

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

## **B I O L O G I E**

### **Forschungsvorhaben:**

Verbundvorhaben MENAGE:  
Metagenomische Analyse der Zusammensetzung und Dynamik der  
Mikrobiota humaner Nasenhabitats; Teilprojekt Göttingen

**Förderkennzeichen:** 0315832C

**Zuwendungsempfänger:** Georg-August-Universität Göttingen,  
37070 Göttingen

**Ausführende Stelle:** Georg-August-Universität Göttingen - Biologische Fakultät -  
Institut für Mikrobiologie und Genetik, Grisebachstr. 8, 37077 Göttingen

**Projektleitung:** Herr Prof. Dr. Rolf Daniel

**Laufzeit:** 01.09.2010 bis 31.08.2014

"Das diesem Bericht zugrundeliegende BMBF-Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315832C gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor".

## Schlussbericht

(gemäß BNBest-BMBF 98 (Stand: April 2006) Nr. 3.2)

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Georg-August-Universität Göttingen Prof. Dr. R. Daniel	<b>Förderkennzeichen:</b> 0315832C
<b>Vorhabenbezeichnung:</b> Verbundvorhaben MENAGE: Metagenomische Analyse der Zusammensetzung und Dynamik der Mikrobiota humaner Nasenhabitats; Teilprojekt Göttingen	
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2010 - 31.08.2014	

### I. Kurzdarstellung

#### 1. Aufgabenstellung

Das Gesamtverbundvorhaben beschäftigte sich mit der Mikrobiota in der menschlichen Nase. Infektionen in diesem Bereich sind eine Quelle und ein Risikofaktor für nachfolgende Infektionen mit dem opportunistisch pathogenen Organismus *Staphylococcus aureus*. Ein besonderer Fokus lag daher auf der Untersuchung von nasalen mikrobiellen Gemeinschaften, die *St. aureus* enthalten. Etwa 30 % der Bevölkerung sind sogenannte stabile *St. aureus*-Träger. Hier ist *S. aureus* ein ständiges Mitglied der mikrobiellen Flora in der Nase. Das Bakterium zeigt in diesem Habitat jedoch selten Pathogenität und scheint ein meistens harmloser Kommensale in der Nase zu sein. Im Falle eines geschwächten Immunsystems kann *St. aureus* jedoch zu zahlreichen teilweise lebensbedrohlichen Krankheitsbildern führen. Als besonders gefährlich gelten sogenannte MRSA (**M**ethicillin-**r**esistente *Staphylococcus aureus*)-Stämme, die multiple Antibiotikaresistenzen ausgebildet haben.

Schwerpunkt dieses Teilprojekts war die Analyse der Zusammensetzung und Genexpression der nasalen mikrobiellen Gemeinschaft von *St. aureus*-Trägern mit kultivierungsunabhängigen metagenomischen bzw. metatranskriptomischen Verfahren. Die Analysen sollten auch Gründe aufzeigen, warum *St. aureus* in der Nase normalerweise bei den stabilen Trägern keine Pathogenität zeigt. Es wird vermutet, dass die Mitglieder der nasalen mikrobiellen Gemeinschaft eine Art ökologisches Gleichgewicht sichern und *St. aureus* somit stabilisiert wird. Im Rahmen des Teilprojekts sollten DNA und RNA aus nasalen Habitaten verschiedener Träger isoliert und anschließend mit "Next-Generation"-Sequenzieretechnologien sequenziert und analysiert werden. Die bioinformatische Auswertung sollte zur Bestimmung der taxonomischen Zusammensetzung und Diversität der nasalen mikrobiellen

Gemeinschaft dienen. Weiterhin sollten funktionelle Expressionsprofile (Metatranskriptome) der nasalen Gemeinschaften erstellt werden. In beiden Fällen standen dabei *St. aureus*-Stämme des nasalen Mikrobioms im Vordergrund. Durch diese Daten sollten Schlüsselfunktionen und, falls vorhanden, exprimierte Pathogenitätsfaktoren von *St. aureus* identifiziert werden, die in nasalen Habitaten auftreten und als Ansatzpunkte für Interventionsansätze dienen können.

## 2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Voraussetzungen für die Erfüllung der vorgesehenen Aufgaben in Bezug auf die notwendigen Metagenom- und Metatranskriptomanalysen und Anpassung entsprechender bioinformatischer Methoden an nasale mikrobielle Gemeinschaften waren sehr gut, da die Arbeitsgruppe über große Erfahrungen in der kultivierungsunabhängigen taxonomischen und funktionellen Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften unter Beteiligung von "Next-Generation"-Sequenziertechnologien verfügt. Ferner wurde in vorangegangenen Förderinitiativen die notwendige Geräteinfrastruktur für die Analysen aufgebaut. Es standen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler mit der nötigen Erfahrung für die praktische Durchführung der Metagenom- und Metatranskriptomprojekte und die Analyse der dabei erhaltenen Daten über die gesamte Förderperiode zur Verfügung.

## 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Für die Realisierung der Forschungsaufgabe mussten zur Vorbereitung der metagenomischen und metatranskriptomischen Sequenzanalysen der mikrobiellen Gemeinschaften in den Nasenhabitaten Methoden zur Probennahme der Nasen-Mikrobiota und anschließenden DNA/RNA-Isolierung entwickelt und validiert werden. Ferner mussten Individuen mit kolonisierten *St. aureus*-Stämmen in der Nase (stabile Träger) identifiziert werden. Hierfür kamen nur Nichtraucher in Frage, die in den letzten drei Monaten keine Antibiotikabehandlung oder Behandlungen im Nasen-Rachenraum hatten. Mit sterilen Wattestäbchen sollten Proben aus den Nasenlöchern entnommen und analysiert werden. Anschließend sollten die Proben auf Indikatorplatten für *St. aureus* gebracht werden. Ob es sich bei den identifizierten Kolonien tatsächlich um *St. aureus* handelt sollte durch 16S rRNA-Gensequenzanalysen verifiziert werden. Diese Versuchsschritte sollten mehrfach wiederholt werden, um zu überprüfen, inwieweit *St. aureus* tatsächlich ein ständiges Mitglied der mikrobiellen Nasenflora ist. Für die Analyse der Metagenome und -transkriptome sollte zunächst aus nasalen Proben die gesamte DNA und RNA isoliert werden. Im Falle der RNA sollte die ribosomale RNA abgetrennt werden. Da davon ausgegangen werden konnte, dass die Menge an verbliebener mRNA bzw. der daraus generierten cDNA sehr gering ist, sollte diese

mittels eines Amplifikationsschrittes vermehrt und abschließend mittels "Next-Generation"-Sequenzieretechnologie sequenziert werden. Die resultierenden Sequenzdaten sollten dann nach Prozessierung mittels verschiedener bioinformatischer Werkzeuge analysiert werden.

Parallel dazu sollte die DNA zur Bestimmung der nasalen mikrobiellen Gemeinschaft mittels Amplikon-basierter Ansätze verwendet werden. Zur Vermeidung eines "Bias" sollte die Analyse in unabhängigen Triplikaten erfolgen. Die Sequenzierung der Amplifikate sollte anschließend mittels Pyrosequenzierung erfolgen. Die generierten Metagenom- und Transkriptomdaten sollten bioinformatisch unter Nutzung der in der Technologieplattform Göttingen vorhandenen Infrastruktur ausgewertet, das taxonomische Profiling mit Hilfe der von uns entwickelten phylogenetischen Analyse-Pipeline für Metagenome und 16S rRNA-Genamplikons durchgeführt werden.

