



# Metagenomik und Wirt-Pathogen Interaktion bei diabetischen Fußinfektionen

## Verbundkoordinatorin:

- PD Dr. Eva Medina, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig

## Projektpartner:

- Dr. Bettina Löffler, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Münster
- Prof. Dr. Eugen Domann, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Prof. Dr. Rolf Daniel, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen



Medizinische Infektionsgenomik

Gefördert vom:



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung



Die Prävalenz von *Diabetes mellitus* hat in den letzten Jahren stark zugenommen und damit auch die assoziierten Komorbiditäten. Schlecht heilende diabetische Fußinfektionen (DFI) sind häufig der Ausgangsherd für tiefe Weichteilinfektionen und stellen eine schwere Komplikation dar. In diesem Projekt sollten die Erreger, ihre Pathogenitätsfaktoren, -gruppen, die polymikrobielle Ätiologie (Mikrobiom) und die involvierten Gene/Gengruppen (Metagenomik) und die Wirt-Pathogen-Interaktionen untersucht werden. Die schlimmste Komplikation bei DFI ist Osteomyelitis, die häufig chronisch verläuft, sehr schwierig zu therapieren ist und eine völlige Knochendestruktion zur Folge haben kann. *Staphylococcus aureus* ist der häufigste Auslöser von Osteomyelitiden bei DFI. Unser Ziel war es, die komplexe Pathogenese und die zugrundeliegenden mikrobiellen Mechanismen, die zur Manifestation der *S. aureus*-Infektion im Knochen beitragen, besser zu verstehen.

### Teilprojekt (Justus-Liebig Universität Gießen)

Bei den Analysen der Patientenproben zeigte sich eine sehr hohe Diversität der identifizierten Bakterien. Allerdings kristallisierten sich vier Bakterienarten heraus, die mehr als 50% der identifizierten Bakterien ausmachten: Koagulase-negative Staphylokokken (CNS), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*. Das sind vor allem Vertreter der Haut, des Gastrointestinaltraktes und der Umwelt. Offensichtlich verfügen diese Spezies über bestimmte molekulare Mechanismen, um in diesem Ausmaß gehäuft aufzutreten. Aufgrund der Isolierung zahlreicher verschiedener Bakterien aus diabetischen Fußläsionen stellte sich die Frage, ob es sich bei den Isolaten um Pathogene oder um Kommensale handelt. Als Alternative zum Tiermodell hat sich das *Galleria mellonella* Insekteninfektionsmodell etabliert, das ein hohes Durchsatzscreening erlaubt. Ein Schwerpunkt unserer Arbeit wurde daher auf die Untersuchung der Pathogenitätsstufen der Isolate gelegt

und hierfür das *Galleria mellonella* Wachsmotten-Infektionsmodell eingesetzt. Dadurch ist es uns gelungen, drei Pathogenitätsstufen bei *S. aureus*-Isolaten zu identifizieren: *S. aureus*-Isolate mit hoher Pathogenitätsstufe; Isolate mit intermediärer und Isolate mit niedriger/keiner Pathogenitätsstufe. Das *G. mellonella*-Infektionsmodell hat sich somit als besonders geeignet erwiesen, um die Pathogenitätsstufen von Bakterienisolaten zu bewerten.

Unter der Anwendung von *Next-Generation Sequencing* (NGS)-Technologien wurden zahlreiche Proben und Isolate sequenziert. Insbesondere die verschiedenen Pathogenitätsstufen der *S. aureus*-Isolate waren nicht nur durch die An- oder Abwesenheit von Pathogenitätsfaktoren charakterisiert. Bei umfangreichen Transkriptomanalysen hat sich gezeigt, dass es erhebliche Unterschiede in der Expression von Pathogenitätsfaktoren *in-vitro* und *in-vivo* gibt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Schwere eines diabetischen Fußsyndroms von der Zusammensetzung der Mikrobiota, von der Anwesenheit von Pathogeni-



*Staphylococcus aureus* auf Blutagarplatte.



Injektionsapparat zur Infektion von Wachsmottenlarven mit Bakterien.



