

Abteilung Pathophysiologie bakterieller Biofilme

■ Leiter: Prof. Dr. Susanne Häußler

Tel.: 0511-220027212 und 0531-61813150 • E-Mail: haeussler.susanne • www.twincore.de/arbeitsgruppen/pathophysiologie-bakterieller-biofilme/

Forschungsprofil

Im Mittelpunkt unseres wissenschaftlichen Interesses stehen die molekularen Mechanismen, die der Etablierung von chronisch persistierenden *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen zugrunde liegen. *P. aeruginosa* ist ein opportunistischer Erreger, der schwere akute und chronische Infektionen hervorrufen kann. Eine chronische *P. aeruginosa* Infektion von erheblicher klinischer Bedeutung ist die Infektion der Lunge von Mukoviszidose Patienten. *P. aeruginosa* überlebt dort in sogenannten Biofilmen und widersteht, eingekapselt in eine selbst-produzierte extrazelluläre Matrix, dem Immunsystem und auch intensiver antibiotischer Therapie.

Wir fokussieren unsere Arbeiten auf die Untersuchung von bakteriellen Faktoren, die strukturellen und regulatorischen Einfluss auf die Biofilmbildung nehmen und widmen uns der Bedeutung von inter- und intra-bakterieller Signaltransduktion bei der Pathogenese chronischer Infektionen. Ein weiterer Schwerpunkt liegt in der Identifizierung von adaptiven Mutationen. Diese entstehen im Rahmen der Anpassung an den Wirt und führen zur Generierung von genetischer Diversität und Selektion von Antibiotika-resistenten Bakterien und von besonders gut adaptierten *P. aeruginosa* Phänotypen. Erkenntnisse aus unseren Studien sollen als Grundlage für die Entwicklung von alternativen Therapie-Strategien dienen, die auch gegenüber antibiotikaresistenten und chronischen Biofilm-Infektionen wirksam sind.

Forschungsprojekte

Quantitative und qualitative Genexpression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen

Die Untersuchung der bakteriellen Genexpression in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltbedingungen ermöglicht neue Einblicke in Mechanismen der bakteriellen Wahrnehmung und Anpassung an verschiedene Habitats. In diesem Zusammenhang ist die Frage nach der Biofilm-spezifischen Genregulation von besonderer Bedeutung, da das Wachstum innerhalb von Biofilmen eine Hauptursache für das Entstehen von chronisch persistierenden Infektionen ist. Chronische Infektionen sind schwer zu therapieren, da die Erreger nicht nur gegenüber der Immunantwort des Menschen, sondern auch gegenüber antimikrobiellen Therapien weitestgehend resistent sind. Ein Beispiel einer besonders schweren chronischen bakteriellen Infektion ist die Infektion der Lunge von Mukoviszidose-Patienten mit dem opportunistischen Erreger *Pseudomonas aeruginosa*.

Für die Entwicklung von neuen alternativen Therapiestrategien, die auch gegenüber chronischen Infektionen wirksam sind, ist detailliertes Wissen über bakterielle Anpassungsstrategien an das Biofilmwachstum essentiell. Mit dem Ziel, diese Anpassungsmechanismen zu verstehen und Zielstrukturen für Anti-Biofilm Aktivitäten zu identifizieren, haben wir in diesem Projekt *P. aeruginosa* Biofilme unter standardisierten Bedingungen kultiviert und das globale Transkriptionsprofil mittels RNA Sequenzierung untersucht.

Gesamt RNA wurde zu diesem Zweck aus zwei biologischen Replikaten von planktonischen Kulturen aus der späten exponentiellen und der stationären Wachstumsphase und von 24 und 48 Stunden alten Biofilm Kulturen isoliert. Nach der Entfernung der ribosomalen RNA wurden Strang-spezifische cDNA Bibliotheken generiert und in einem Illumina GenomeAnalyzer sequenziert. Die Roh-Daten bestanden aus 84.1 Millionen kurzen Sequenzen mit einer Länge von 36 Nukleotiden. Zur Visualisierung der genom-weiten Abdeckung wurden verschiedene Methoden zur Strang-spezifischen

Zuordnung der kurzen RNA Sequenzen zum PA14 Referenzgenom verwendet. Abbildung1 zeigt ein sogenanntes pile-up Profile, welches die Anzahl der kurzen Sequenzen, die der jeweiligen PA14 Genom-Sequenz zuzuordnen sind, zählt, während das sinister Profil nur die linken Enden der kurzen Sequenzläufe zählt.