Zur Identifizierung von Schlüsselgenen sollte zunächst ein Mapping der nasalen Transkriptomdaten auf bekannte Genomsequenzen durchgeführt werden. Dies ermöglicht auch eine Quantifizierung der Transkripte und eine Identifizierung von Schlüsselfunktionen. Die im Rahmen der Analysen erhaltenen Ergebnisse sollten zur Aufstellung von funktionellen Profilen und für den Vergleich der Genexpressionsprofile in verschiedenen *St. aureus*-Trägern benutzt werden. Dieses erlaubt die Identifikation von Transkripten, die in der nasalen mikrobiellen Gemeinschaft abundant sind. Die im Rahmen dieser Untersuchungen identifizierten charakteristischen *St. aureus*-Transkripte sind potentielle Angriffspunkte für die Diagnostik oder Intervention.

Die vorhandene bioinformatische Infrastruktur für die Sequenzanalysen wurde im Förderzeitraum in Hinblick Infektionsfragestellungen optimiert. Diese Arbeiten profitierten davon, dass die notwendige Hard- und Software hier im Hause zur Verfügung steht. Diese wurde im Laufe der Förderperiode ebenfalls aus anderen Mitteln erweitert bzw. durch eigene Softwareentwicklungen ergänzt. Insgesamt waren damit die Voraussetzungen für einen erfolgreichen Ablauf der bearbeiteten Sequenzen sowie für die Weiter- und Neuentwicklung von OMICs-Methoden zur Analyse mikrobiellen Gemeinschaften verbessert.

#### 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die funktionelle Genomforschung gehört weltweit zu den wichtigsten Gebieten der Lebenswissenschaften. Der Einsatz kultivierungsunabhängiger Methoden, die auf direkt isolierter DNA oder RNA basieren, zur Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften zusammen mit der Anwendung von „Next-Generation“-Sequenzieretechnologien erlaubt die Erfassung von Struktur, Dynamik und Funktion von komplexen mikrobiellen Konsortien. Durch den Einsatz von kultivierungsunabhängigen Metagenom- und Metatranskriptomanalysen ist es theoretisch möglich, jeden einzelnen mikrobiellen Vertreter einer Gemeinschaft zu erfassen. Dies ist ein deutlicher

Unterschied zu kultivierungsabhängigen Analysen, da etwa nur durchschnittlich 1 % der unterschiedlichen Arten in einer Probe unter Laborbedingungen kultivierbar sind.

Metagenomik und Metatranskriptomik werden z.B. im Rahmen des Humanen Mikrobiom-Projekts eingesetzt, bei dem verschiedene mikrobielle Habitate des menschlichen Körpers untersucht werden. Schwerpunkte sind dabei jedoch der Intestinaltrakt und die Körperoberfläche (Haut). Die verschiedenen Habitate innerhalb der Nase sind bisher aber nicht intensiv untersucht worden.

*St. aureus* verursacht eine Vielzahl von Krankheiten und Antibiotika-resistente Stämme sind im Klinikbereich auf dem Vormarsch. Es konnte gezeigt werden, dass nasale Kolonisierung die Hauptquelle für spätere schwere *St. aureus*-Infektionen ist. Es wird davon ausgegangen, dass sich nasale *St. aureus*-Keime, die dort scheinbar als harmlose Kommensale existieren, im Falle eines beeinträchtigten Immunsystems oder anderer körperschwächender Faktoren auf andere Körperbereiche ausbreiten und dort schwere Infektionen hervorrufen können. Daher ist eine Untersuchung von *St. aureus* in der Nase von außerordentlicher Bedeutung.

Im Rahmen des Verbundprojekts wurden metagenomische und metatranskriptomische Methoden unter Verwendung von „Next-generation“-Sequenzieretechnologien zur Analyse der Zusammensetzung und Funktion der nasalen mikrobiellen Gemeinschaft eingesetzt. Diese Technologien erlauben den Zugriff auf das gesamte Metagenom und -transkriptom, die direkte Quantifizierung der Genexpression und die Identifizierung von bisher unbekanntem sowie essentiellen Transkripten. Kombiniert mit Genom- und Metagenomdaten erlaubt die Metatranskriptomik, die Dynamik, Antworten und funktionelle Anpassungen von mikrobiellen Gemeinschaften zu bestimmen. Hierdurch können potentielle Ziele für Diagnostik, Intervention und Therapie identifiziert werden.

## 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

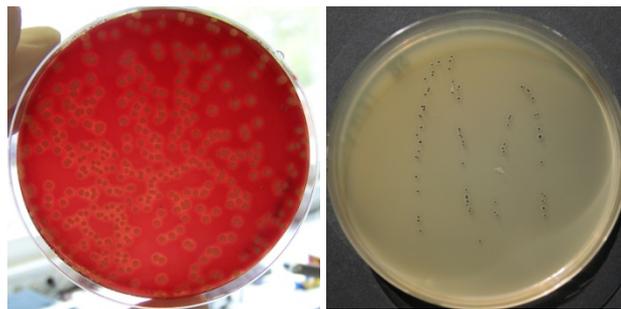
Im Rahmen dieses Teilprojekts wurde vorwiegend mit den Projektgruppen innerhalb dieses Verbundprojekts zusammengearbeitet. Desweiteren bestand eine sehr enge und konstruktive Zusammenarbeit der Technologieplattform Göttingen mit vielen Verbänden der Förderinitiative "Medizinische Infektionsgenomik" (z.B. UroGenOmics, diabetischer Fuss). Darüber hinaus erfolgten intensive Kooperationen mit verschiedenen Projekten aus der BMBF-Förderinitiative "GenoMik-Transfer". Schließlich entwickelten sich nationale und internationale Kooperationen mit Arbeitsgruppen über die Förderinitiative hinaus.

## II. Eingehende Darstellung

### 1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Taxonomische und funktionelle Expressionsanalysen von nasalen mikrobiellen Gemeinschaften insbesondere bei stabilen *Staphylococcus aureus*-Trägern standen im Fokus der Arbeiten. Auf die wesentlichen Ergebnisse soll im Folgenden eingegangen werden.

Zur Identifizierung von stabilen *St. aureus*-Trägern wurden mit sterilen "Swabs" nasale Proben von Probanden entnommen. Anschließend wurden die Proben auf Baird-Parker- und Blutagarplatten gebracht. *St. aureus* zeigt aufgrund seiner metabolischen Aktivität auf diesen Agarplatten charakteristische Kolonien (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Indikatoragarplatten zum Nachweis von *St. aureus*.** Links: Blutagarplatte zeigt Kolonien mit charakteristischen transparenten Höfen. Rechts: Das Erscheinungsbild von *St. aureus*-Kolonien auf Baird-Parker-Agarplatten ist aufgrund Tellurit-Reduktion schwarz. Um die Kolonien sind helle Höfe ersichtlich, die den Abbau von Eigelb indizieren.

