
Zuwendungsempfänger:

Prof. Dr. Jörg Vogel
Institut für Molekulare Infektionsbiologie

Förderkennzeichen:

0315836

Vorhabensbezeichnung:

„Medizinische Infektionsgenomik: Transcriptomik der nächsten Generation für bakterielle Infektionen“

Laufzeit des Vorhabens: 01.09.2010 – 30.06.2014

Berichtszeitraum: 01.09.2010 – 30.06.2014

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Es sollte eine Methode etabliert werden, welche es ermöglicht die globale Genexpression eines bakteriellen Erregers und seiner eukaryontischen Wirtszelle simultan zu untersuchen. Diese Methode wurde von uns „Duale RNA-Sequenzierung“ genannt.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Mit dem Projekt bauten wir auf langjähriger Expertise auf dem Gebiet der Genregulation und der Identifizierung von ncRNAs in der bakteriellen Infektion auf. Wir hatten Zellkulturmodelle (Epithel-, Phagozyten, primäre Zellen) für diese Erregerklassen in unserem Labor etabliert, und konnten somit alle wichtigen Phasen der Infektion abdecken. Mein Labor hat bei der Entwicklung von RNA-seq-basierten Methoden Pionierarbeit geleistet. Wir waren die erste Gruppe, die RNA-seq für die Charakterisierung von bakteriellen RNA-Protein-Interaktionen eingesetzt hat (Sittka et al. 2008 PLoS Genetics). Weiterhin hatten wir eine neue Methode zur Erfassung des „Primär“-Transkriptoms entwickelt und diese erfolgreich für das Humanpathogen *Helicobacter pylori* angewendet (Sharma et al. 2010 Nature). Unsere Analyse (mittels RNA-seq) von microRNAs in Wirtszellen nach Befall durch *Salmonella* war ebenfalls die erste Studie ihrer Art auf der Wirtseite dar (Schulte et al., 2011 EMBO Journal).

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Mit dem beantragten Personal sollte die Duale RNA-Sequenzierung etabliert werden. Dazu sollten humane Zellkulturmodelle für epitheliale oder monozytische Systeme mit Salmonellen infiziert werden. Infizierte Wirtszellen sollten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion fixiert und die Sub-Population an invadierten Zellen mittels FACS angereichert werden. Aus diesen Proben sollte Gesamt-RNA isoliert, in cDNA-Bibliotheken sequenziert und mittels der Illumina-Technologie sequenziert werden. Die Etablierung bioinformatischer Verfahren zur Prozessierung der zu erhaltenden Rohdaten sollte die

Auftrennung der Sequenzier-Reads gemäß ihrer Ursprungsorganismen gewährleisten. Standard-Analysemethoden dieser Transkriptomdatensätze würden dann quantitative Genexpressionsstudien für sowohl den Wirt als auch das Pathogen ermöglichen.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an dem angeknüpft wurde

Die Infektion humaner bzw. muriner immortalisierter Zelllinien mit *Salmonella Typhimurium* war in unserem Labor bereits gut etabliert (z.B. Schulte et al., 2011). Ein Salmonellen-Stamm, welcher GFP konstitutiv von einem chromosomalen Locus exprimiert existierte bereits in unserem Labor (Papenfort et al., 2009) und seine Nutzung für die Infektion würde die Unterscheidung invadierter von nicht-infizierten Zellen erlauben. Ebenso waren die Methoden zur RNA-Extraktion aus bakteriellen und eukaryontischen Zellen in der Gruppe vorhanden.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Konvertierung der RNA-Proben in cDNA-Bibliotheken sollte von einer privaten Firma (vertis Biotechnologie AG, Freising-Weihenstephan) übernommen werden, mit welcher wir im Vorfeld des Projekts gute Erfahrungen gemacht hatten (z.B. Sharma et al., 2010). Die Sequenzierung selbst sollte im Rahmen einer langjährigen Kollaboration (siehe z.B. abermals Sharma et al., 2010) mittels der Illumina-Technologie auf die HiSeq 2000 Plattformen der Uni Bielefeld oder des Max-Planck-Instituts in Köln durchgeführt werden.

II. Eingehende Darstellung

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

Um die Genexpression eines eukaryontischen Wirts und eines bakteriellen Erregers im Verlauf einer Infektion detailliert verstehen zu können, müssen beide Infektionspartner untersucht und miteinander in Verbindung gesetzt werden. Wir hatten uns vorgenommen, eine neue Methode zu etablieren, die uns die parallele Analyse der beiden Partner auf Genexpressionsebene erlauben würde. Dazu sollte aus infizierten Zellen Gesamt-RNA isoliert werden und dieses „RNA-Gemisch“ direkt, d.h., ohne weitere An- oder Abreicherung eines der beiden Transkriptome, in cDNA umgeschrieben und sequenziert werden. Die Zuordnung der Rohdaten zu dem jeweiligen Organismus würde somit auf rein bioinformatischer Ebene – nämlich durch den Abgleich der Sequenzier-Reads mit den beiden Referenzgenomen – erfolgen. Dies würde die Sensitivität der Analyse gegenüber traditionellen Methoden (z.B. Microarrays) erhöhen, den experimentellen Arbeitsaufwand beschleunigen und es ermöglichen, Genexpressionsunterschiede des einen Organismus‘ im Kontext des jeweils anderen Partners zu erfassen.