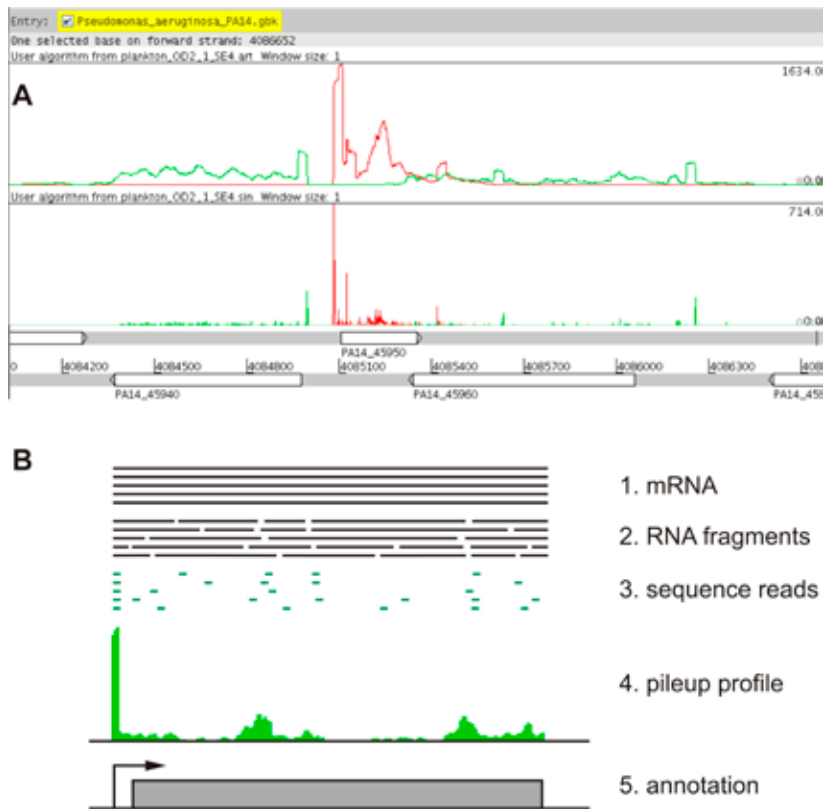


Abb. 1: Abdeckung des Referenzgenoms durch kurze sequence reads. A) Die Profile zeigen die Genomabdeckung auf dem Plus (rot) und dem Minus (grün) Strang des *P. aeruginosa* PA14 Genoms (visualisiert durch den Artemis genome browser). Das obere Profil repräsentiert ein sogenanntes pile-up Profil, welches die überlappenden sequence reads an der jeweiligen Position im Genom zählt. Im unteren sinister Profil werden nur die linken (5'-) Positionen gezählt. Die Genomannotation ist ebenfalls dargestellt, die Nummern zeigen die Position auf dem Genom an, und die weißen Boxen die Gene auf dem Plus Strang (obere Zeile Pfeil nach rechts) und dem Minus Strang (untere Zeile, Pfeil nach links). Die hier dargestellten Gene sind *lasI* (PA14_45940), *rsal* (PA14_45950) und *lasR* (PA14_45960). B) Model für die Anreicherung der Transkriptenden: mRNA wird isoliert (1.), fragmentiert (2.) und die linken Enden der Fragmente werden auf einem Illumina GenomeAnalyzer sequenziert (3.). Da die Fragmente jeder einzelnen mRNA identische 5'-Enden produziert und alle anderen Fragmente zufällig verteilt sind, ergibt sich eine Anreicherung von Sequence reads am mRNA 5'-Ende (4.), welches dazu genutzt werden kann, Transkriptionsstartstellen vorherzusagen (5.).

Die vergleichende Analyse der RNA Sequenzdaten aus der späten exponentiellen und stationären planktonischen Wachstumsphase und der Biofilmkulturen stimmte im wesentlichen mit Transkriptomdaten aus verschiedenen anderen Studien überein, allerdings konnten wir zusätzlich Aussagen über die differentielle Regulation von sogenannten small regulatory RNAs (sRNA) treffen.

Neben der zusätzlichen Information über die Expression von sRNA ist ein weiterer wichtiger Vorteil der RNA Sequenzierung gegenüber der Verwendung von Arrays die Möglichkeit neben quantitativen auch qualitative Daten

zum bakteriellen Transkriptom zu erhalten. Die qualitative Analyse der RNA Seq Daten zeigte eine Anreicherung am 5'-Ende der Transkripte und ermöglichte uns eine genom-weite akkurate Vorhersage der Transkriptionsstartstellen. Als ein Beispiel konnten wir zeigen, dass das Biosynthese-Operon, welches für die Produktion der Quorum Sensing Moleküle aus der Familie der 4-Quinolone verantwortlich ist, drei alternative Transkriptionsstartstellen aufweist, was eine neue Komplexität der Genregulation in *P. aeruginosa* aufzeigt [Abbildung 2].