Ob es sich bei den Kolonien tatsächlich um *St. aureus* handelt, wurde anschließend molekular mittels 16S rRNA-Gensequenzanalyse verifiziert. Durch mehrfaches wiederholtes Durchführen des Verfahrens konnten stabile *St. aureus*-Träger identifiziert werden, die im weiteren Projektverlauf für die Probennahme zur Verfügung standen.

Zur Vorbereitung der metagenomischen und metatranskriptomischen Analysen der mikrobiellen Gemeinschaften in den Nasenhabitaten der identifizierten *St. aureus*-Träger wurden Methoden zur Probennahme der Nasen-Mikrobiota und anschließenden DNA- und RNA-Isolierung entwickelt. Hierbei zeigte sich, dass nur "Swabs" in forensischer Qualität zur Probennahme geeignet sind. Anschließend wurde hochwertige mikrobielle DNA und RNA aus den "Swabs" isoliert.

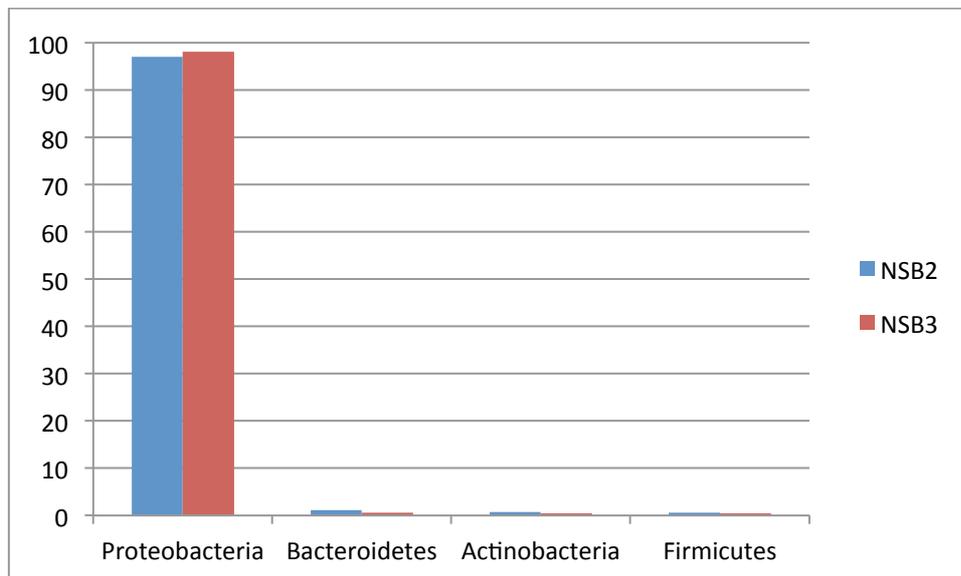
Ein Problem dabei war die aufgrund des limitierten mikrobiellen Materials in der Nase geringe RNA-Ausbeute. Optimiert wurde zunächst das Isolierungsverfahren. Die Extraktion von mRNA erwies sich trotzdem als schwierig. Da in der menschlichen Nase als natürliche Virenabwehr vermehrt RNasen exprimiert werden, konnten auch trotz des Einsatzes von RNase-Inhibitoren nur relativ geringe Mengen an RNA isoliert werden. Eine methodische Verbesserung brachte die Entfernung der ribosomalen RNA und damit die Anreicherung der mRNA, welche für die funktionellen metatranskriptomischen Analysen benötigt wird. Durch Optimierung des enzymatischen Abbaus der rRNA konnte die in der mRNA-Präparation verbleibende rRNA-Verunreinigung auf 15 bis 20% gesenkt werden. Anschließend wurde die amplifizierte mRNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden die Ausgangsmengen für die Sequenzierung durch Amplifikation der hergestellten cDNA gesteigert. Außerdem wurden auch die Sequenzieretechnologien (Pyrosequenzierung und Illumina-Sequenzierung) für die Analyse von mRNA (cDNA) aus mikrobiellen nasalen Konsortien im Hinblick auf die Verwendung von geringen Mengen an Ausgangsmaterial angepasst.

Anschließend erfolgte die DNA-basierte und RNA-basierte Sequenzierung und Analyse der nasalen Metagenome bzw. Metatranskriptome von stabilen *St. aureus*-Trägern und Nicht-Trägern. Die Daten aus den Metagenom- und Metatranskriptomanalysen der nasalen mikrobiellen Gemeinschaften wurden funktionell klassifiziert und quantifiziert. Zur funktionellen Charakterisierung erfolgte zunächst ein Mapping der Metatranskriptomdaten auf bekannte Genomsequenzen und auf in Datenbanken vorhandene Genom- und Metagenomsequenzen. Eine wesentliche Verbesserung des Mappings konnte durch Verwendung eines im Rahmen eines anderen Projekts sequenzierten und publizierten Genoms eines virulenten *St. aureus*-Stammes als Referenz erreicht werden. Die Bestimmung der taxonomischen Zusammensetzung und Diversität der nasalen mikrobiellen Gemeinschaften wurden auf Basis der Metatranskriptomanalysen und von Amplikon-basierten 16S rRNA-Genanalysen durchgeführt. Letzteres konnte mit mehr Individuen durchgeführt werden.

Die Metatranskriptome von stabilen Trägern wurden mit der Illumina-Technik sequenziert. Die Proben wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen genommen, um die Zuverlässigkeit der taxonomischen und funktionellen Klassifizierung sicherzustellen. Nicht in allen Fällen konnte jedoch genügend geeignetes Material (mRNA bzw. cDNA) für die Sequenzierung erhalten werden. Es zeigte sich, dass mit den kleinen Mengen an cDNA als Ausgangsmaterial und mit dem durch die notwendigen Amplifikationsschritte eingeführten "Bias" im Vergleich zu Transkriptomanalysen von Einzelorganismen die Anzahl der verwertbaren Reads deutlich geringer war. Zunächst wurden die erhaltenen mRNA-Reads taxonomisch klassifiziert. Die direkte taxonomische Zuordnung von mRNA-Metatranskriptom-Reads ermöglicht nur eine geringe taxonomische Auflösung.

Höhere phylogenetische Auflösungen werden durch die später beschriebene 16S rRNA-Gensequenzanalyse erreicht.

Die taxonomische Einordnung der Transkripte ist in Abbildung 2 für die beiden Tage aller Ansätze zusammengefasst dargestellt. Die untersuchten Metatranskriptome zeigten für beide Tage ein sehr ähnliches Ergebnis.