Das theoretische Prinzip dieser Methode wurde von uns „Duale RNA-Sequenzierung“ getauft und in einem hochrangigen Fachjournal (Westermann et al., 2012 *Nature Reviews Microbiology*) publiziert. Auch in der Praxis ließ sich die Duale RNA-Sequenzierung

umsetzen. Nachstehend sind die wesentlichen Eckpfeiler des von uns etablierten experimentellen Protokoll aufgelistet:

- Der Infektionsassay wurde für humane HeLa-S3 (als ein epitheliales Modell) und für THP-1 Zellen (ein Monozyten-Modell) optimiert. Insbesondere zeigten Dosis-Findungs-Experimente die ideale bakterielle Dosis für jedes der beiden Systeme auf, um die Infektion über einen Zeitraum von 24 h verfolgen zu können, während Zelltod weitestgehend vermieden wurde. Die Quantifizierung der intrazellulären Bakterienproliferation zeigte außerdem, wie die Erreger nach erfolgter Invasion replizieren und es konnten Angaben gemacht werden, wie viele intrazelluläre Bakterien im Durchschnitt zu unterschiedlichen Zeitpunkten in eine Wirtszelle vorhanden sind.
- Etliche unterschiedliche Fixierungsmethoden, die in der Literatur beschrieben sind, wurden bzgl. ihrer Eignung in dem genannten Kontext evaluiert. Dabei wurden insbesondere Parameter wie die RNA-Qualität fixierter Proben und die Fluoreszenzintensität der intrazellulären Bakterien berücksichtigt. Dabei erwies sich die Fixierung mittels *RNA/later* (Qiagen) als die geeignetste Methode um Wirt- und Pathogentranskriptom zu fixieren, ohne mit der Anreicherung invadierter (GFP-positiver) Zellen und der RNA-Extraktion zu interferieren.
- Die Anreicherung invadierter Zellen mittels FACS wurde etabliert. Es zeigte sich, dass die beiden Sub-populationen invadierter und nicht-infizierter Zellen sehr sauber voneinander getrennt werden können.
- Die *miRvana*-Methode (Ambion) zur Isolierung von Gesamt-RNA erwies sich als in der Lage sowohl humane wie auch bakterielle Transkripte aller RNA-Klassen (d.h. unabhängig ihrer Länge) in hoher Qualität und Ausbeute zu gewinnen.
- Die Mindestmenge an infizierten Zellen (und damit an Gesamt-RNA), die notwendig ist um qualitativ hochwertige cDNA-Bibliotheken herstellen zu können, wurde empirisch bestimmt.

Die resultierenden cDNA-Banken wurden mittels Illumina-Technologie sequenziert. Die Etablierung eines bioinformatischen Prozessierungsverfahrens, welches zu großen Teilen auf der kürzlich von uns beschriebenen *READemption Pipeline* beruht (Förstner et al., 2014), erlaubte es uns bakterielle Sequenzier-Reads von den humanen Reads zu trennen und quantitative Genexpressionsanalysen durchzuführen.

Im Zuge dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass eine zuvor nicht charakterisierte kleine regulatorische RNA eines der intrazellulär am stärksten induzierten Salmonellen-Gene war, und zwar in beiden Infektionsmodellen. Die funktionale Charakterisierung dieser kleinen RNA zeigte ihre Rolle in der Steuerung der Virulenz des Pathogens auf. Beispielsweise wurden direkte Target-Gene identifiziert, darunter auch gut charakterisierte Virulenzgene. Darüber hinaus wurden Konsequenzen der An- bzw. Abwesenheit dieser Salmonellen-RNA für die Genexpression des Wirts aufgedeckt. So werden etwa immunassoziierte Signalwege bzw. biologische Prozesse des Wirts differentiell aktiviert, als Resultat der Expression dieser RNA.

2. Eingehende Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Ausgaben des Projekts sind im Verwendungsnachweis aufgelistet und entsprachen den beantragten Mitteln. Zu den Personalmitteln: von 36 beantragten Postdoc-Monaten waren zwar nur 35 Monate besetzt, dafür aber der Doktorand für 38 statt der beantragten 36 Monate beschäftigt; die TA-Stelle wurde für die kompletten 24 Monate besetzt. Auch bei den Sachmitteln und Aufträgen (für Sequenzierungen) gab es keine Abweichungen von der Planung.

3. Eingehende Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Unsere Arbeit zeigt erstmals die technische Umsetzbarkeit der Dualen RNA-Sequenzierung. Zuvor waren Transkriptomstudien zumeist entweder auf den Wirt oder den bakteriellen Erreger ausgerichtet. Dies war darin begründet, dass die beiden Organismen nach erfolgreicher Infektion physisch voneinander getrennt werden mussten, um RNA von Wirt und Pathogen separat zu isolieren und zu analysieren. Die Duale RNA-Sequenzierung verzichtet auf diese Auftrennung. Stattdessen erfolgt die Unterscheidung von Wirts- und Pathogenexpression rein bioinformatisch, was die experimentelle Durchführung beschleunigt und die Sensitivität erhöht.