Infizierte Wachsmottenlarven. Die abgestorbenen Larven erscheinen schwarz.

tätsfaktoren und deren Expression abhängt. Die Untersuchungen haben dazu geführt, die mikrobielle Diagnostik zu verbessern und ggf. auch therapeutische Alternativen bei multiresistenten Erregern wie MRSA und ESBL anzuwenden. Die Erkenntnis der Herkunft der Erreger hat dazu geführt, die Patienten hinsichtlich hygienischer und prophylaktischer Maßnahmen zu instruieren.

## Teilprojekt (Universitätsklinikum Münster)

### Sammlung und Testung von klinischen Isolat-ten von Osteomyelitispatienten:

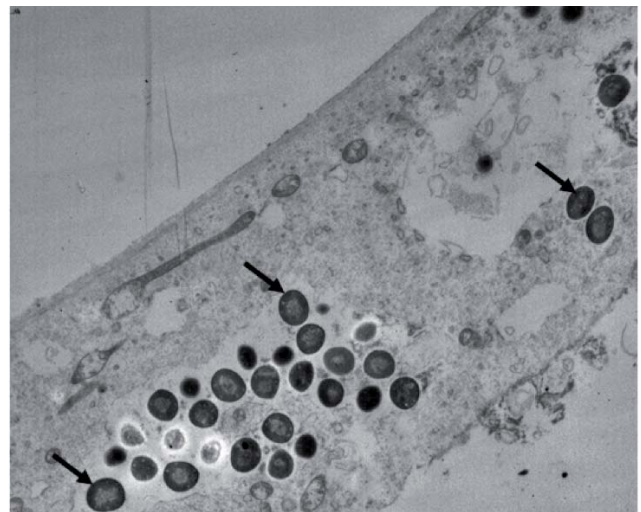
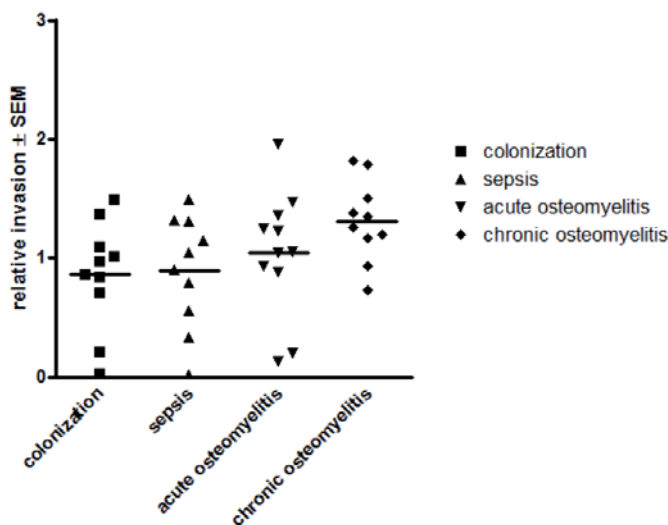
Durch ausführliche Charakterisierung und funktioneller *in-vitro* Testung von *S. aureus*-Stämmen von akuter und chronischer Osteomyelitis konnten wir erarbeiten, dass sich Stämme von chronischer Osteomyelitis besonders durch eine hohe Wirtszellinvasion und intrazelluläre Anpassung und Biofilmbildung auszeichnen. Dennoch fanden wir, dass sie ein hohes Maß an Inflammation in den Wirtszellen erzeugten.

### Etablierung eines hämatogenen Osteomyelitismodells in der Maus zur Untersuchung von chronischen Infektionen:

Mit dem *S. aureus*-Stamm 6850 konnten wir in Kooperation mit Eva Medina ein Mausinfektionsmodell entwickeln, bei dem sich eine chronische Osteomyelitis über einen Zeitraum von 2 Monaten entwickelt. Dieses Modell bildet die Basis für viele Folgeuntersuchungen (z.B. Transkriptionsanalysen von Eva Medina, Bildgebungsentwicklung am MRT).

### Entwicklung von Markierungsmethoden für Bakterien, um sie mittels MRT beim Infektionsgeschehen *in-vivo* beobachten zu können:

Mit Eisenpartikeln haben wir die infizierenden Bakterien markiert, um sie anschließend im *in-vivo* Mausmodell mittels MRT darstellen zu können. In einem Hautinfektions-



**Invasion von klinischen *S. aureus*-Stämmen in humane Osteoblasten.** (Kalinka et al. Int J Med Microbiol. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.07.013.)

**Abbildung links:** Die Fähigkeit von verschiedenen *S. aureus*-Isolaten in humane Osteoblasten zu invadieren wurde mittels eines FACS-Assays bestimmt. Dabei wurde die Invasivität des Stammes Cowan I als Referenz herangezogen und als 1 angegeben. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten im Doppelansatz. Es wird gezeigt, dass Isolate von chronischer Osteomyelitis eine signifikant höhere Invasivität zeigen als Isolate der anderen Gruppen. \*  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney U test).

**Abbildung rechts:** Zudem wurde die bakterielle Lokalisation des *S. aureus*-Stammes 6850 in humanen Osteoblasten mittels Elektronenmikroskopie gezeigt. *S. aureus* wurde internalisiert und morphologisch intakte Bakterien konnten intrazellulär detektiert werden (Pfeile).

modell, sowie in einem Fußinfektionsmodell konnten wir somit die Ausbreitung der Bakterien *in-vivo* darstellen.

### Analyse von Regulations- und Virulenzfaktoren, die zur Ausbildung von chronischen Infektionen beitragen:

In einer wichtigen Publikation konnten wir bereits 2011 zeigen, dass Bakterien bei chronischen Infektionen ein sehr hohes und dynamisches Anpassungsvermögen innerhalb von Wirtszellen und im Wirtsgewebe aufweisen (Tuchscher L et al. EMBO Molecular Medicine 2011). Dabei verändern die Bakterien ihren Phänotyp zu sog. small colony variants (SCVs). In einer weiterführenden Arbeit konnten wir durch Herstellung und Testung von bakteriellen Mutanten die Wichtigkeit des Regulationsfaktors SigB für die Entstehung von chronischen Infektionen nachweisen.

## Teilprojekt (HZI-Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung):

Unser finales Ziel ist dabei die bakteriellen Transkriptionsereignisse zu identifizieren, die die Wirtsgenexpression determinieren und umgekehrt (Interaktome). Insgesamt wird dieses Projekt wichtige Informationen liefern, um neue Strategien zur Behandlung von Knocheninfektionen durch Staphylokokken zu entwickeln.

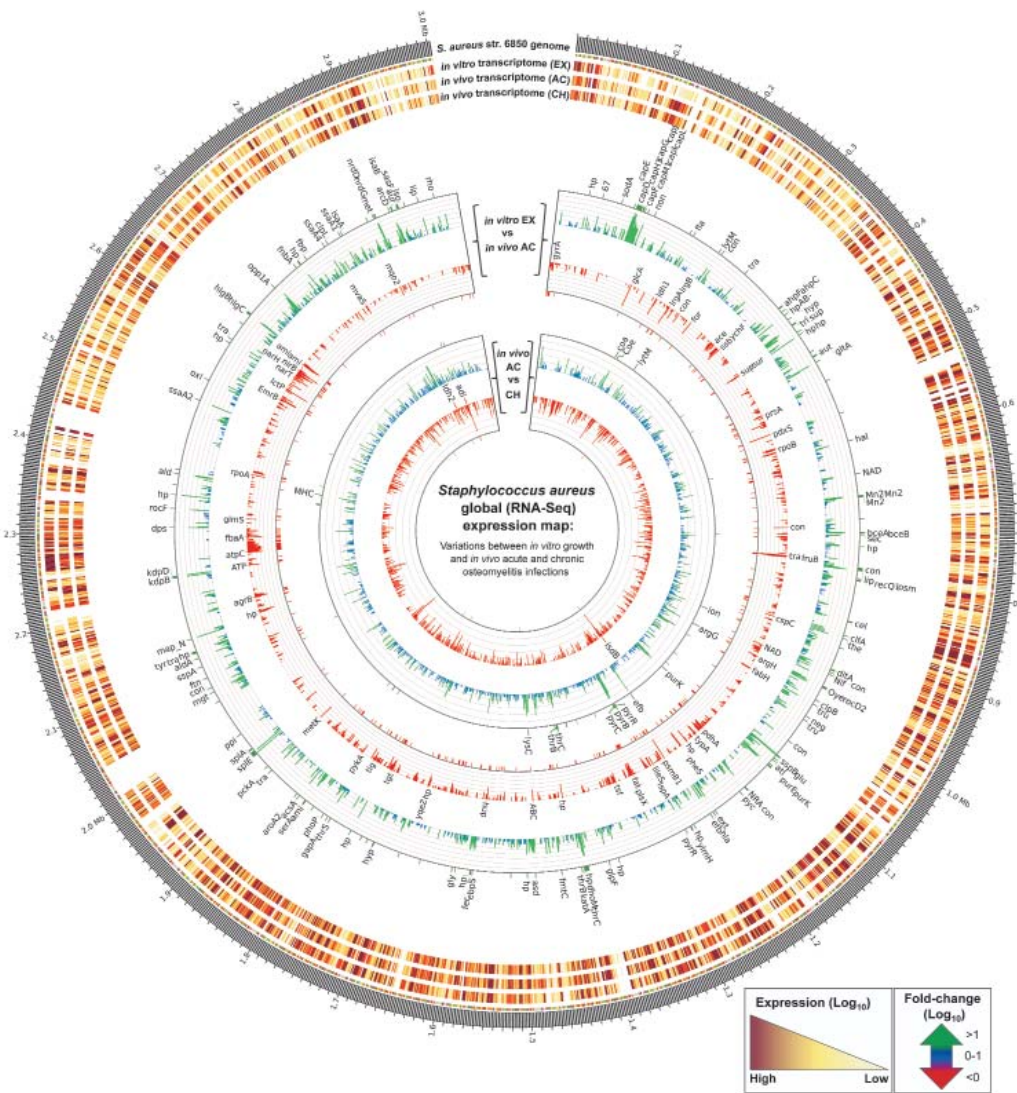
### Etablierung eines experimentellen *S. aureus* Osteomyelitismodells in der Maus:

Wir haben ein neues und einzigartiges Mausmodell *S. aureus* induzierter Osteomyelitis etabliert, das das volle Spektrum des humanen Krankheitsbildes inklusive der chronischen Phase abdeckt. Dieses Modell bietet eine hervorragende Grundlage für weiterführende mikrobiologische und immunologische Studien im Hinblick auf akute und chronische Osteomyelitis. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, mit Hilfe dieses Modells neue Diagnostik- und Therapieverfahren zu testen und zu entwickeln.

**Charakterisierung der transkriptionellen Adaptierungen von *S. aureus* an die Knochenumgebung während einer akuten und einer chronischen Osteomyelitis mit Hilfe eines *in vivo* Infektionsmodells:**

Wir nutzten das oben beschriebene Mausmodell um das Transkriptionsprofil von *S. aureus* während der akuten (7 Tage infiziert) und chronischen (28 Tage infiziert) Osteomyelitis zu bestimmen. Die gesamte bakterielle RNA wurde aus den Knochen infizierter Mäuse isoliert und die Transkriptionsprofile wurden mittels der Illumina-(HiSeq)-Sequenzierungs-Technologie generiert.

Obwohl jede der Proben zwischen 52-104 Millionen Reads produzierte, unterschied sich die Zahl der endgültigen bakteriellen mRNA Reads beträchtlich zwischen den verschiedenen analysierten Bedingungen. Die initiale Datenmatrix beinhaltet Daten von 2503 Genen. Die Analyse der differentiellen Genexpression zwischen zwei Konditionen (akute Infektion versus *in vitro* Wachstum) mittels verschiedener Algorithmen (DESeq, EdgeR and SAMseq) zeigt, dass 444 Gene zwischen diesen Konditionen unterschiedlich exprimiert werden, wobei 180 Gene während der akuten Infektion signifikant höher exprimiert werden und 264 Gene während des *in vitro* Wachstums. Im Gegensatz hierzu waren nur 51



Visualisierung der Expression von *S. aureus* während *in vitro* Wachstum (EX), AC- (akute) und CH- (chronische) Phasen der Infektion.