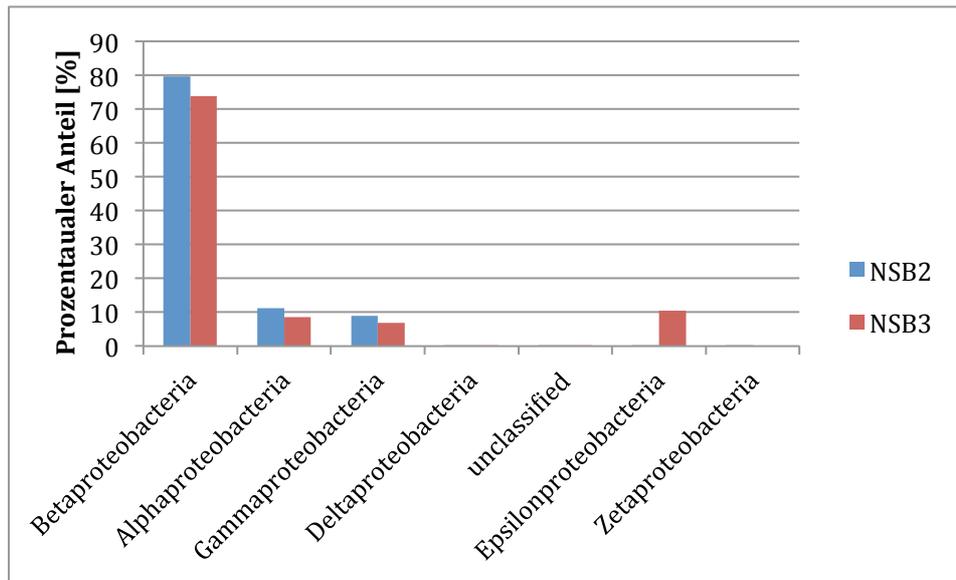


**Abbildung 2: Zusammenfassung der Einteilung der erhaltenen Transkripte auf taxonomischer Ebene.** NSB2; Nasale mikrobielle Gemeinschaft Tag 1; NSB3 Nasale mikrobielle Gemeinschaft am darauffolgenden Tag.

Als die vorherrschenden Phyla konnten die *Proteobacteria* identifiziert werden. Über 95% der klassifizierbaren Reads wurden diesem Phylum zugeordnet. Es folgten die *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* und *Acidobacteria* mit geringen Anteilen. Im Vergleich zu den später gezeigten taxonomischen Einordnungen auf Basis von 16S rRNA-Gensequenzen zeigt sich in der oben dargestellten Abbildung eine ähnliche Zuordnung, jedoch zeigen sich größere Anteile anderer Phyla. Die *Firmicutes*, denen u.a. auch *St. aureus* zuzuordnen ist, stellten in der 16S rRNA-Genanalyse mindestens 6 % und bis zu 95 % der gesamten nasalen Gemeinschaft dar (siehe unten Abbildung 7). Da die Metatranskriptomanalyse auf exprimierter RNA basiert, stellt diese ein Indikator für den aktiven Teil der nasalen mikrobiellen Gemeinschaft dar. Im Gegensatz dazu ist die DNA basierte 16S rRNA-Genanalyse ein Indikator für alle vorhandenen nasalen Mikroorganismen unabhängig von der Aktivität in dem Habitat. Durch Vergleich beider Parameter lassen sich Rückschlüsse auf die Aktivität aller vorhandenen Mikroorganismen in der Nase ziehen. Im Fall der *Firmicutes* (*St. aureus*) weist die Diskrepanz zwischen RNA- und DNA-basierter Analyse darauf hin, dass die *Firmicutes* in der nasalen mikrobiellen Gemeinschaft zwar ein wichtiger Bestandteil sind, jedoch in dieser nur wenig Aktivität zeigen. Es konnten auch im Rahmen der phylogenetischen

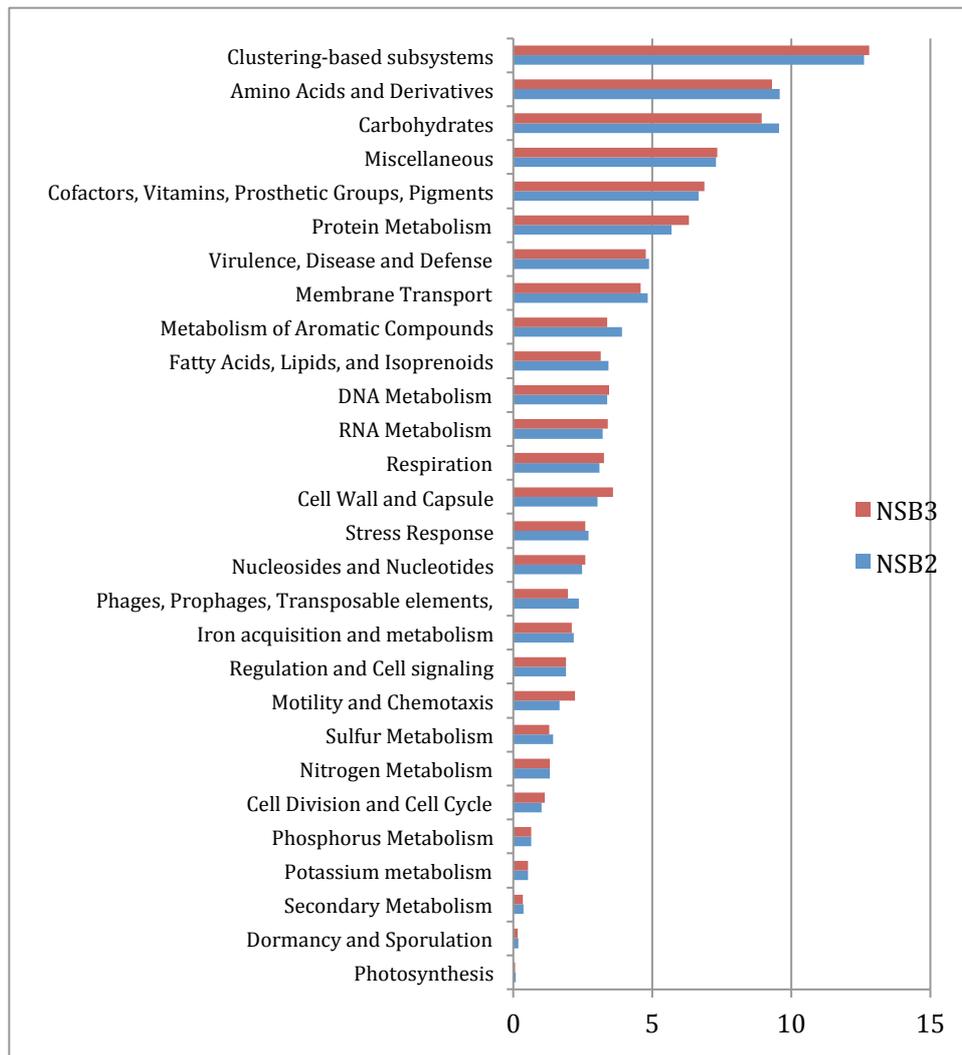
mRNA-Analysen Transkripte direkt verschiedenen bekannten *St. aureus*-Stämmen zugeordnet werden.

Die Transkripte der *Proteobacteria* konnten vorwiegend in die *Betaproteobacteria* eingeordnet werden (Abbildung 3). Innerhalb dieses Phylums sind die *Burkholderiales* mit einem hohen Anteil von über 98 % vertreten.



**Abbildung 3: Zusammenfassung der Einteilung der erhaltenen Transkripte der Proteobakterien in Klassen.** NSB2; Nasale mikrobielle Gemeinschaft Tag 1; NSB3 Nasale mikrobielle Gemeinschaft am darauf folgenden Tag.

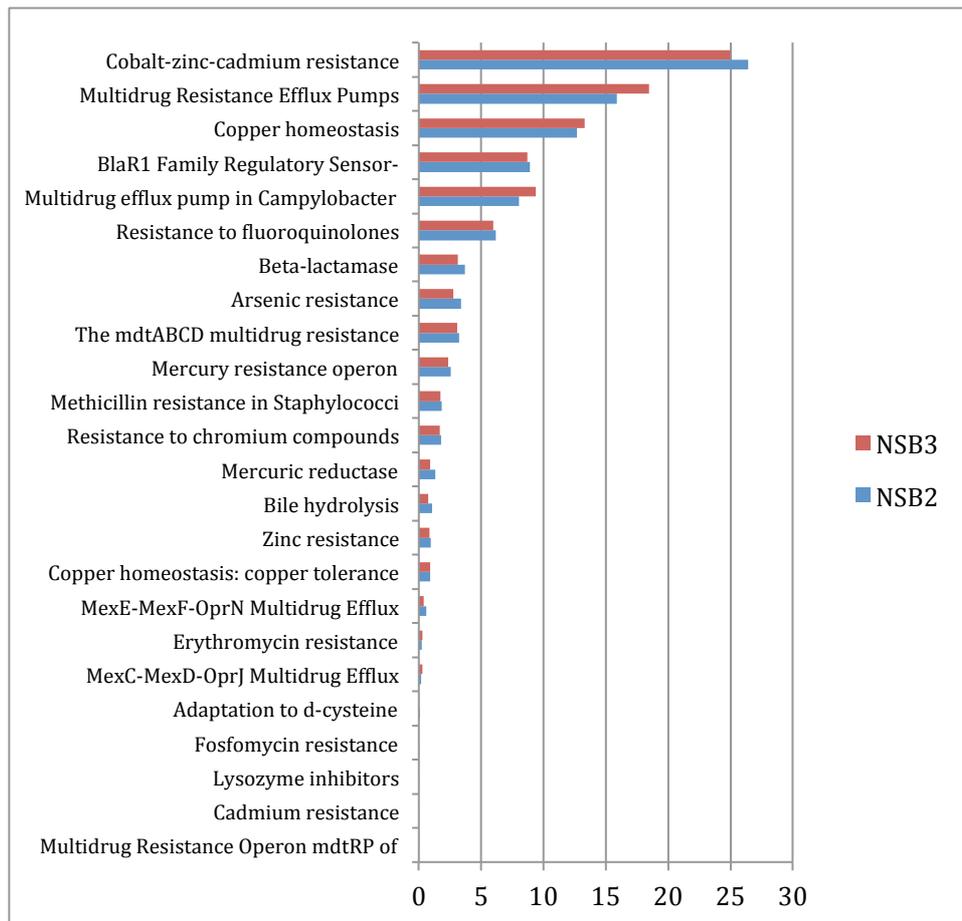
Bei der Einteilung der Transkripte auf funktioneller Ebene zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression an den unterschiedlichen Probenentnahmetagen (Abbildung 4). Die meisten Transkripte fielen funktionell in die Subsysteme der Zellteilung oder des Fettstoffwechsels. Es folgten funktionelle Einteilungen der Transkripte in die Kategorien "Amino Acids and Derivatives", "Carbohydrates", "Miscellaneous", "Cofactors", "Vitamins", "Prosthetic Groups and Pigments" und "Protein Metabolism". Dieses sind Transkripte für normale Stoffwechsellätigkeiten im Grundstoffwechsel einer mikrobiellen Gemeinschaft. Etwa 5 % aller Transkripte wurden der Kategorie "Virulence, Disease and Defense" zugeordnet. Interessanterweise fielen über 75 % dieser Transkripte in die Kategorie für Resistenzen gegen Antibiotika und toxische Verbindungen (Abbildung 5). Auch für verschiedene Resistenzmechanismen typische Efflux-Pumpen werden von der mikrobiellen Gemeinschaft in der Nase in besonderem Maße exprimiert.



**Abbildung 4: Zusammenfassende funktionelle Einteilung der erhaltenen Transkripte.** NSB2; Nasale mikrobielle Gemeinschaft Tag 1; NSB3 Nasale mikrobielle Gemeinschaft am darauf folgenden Tag.

Im Fall der stabilen *St. aureus*-Träger ist es daher wahrscheinlich, dass *St. aureus* aufgrund der Konkurrenzsituation im Nasenhabitat normalerweise als Kommensale lebt und die pathogenen Eigenschaften durch die anderen Mitglieder des nasalen Mikrobioms unterdrückt werden. Es konnten auch eine Vielzahl von typischen Transkripten, die von *St. aureus*-Stämmen stammen, identifiziert werden. Die wichtigsten konnten in fünf einzigartige Kategorien eingeteilt werden (Tabelle 1). Auffällig ist, dass die meisten eine Funktion in der DNA-Reparatur haben. Darüber hinaus wurden Transkripte mit unbekannter Funktion und Transkripte aus bisher nicht abgeleiteten Genen nachgewiesen. Diese stellen potentielle Angriffspunkte für eine Interventionstherapie dar. Die relativ geringe Anzahl der *St. aureus*-Transkripte belegt, dass das Bakterium im Nasenmilieu nicht besonders aktiv ist. Es scheint dort eher

einen Erhaltungsstoffwechsel durchzuführen. Dieses würde die Theorie bestätigen, dass *St. aureus* in der nasalen mikrobiellen Gemeinschaft von anderen Mitgliedern dieser Gemeinschaft stabilisiert wird.

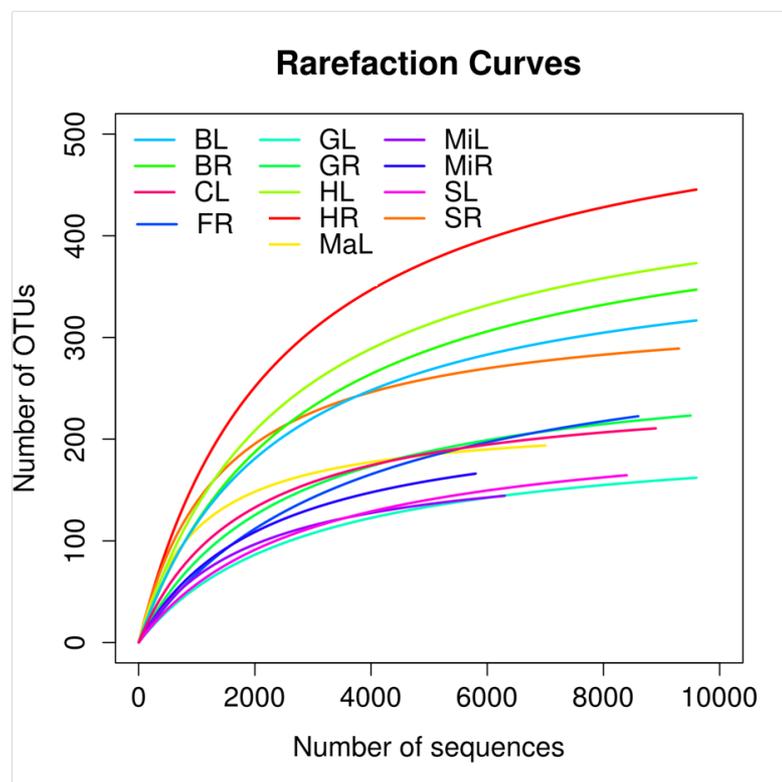


**Abbildung 5: Kategorisierung der erhaltenen bakteriellen Transkripte des Funktionsclusters "Resistance to antibiotics and toxic compounds".** NSB2; Nasale mikrobielle Gemeinschaft Tag 1; NSB3 Nasale mikrobielle Gemeinschaft am darauf folgenden Tag.