4. Eingehende Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Der in diesem Projekt etablierte Ansatz kann höchstwahrscheinlich mit nur geringen Änderungen auf etliche Infektionsmodelle mit Salmonellen oder anderen Erregern, in Zellkultur aber auch Tiermodellen sowie auf klinische Proben infizierter Patienten angewendet zu werden. Wir haben bereits Zusammenarbeiten initiiert, um etwa die Transkriptionsunterschiede replizierender und persistenter Bakterien zu beleuchten. Weiterhin wird versucht unser Protokoll auf in vitro-infizierte Primärzellen aber auch auf infizierte Gewebeproben anzuwenden. Aufgrund der kontinuierlich fallenden Sequenzierkosten bzw. der ansteigenden Sensitivität dieser Technologie könnte die Duale RNA-Sequenzierung künftig eine zentrale Methode in der Infektionsbiologie darstellen.

5. Eingehende Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Etablierung des beschriebenen Ansatzes sind einige Studien publiziert worden, welche die parallele Analyse von Wirt und Pathogen mittels RNA-seq beschreiben (z.B. PLoS One. 2012;7(11):e49423; Front Microbiol. 2012 Mar 12;3:85; PLoS One. 2013 Apr 30;8(4):e62460). Allerdings beschränken sich diese Studien auf rein eukaryontische Modellsysteme; was in den extremen Unterschieden zwischen einem Bakterien- und einem Eukaryonten-Transkriptom begründet ist. So erlaubt beispielsweise die Polyadenylierung eukaryontischer mRNAs, dass sowohl Transkripte aus einem eukaryontischen Parasiten wie

auch seinem eukaryontischen Wirtsorganismus' gemeinsam angereichert werden können. Ebenso ermöglicht die Ähnlichkeit eukaryontischer ribosomaler Transkripte eine gemeinsame Depletion dieser RNAs aus Wirt und Parasit. Nur sehr wenige Publikationen haben deshalb RNA-seq auf Wirte, welche mit bakteriellen Erregern infiziert waren, angewandt um die Genexpression beider Organismen simultan zu erforschen. Dabei handelt es sich um Infektionssysteme, welche auf bakteriellen Erregern von Pflanzen (PLoS Pathog. 2014 Oct 16;10(10):e1004443; PLoS One. 2013;8(1):e54196) oder auf die bakterielle Infektion von Schweine-Enterozyten (Vet Microbiol. 2013 Feb 22;162(1):265-9) und humanen Karzinom-Zellen (PLoS One. 2013 Dec 4;8(12):e80597) beruhen. Insgesamt leiden diese Studien jedoch darunter, dass entweder invadierte Zellen nicht angereichert wurden und somit das bakterielle Transkriptom nur oberflächlich analysiert werden konnte, oder daran dass die allgemeine Sequenzierentiefe relativ niedrig war, was eine detaillierte Analyse der Wirtsantwort verhinderte.

6. Eingehende Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6 (BNBest-BMBF 98)

Publikationen:

- Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J (2012) *Dual RNA-seq of pathogen and host*. Nature Reviews Microbiology 10(9):618-30.
- Chao Y, Papenfort K, Reinhardt R, Sharma CM, Vogel J (2012) *An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs*. EMBO Journal 31(20):4005-19
- Saliba AE, Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J (2014) *Single-cell RNA-seq: advances and future challenges*. Nucleic Acids Research 42(14):8845-60
- Westermann AJ, Förstner KU, Amman F, Chao Y, Schulte LN, Reinhardt R, Stadler PF, Vogel J. *Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in Salmonella-host interplay*. In revision (Nature).

Ausgewählte Tagungen, auf denen die Ergebnisse aus dem Projekt präsentiert wurden:

- FEMS-Leopoldina-Symposium on "Emerging topics in microbial pathogenesis"
12.-14. 4. 2011
Würzburg, Deutschland
Poster Präsentation
- First Mol Micro Meeting
4.-6. 5. 2011
Würzburg, Deutschland
Poster Präsentation
- Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society
14.-18. 6. 2011
Kyoto, Japan
Vortrag und Poster Präsentation

- Statusseminar “Medizinische Infektionsgenomik”
21./22. 9. 2011
Göttingen, Deutschland
Vortrag
- Second Mol Micro Meeting
25.-27. 4. 2012
Würzburg, Deutschland
Poster Präsentation
- Medizinische Infektionsgenomik: RNA-seq workshop
28./29. 6. 2012
Würzburg, Deutschland
Vortrag
- 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)
30. 9.-3. 10. 2012
Hamburg, Deutschland
Poster Präsentation (Posterpreis)
- GBM Study Group RNA-Biochemistry Meeting with Workshop 'RNA trafficking'
4.-7. 10. 2012
Bonn, Deutschland
Poster Präsentation (Posterpreis)
- