUK, J. 2020a. Insect Defense Proteins and Peptides. *Subcell Biochem*, 94, 81-121.
- WOJDA, I., STANIEC, B., SUŁEK, M. & KORDACZUK, J. 2020b. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. *Pathog Dis*, 78.
- WU, G., LIU, Y., DING, Y. & YI, Y. 2016a. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue Cell*, 48, 297-304.
- WU, G., XU, L. & YI, Y. 2016b. *Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportionate cellular and humoral immune responses. *Immunol Lett*, 174, 45-52.
- WU, G., ZHAO, Z., LIU, C. & QIU, L. 2014. Priming *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae with heat-killed bacterial cells induced an enhanced immune protection against *Photobacterium luminescens* TT01 and the role of innate immunity in the process. *J Econ Entomol*, 107, 559-69.
- YI, H. Y., CHOWDHURY, M., HUANG, Y. D. & YU, X. Q. 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 5807-22.
- ZDYBICKA-BARABAS, A., STĄCZEK, S., MAK, P., SKRZYPIEC, K., MENDYK, E. & CYTRYŃSKA, M. 2013. Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipoprotein III and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1828, 1449-56.
- ZDYBICKA-BARABAS, A., STĄCZEK, S., PAWLIKOWSKA-PAWŁĘGA, B., MAK, P., LUCHOWSKI, R., SKRZYPIEC, K., MENDYK, E., WYDRYCH, J., GRUSZECKI, W. I. & CYTRYŃSKA, M. 2019. Studies on the interactions of neutral *Galleria mellonella* cecropin D with living bacterial cells. *Amino Acids*, 51, 175-191.
- ZITZMANN, J., WEIDNER, T. & CZERMAK, P. 2017. Optimized expression of the antimicrobial protein Gloverin from *Galleria mellonella* using stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Cytotechnology*, 69, 371-389.

## 8 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.

Die Konzeption der Studie entstand durch Frau Prof. Dr. Julia-Stefanie Frick, der Leiterin der Forschungsgruppe. Die Anleitung und Beratung bei der Durchführung praktischer Experimente, der Dokumentation sowie der statistischen Auswertung erfolgten durch Dr. Lena Michaelis und Andrea Schäfer.

Nach einer Einarbeitung durch die Mitglieder der Arbeitsgruppe wurden die Versuche eigenständig von mir durchgeführt, unterstützt von Andrea Schäfer, Dr. Lena Michaelis, Sophia Schneider, Dr. Thomas Hagemann, Ronja Dobritz und Johanna Jakob.

Der für die Versuche benötigte Bakterienstamm *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium SB300 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Samuel Wagner, vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen, bereitgestellt.

Die Genexpressionsanalysen nach der einmaligen Stimulation von *Galleria mellonella* mit  $10^5$  S.T./ml der Gene, die für NOS und IMPI kodieren (3.5), wurden von Dr. Lisa Nagel aus derselben Forschungsgruppe generiert und bereits im Rahmen ihrer Dissertation (2024) veröffentlicht.

Ich versichere, das Manuskript eigenständig verfasst zu haben und nur die angegebenen Quellen verwendet zu haben. Für die abschließende Überarbeitung erhielt ich Unterstützung durch Dr. Libera Lo Presti.

---

Ort, Datum, Unterschrift

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mich bei der Entstehung dieser Doktorarbeit unterstützt und ermutigt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Julia-Stefanie Frick, die mein Interesse an der Mikrobiologie durch ihre inspirierenden Vorlesungen geweckt hat. Vielen Dank für die Gelegenheit, Teil der Arbeitsgruppe zu werden und dieses Projekt mit einem hohen Maß an Eigenverantwortung zu entwickeln. Für die intensive Unterstützung im Labor und die geduldige Einarbeitung in neue Methoden danke ich insbesondere Andrea Schäfer. Die produktive und stets angenehme Zusammenarbeit hat mein Projekt entscheidend geprägt. Ebenso bin ich Dr. Lena Michaelis für ihre wertvollen Ratschläge sehr dankbar. Beide haben durch ihre organisatorischen und fachlichen Beiträge maßgeblich zum Gelingen des Projekts beigetragen. Mein Dank geht auch an die gesamte Arbeitsgruppe Frick, die offene Atmosphäre und das Teamwork haben mir die Arbeit wirklich erleichtert. Ich danke zudem Prof. Dr. Erwin Bohn, der mir in der Abschlussphase mit wertvollem Rat zur Seite stand.

Ich bedanke mich außerdem beim Interdisziplinären Promotionskolleg Medizin der Universität Tübingen, das mir durch eine Förderung diese wissenschaftliche Arbeit erst ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Samuel Wagner, der die Betreuung meines Projekts übernommen hat, als die Auflösung der Arbeitsgruppe eine Fortführung meiner Arbeit gefährdete. Durch sein Engagement und seine Unterstützung konnte das Projekt erfolgreich zum Abschluss gebracht werden. Ebenso danke ich Prof. Dr. Sabine Bélard herzlich, die sich ebenfalls als Betreuerin kurzfristig eingebracht und mich in dieser entscheidenden Phase unterstützt hat. Einen ebenso besonderen Dank richte ich an Dr. Libera Lo Presti, die mich beim finalen Schreibprozess der Arbeit unterstützte und mir mit konstruktiver Kritik wertvolle Impulse gab.

Zum Abschluss möchte ich meiner Familie von Herzen danken. Ihre bedingungslose Unterstützung, Geduld und Ermutigung haben mir in jeder Phase dieser Arbeit Kraft und Zuversicht gegeben.