**Tabelle 1:** Funktionelle Einordnung der wichtigsten Transkripte von *St. aureus*

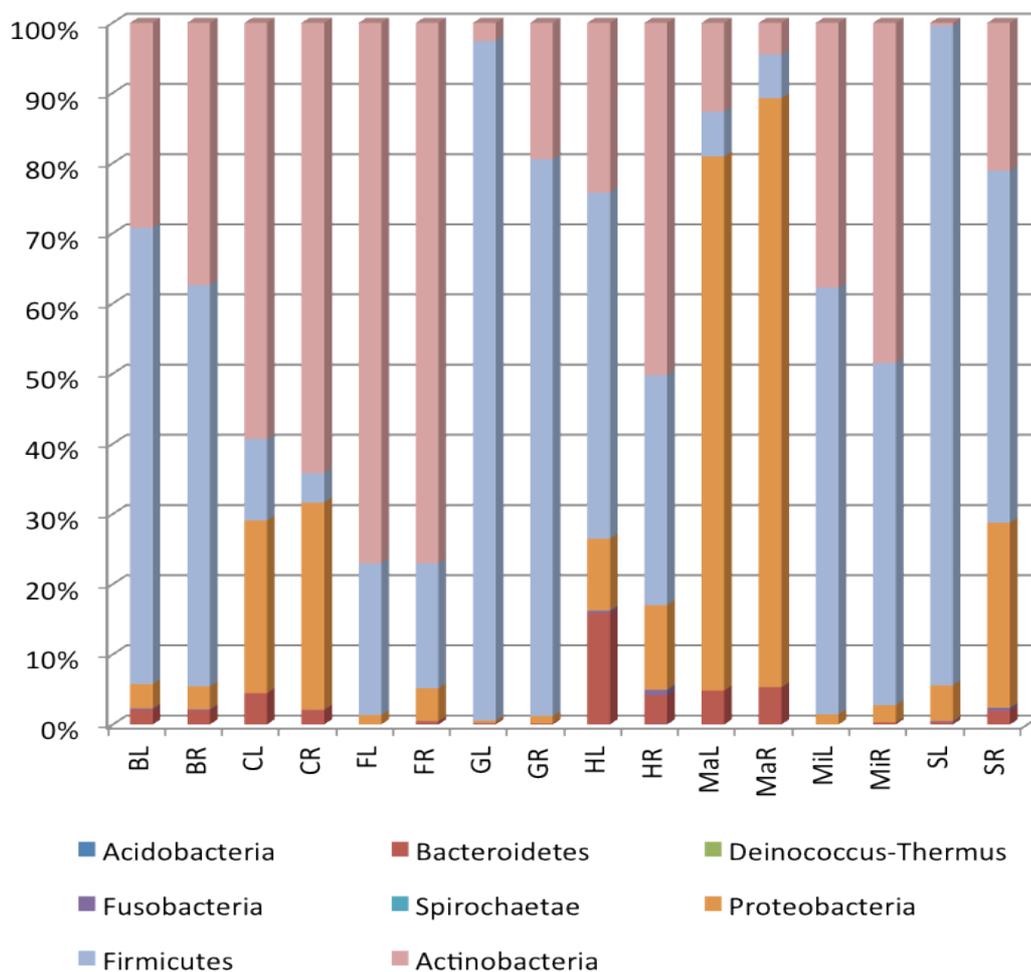
Kategorie	Funktionen
Amino acids and derivatives	Lysine, threonine, methionine, and cysteine permeases
DNA Metabolism	DNA repair, UvrABC system, Exonuclease
Potassium metabolism	Potassium homeostasis
Stress Response	Heat shock, Signal peptidases
Virulence, Disease and Defense	Resistance to antibiotics and toxic compounds, Efflux pumps

Zur Bestimmung der nasalen bakteriellen Gemeinschaft in hoher taxonomischer Auflösung wurden Amplikon-basierte 16S rRNA-Genanalysen mit der isolierten DNA durchgeführt. Die Amplifikate wurden anschließend mittels Pyrosequenzierungstechnologie sequenziert und mit einer von uns etablierten taxonomischen Analysepipeline bioinformatisch ausgewertet. Beprobt und analysiert wurde jeweils die linke und rechte Nasenseite verschiedener Individuen und an verschiedenen Tagen. Die Rarefaction-Analyse der 16S rRNA-Gendatensätze zeigte, dass die Anzahl der erhaltenen Sequenzen die Diversität der nasalen mikrobiellen Gemeinschaft repräsentiert (Abbildung 6)

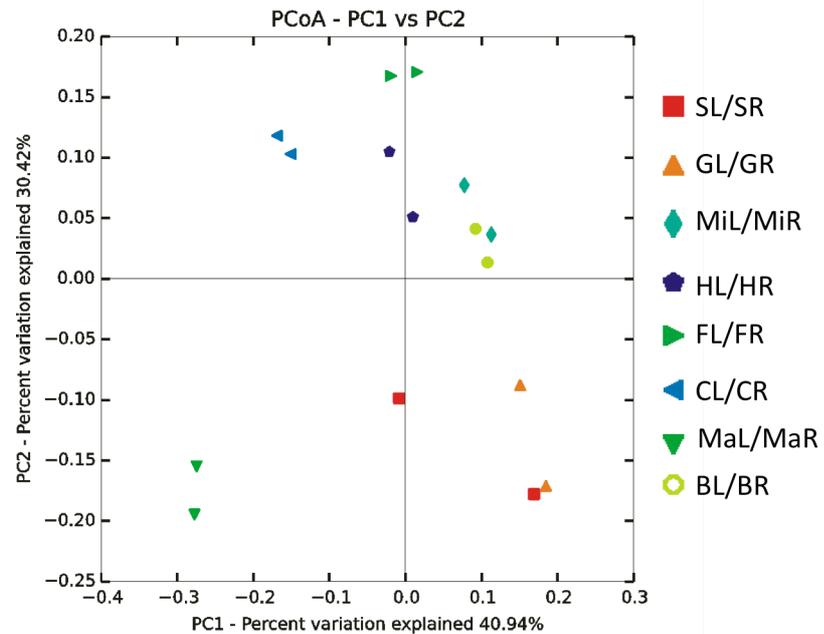


**Abbildung 6:** Rarefaction-Analyse zur Überprüfung der Abdeckung der mikrobiellen Diversität mit den generierten Datensätzen (Analyse beispielhaft für 8 Individuen dargestellt)

Wie in Abbildung 7 erkenntlich ist, gibt es Unterschiede in der Zusammensetzung der nasalen mikrobiellen Gemeinschaften zwischen den unterschiedlichen Individuen. Die Gemeinschaften in dem linken und rechten Nasenloch eines Individuums sind dagegen sehr ähnlich. Die Nase ist ein sehr offenes System und durch Kreuzkontaminationen haben sich in den Nasenlöchern ähnliche Diversitätsprofile entwickelt. Diese wird auch durch eine Cluster-Analyse gezeigt (Abbildung 8). Als dominante und abundante Phyla in allen Proben lassen sich die *Firmicutes*, *Actinobacteria* und *Proteobacteria* erkennen.