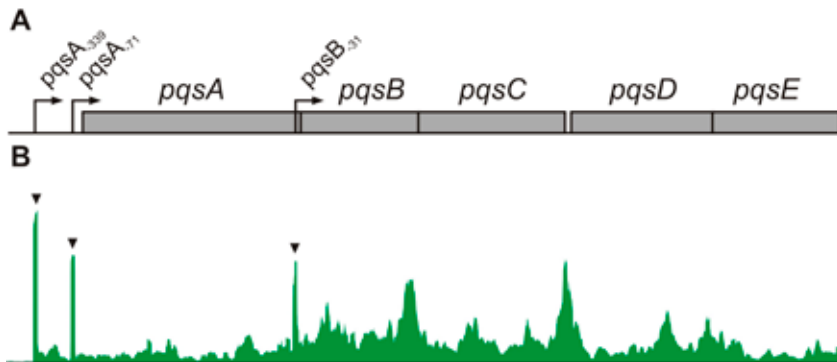


Abb. 2: Alternative Transkriptionsstartstellen (TSS) des PQS Biosynthese-Operons. Oben: Modell des PQS Biosynthese-Operons (pqsABCDE) mit drei alternativen TSS (Pfeile). Zahlen stehen für die Position des TSS relativ zum Start Codon. Unten: Sequenz-Abdeckung des PQS Operons. Alle Sequenzen wurden gepoolt und aufsummiert, um die jeweilige Abdeckung zu berechnen. Die TSS sind angereichert und stellen sich als scharfe Peaks dar (schwarze Dreiecke).

■ Projektleitung: Häußler, Susanne, (Prof. Dr. med.); Förderung: EU, HGF, Mukoviszidose e.V.

Weitere Forschungsprojekte

Identifizierung von genetischen Antibiotika-Resistenz Determinanten in *Pseudomonas aeruginosa*.

■ Projektleitung: Häußler, Susanne, (Prof. Dr. med.); Förderung: HFG, EU, DFG

Bedeutung der 4-quinolone für die Pathogenese von chronischen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen.

■ Projektleitung: Häußler, Susanne, (Prof. Dr. med.); Förderung: HFG, BMBF

Globale Phänotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

■ Projektleitung: Häußler, Susanne, (Prof. Dr. med.); Förderung: HFG, BMBF

C-di-GMP Signalling in *Pseudomonas aeruginosa*.

■ Projektleitung: Häußler, Susanne, (Prof. Dr. med.); Förderung: Teilprojekt im SFB900

Morphologische Varianz in *Pseudomonas aeruginosa*.

■ Projektleitung: Häußler, Susanne, (Prof. Dr. med.); Förderung: Teilprojekt im IRTG 1372, DFG

Entwicklung von Inhibitoren zur Prävention und Behandlung von Biofilmmenschenpathogenen Bakterien.

■ Projektleitung: Häußler, Susanne, (Prof. Dr. med.); Kooperationspartner: HZI, Sanofi, ITEM, LUH; Förderung: BMBF

Originalpublikationen

Schmidt J, Müsken M, Becker T, Magnowska Z, Bertinetti D, Möller S, Zimmermann B, Herberg FW, Jänsch L, Häussler S. The *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis methyltransferase CheR1 impacts on bacterial surface sampling. *PLoS One* 2011;6(3):e18184

Wei Q, Tarighi S, Dötsch A, Häussler S, Müsken M, Wright VJ, Camara M, Williams P, Haenen S, Boerjan B, Bogaerts A, Vierstraete E, Verleyen P, Schoofs L, Willaert R, De Grootte VN, Michiels J, Vercammen K, Crabbe A, Cornelis P. Phenotypic and Genome-Wide Analysis of an Antibiotic-Resistant Small Colony Variant (SCV) of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 2011;6(12):e29276

Zaoui C, Overhage J, Löns D, Zimmermann A, Müsken M, Bielecki P, Pustelny C, Becker T, Nimtz M, Häussler S. An orphan sensor kinase controls quinolone signal production via MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2012;83(3):536-547

Buchbeitrag, Monografie

Pommerenke C, Friedrich B, Johl T, Jänsch L, Häussler S, Klawonn F. A modified apriori algorithm for analysing high-dimensional gene data. In: Yin H, Wang W, Rayward-Smith VJ [Hrsg.]: Intelligent data engineering and automated learning - IDEAL 2011: 12th international conference, Norwich, UK, September 7-9, 2011 ; proceedings. Heidelberg u.a.: Springer, 2011. (Lecture notes in computer science). S. 236-243

Promotionen

Magnowska, Zofia (PhD): Membranes provide new insight into the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis, MHH-Signatur: D 78716

Master

Reichert, Olga (M.Sc. Biochemie): Quantifizierung bakterieller DNA-Basenmodifikationen mittels HPLC-gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie.

Abstracts

2011 wurden 4 Abstracts publiziert.

Stipendien

Dötsch, Andreas, (Dr. rer. nat.): Reisestipendium für die FEMS in Genf.

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Häußler, Susanne, (Prof. Dr. med.): Gutachter Tätigkeiten für internationale Fachzeitschriften; Vorstand im ZIB - Zentrum für Infektionsbiologie; Vorstand in der Gradschool des HZI.