Gene unterschiedlich exprimiert zwischen chronischer und akuter *in vivo* Phase, 42 Gene werden hier während der akuten Kondition höher exprimiert und nur 9 Gene während der chronischen Kondition. Diese Gene codieren Proteine, die in der Glukoneogenese, dem Aminosäuremetabolismus, der Proteolyse von Wirtsgewebe, dem Akquirieren von Eisen, der Vermeidung der Wirtsimmunabwehr sowie der Stressantwort involviert sind. Auf regulatorischer Ebene wurden von *S. aureus in vivo* SaeR/S, sowie die T-box riboswitches (ssa0357.2; ssa01688.1), welche in der Regulation des Aminosäurestoffwechsels beteiligt sind in stärkerem Maße exprimiert. Nur neun Gene wurden von *S. aureus* signifikant in der chronischen Phase höher exprimiert als in der akuten Phase der Osteomyelitis. Diese Gene beinhalten jene des Arginin-Deiminase-Systems (*arcC*, *adi*), der Akquirierung von Eisen (*isdB*) sowie der stringenten Kontrolle (*relA/spoT*). Die Analyse einiger ausgewählter dieser *in vivo* exprimierten Gene in klinischen Einzelproben mittels qRT-PCR ergaben die gleichen Resultate, die auch im murinen Model ermittelt wurden.

## Verwertungsplan

Die Ergebnisse dieses Projektes sollen ermöglichen, neue diagnostische Verfahren zu entwickeln, um DFI frühzeitig und effizient zu behandeln. Dies hätte eine enorme Auswirkung auf die sozialen, medizinischen und ökonomischen Aspekte von *Diabetes mellitus*.

### Publikationen aus dem Verbundprojekt:

- Alt V, Kirchhof K, Seim F, Hrubesch I, Lips KS, Mannel H, Domann E, Schnettler R. Rifampicin-fosfomycin coating for cementless endoprostheses: Antimicrobial effects against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Acta Biomater.* 2014; pii: S1742-7061(14)00260-8.
- Fritzenwanker M, Kuenne C, Billion A, Hain T, Zimmermann K, Goesmann A, Chakraborty T, Domann E. Complete Genome Sequence of the Probiotic *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 Clone DSM 16431. *Genome Announc.* 2013;1(1). pii: e00165-12.
- Imirzalioglu C, Sethi S, Schneider C, Hain T, Chakraborty T, Mayser P, Domann E. Distinct polymicrobial populations in a chronic foot ulcer with implications for diagnostics and anti-infective therapy. *BMC Res Notes.* 2014;7:196.
- Mohamed W, Sommer U, Sethi S, Domann E, Thormann U, Schütz I, Lips KS, Chakraborty T, Schnettler R, Alt V. Intracellular proliferation of *S. aureus* in osteoblasts and effects of rifampicin and gentamicin on *S. aureus* intracellular proliferation and survival. *eCells MAt.* 2014. 28:258-68.
- Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Völker W, Heitmann V, Niemann S, Holzinger D, Roth J, Proctor RA, Becker K, Peters G, Löffler B. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med.* 2011; 3(3):129-41.
- Hoerr V, Tuchscher L, Hüve J, Nippe N, Loser K, Glyvuk N, Tsytsyura Y, Holtkamp M, Sunderkötter C, Karst U, Klingauf J, Peters G, Löffler B, Faber C. Bacteria tracking by *in vivo* magnetic resonance imaging. *BMC Biol.* 2013;11:63.
- Kalinka J, Hachmeister M, Geraci J, Sordelli D, Hansen U, Niemann S, Oetermann S, Peters G, Löffler B, Tuchscher L. *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. *Int J Med Microbiol.* 2014. 304:1038-49.
- Horst SA, Hoerr V, Beineke A, Kreis C, Tuchscher L, Kalinka J, Lehne S, Schleicher I, Köhler G, Fuchs T, Raschke MJ, Rohde M, Peters G,

Faber C, Löffler B, Medina E. A novel mouse model of *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis that closely mimics the human infection: an integrated view of disease pathogenesis. *Am J Pathol.* 2012;181(4):1206-14.

- Szafranska AK, Oxley APA, Chaves-Moreno D, Horst SA, Roßlenbroich S, Peters G, Goldmann O, Rohde M, Sinha B, Pieper DH, Löffler B, Jauregui R, Wos-Oxley ML and Medina E. . High-resolution transcriptomic analysis of the adaptive response of *Staphylococcus aureus* during acute and chronic phases of osteomyelitis. *mBio* 2014. 5:e01775-14.