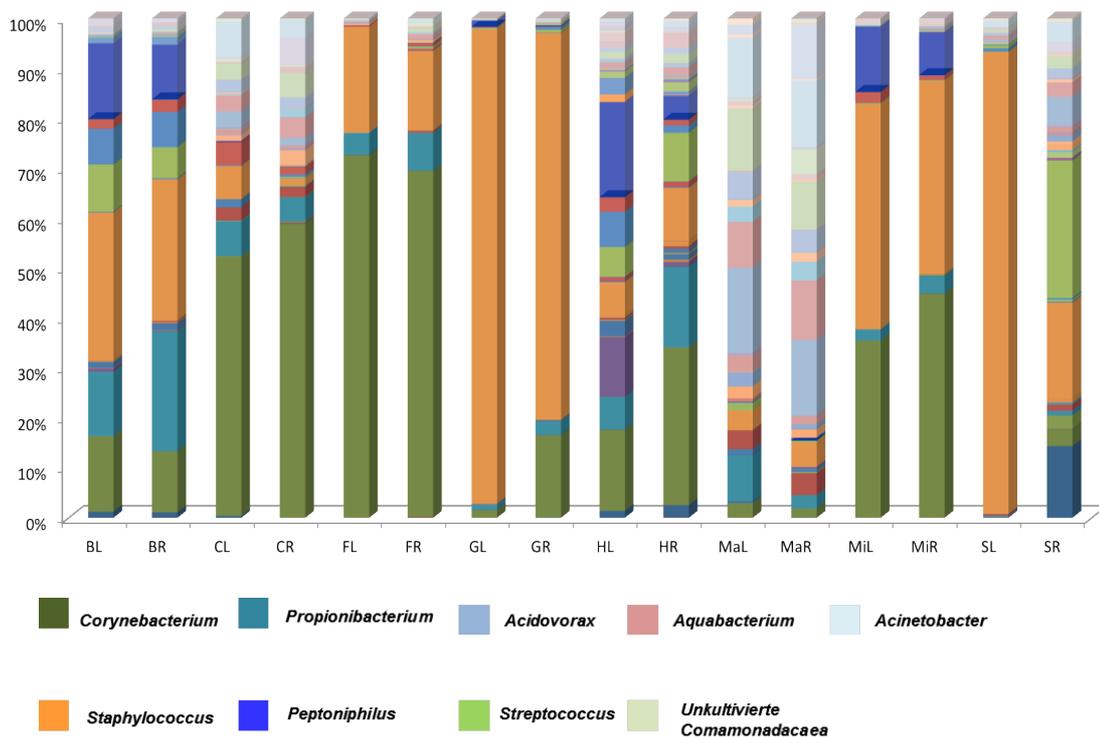


**Abbildung 7: Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen auf Phylumebene.** Dargestellt sind beispielhaft mikrobielle Gemeinschaften von acht Individuen, jeweils das linke und rechte Nasenloch (gekennzeichnet mit „L“ und „R“)



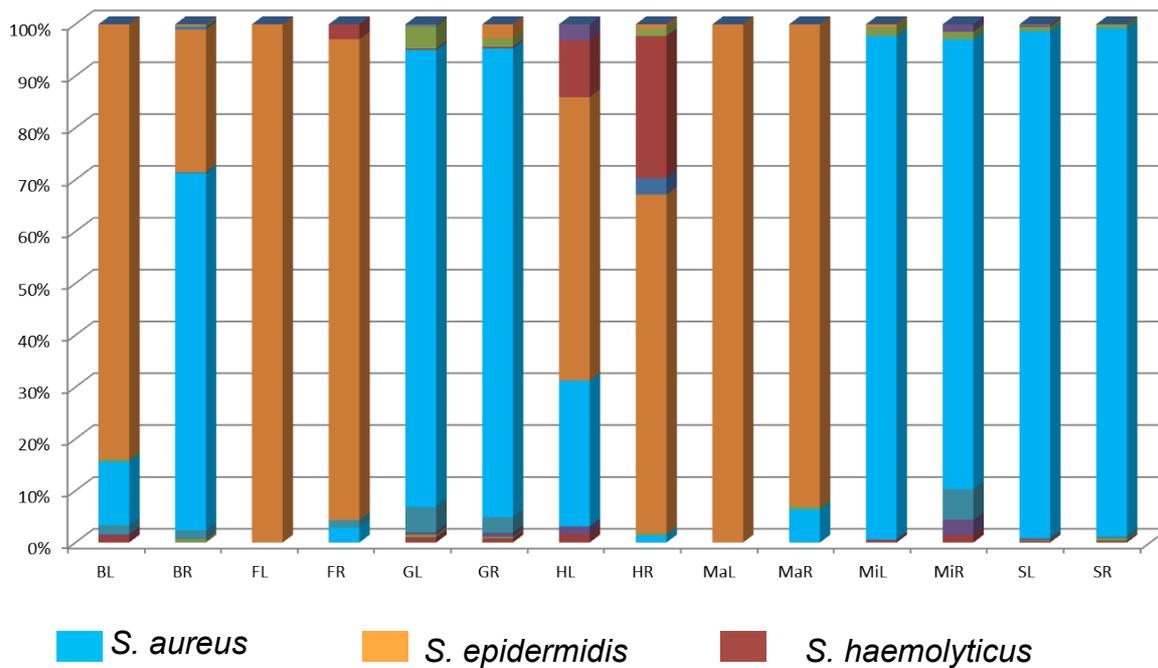
**Abbildung 8: Principal Component-Analyse (PCoA) zur Korrelation zwischen linker und rechter Nasenseite.** Das gleiche Symbol entspricht dem gleichen Individuum

Die Amplikon-basierte Diversitätserfassung zeigte, dass mindestens 6 % der mikrobiellen Gemeinschaften bei stabilen *St. aureus*-Trägern aus *Firmicutes*, zu denen auch *St. aureus* gehört, bestehen. Meistens lag der Anteil deutlich höher (bis zu ca. 95%). Im Gegensatz dazu wurden nur wenige Transkripte in der funktionellen Analyse den *Firmicutes* zugeordnet. Dieses zeigt erneut, dass dieses Phylum und dementsprechend auch *Staphylococcus aureus*-Stämme zwar in der mikrobiellen Gemeinschaft der Nase prominent bei stabilen Trägern vertreten sind, aber nur wenig Aktivität zeigen. Eine Aufschlüsselung der 16S rRNA-Gensequenzen auf Gattungsebene (Abbildung 9) bestätigt, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften in linker und rechter Nasenseite meistens sehr ähneln.



**Abbildung 9: Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen auf Gattungsebene.** Dargestellt sind beispielhaft mikrobielle Gemeinschaften von acht Probanden, jeweils die linke und rechte Seite (gekennzeichnet mit „L“ und „R“)

Auf Gattungsebene konnte man vorwiegend die Dominanz der Gattungen *Corynebacterium*, *Staphylococcus* und *Propionibacterium* erkennen. In den untersuchten mikrobiellen Gemeinschaften waren auch zum Beispiel *Acidovorax*-, *Aquabacterium*- oder *Acinetobacter*-Vertreter vorhanden. Zu der Gattung *Acinetobacter* gehören zahlreiche potentiell multiresistente Krankheitserreger. Zuletzt trat dieser in den Medien im Januar 2015 in Erscheinung, als der Keim für mehrere Infektionen am Universitätsklinikum Kiel verantwortlich war. Wenn man die Gattung *Staphylococcus* weiter aufschlüsselte, fiel direkt die Dominanz von *St. aureus* und *St. epidermidis* auf (Abbildung 10). In vielen Proben zeigte sich, dass eine „Entweder-Oder“- Situation vorlag, d.h. dass entweder *St. epidermidis* oder *St. aureus* die Probe dominierte. Studien haben gezeigt, dass *St. epidermidis* in der Lage ist, die Biofilmbildung und damit die Kolonisierung von *St. aureus* zu inhibieren. In den Proben zweier Individuen lagen jedoch auch beide Arten nebeneinander vor.



**Abbildung 10: Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Sequenzen auf Artebene in der Gattung *Staphylococcus*.** Dargestellt sind beispielhaft mikrobielle Gemeinschaften von acht Individuen, jeweils die linke und rechte Seite (gekennzeichnet mit „L“ und „R“)

## 2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die im Projekt getätigten Ausgaben betrafen hauptsächlich Personalkosten für die Mitarbeiter, welche die aufwendigen experimentellen Arbeiten im Labor und die bioinformatische Auswertung der Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzdaten sowie die Etablierung neuer Analyse-Technologien im Bereich der Isolierung und Analyse von mRNA aus Habitaten mit geringer mikrobieller Biomasse durchführten. Die Sachausgaben betrafen vorwiegend Verbrauchsmaterialien, die z.B. für die Isolierung von Nukleinsäuren, die Erstellung von cDNA und 16S rRNA-Amplikons sowie die Sequenzierungsreaktionen benötigt wurden. Mittel für Investitionen standen im Rahmen der Förderperiode nicht zur Verfügung.

## 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die im Projekt geleistete Arbeit diente dem Erreichen der im Projektantrag aufgeführten Ziele. Da die Ziele im Wesentlichen erreicht und Metagenom- und Transkriptomanalyseverfahren in Bezug auf mikrobielle Gemeinschaften in der menschlichen Nase etabliert und entwickelt wurden, waren die durchgeführten Arbeiten sowohl notwendig, als auch dem Umfang nach angemessen.

#### 4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Verwertung der Ergebnisse erfolgt im Verbund mit den anderen Kooperationspartnern. Die Überprüfung der wirtschaftlichen Verwertbarkeit der Ergebnisse in Bezug auf neue Interventions- und Therapieansätze und wird im Verbund durch Beteiligung der Hyglos GmbH gewährleistet. Ferner bedeuten die durchgeführten Arbeiten zur Weiterentwicklung der Isolierung und Reinigung von mRNA aus "schwierigen Habitaten" mit geringer mikrobieller Biomasse, sowie die Anpassung der Sequenzierungstechnologien an die Verwendung sehr kleiner mRNA(cDNA)-Mengen als Ausgangsmaterial wichtige Fortschritte in diesem Fachgebiet und tragen wesentlich zur Stärkung des Technologiestandortes Göttingen bei. Im Berichtszeitraum sind bereits einige Veröffentlichungen der Forschungsergebnisse in verschiedenen Fachzeitschriften erschienen (siehe 6.), weitere sind geplant.

#### 5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

In Bezug auf Infektionen mit *St. aureus* und anderen Infektionserregern liegt derzeit der Schwerpunkt der Forschungsaktivitäten weltweit auf der Charakterisierung von multiresistenten klinischen Stämmen und der Entwicklung von neuen Antibiotika bzw. der Modifikation von bekannten Antibiotika. Daher werden weltweit entsprechend groß angelegte Wirkstoffscreenings durchgeführt. Ferner sind viele Veröffentlichungen zum Einfluss von Struktur und Dynamik des Mikrobioms in verschiedenen Körperbereichen auf die Gesundheit erschienen.

Das Gebiet der funktionellen mikrobiellen Genomforschung hat in den letzten Jahren eine rasante Entwicklung auch im Hinblick auf die Untersuchung von mikrobiellen Infektionskrankheiten und die Analyse des humanen Mikrobioms genommen. Die Zahl der sequenzierten mikrobiellen Genome, Transkriptome und Metagenome sowie die Durchführung funktioneller (Meta)Genomanalysen und (Meta)transkriptomanalysen von pathogenen Mikroorganismen und mikrobiellen Gemeinschaften, die im Zuge von Infektionskrankheiten auftreten, wächst schnell. Mit unseren Arbeiten waren wir also einem starken Konkurrenzdruck ausgesetzt. Die Stärken der Göttinger Technologieplattform liegen in der großen Expertise auf den Gebieten der komparativen funktionellen (Meta)Genom- und (Meta)Transkriptomanalysen. Die im Rahmen des Projekts durchgeführten Weiterentwicklungen der Sequenzierungstechnologien und bioinformatischen Auswerteverfahren für Metatranskriptom- und Metagenomanalysen mikrobieller Gemeinschaften und die systematische Anwendung der von der Göttinger Technologieplattform entwickelten und etablierten OMICS-Technologien im Rahmen

der Bearbeitung von Fragestellungen der mikrobiellen Infektionsgenomik erlauben es, national und international wettbewerbsfähig zu bleiben.

## 6. Erfolgte Veröffentlichungen des Ergebnisses

Nacke H, Daniel R (2014) Approaches in metagenome research - progress and challenges. In: Encyclopedia of Metagenomics (Ed: Nelson, K.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, SpringerReference\_363415.

Fraunholz M, Bernhardt J, Schuldes J, Daniel R, Hecker M, Sinhad B (2013) Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* 6850, a highly cytotoxic and clinically virulent Methicillin-sensitive strain with distant relatedness to prototype strains. Genome Announcements 1:e00775-13.

Klingenberg H, Martinjak R, Glöckner FO, Daniel R, Lingner T, Meinicke P (2013) Dinucleotide distance histograms for fast detection of rRNA in metatranscriptomic sequences. OASlcs 34:80-89.

Becker K, Mutter W, Daniel R, Rudack C, Peschel A, Pieper DH (2011) Bakterielle Untermieter in der menschlichen Nase. GENOMXPRESS 1.11: 8-10.

Hoff KH, Tech M, Lingner T, Daniel R, Morgenstern B, Meinicke P (2011) Gene prediction in metagenomic fragments with Orphelia: a large scale machine learning approach, in Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches (de Bruijn FJ, Ed.), pp. 359-368, John Wiley & Sons, Inc.

Simon C, Daniel R (2011) Metagenome analyses: past and future trends. Applied and Environmental Microbiology 77: 1153–1161.

Neben den aufgeführten Publikationen sind weitere mit Beteiligung der Technologieplattform erschienen. Die gesamte Liste kann unter <http://appmibio.uni-goettingen.de> abgerufen werden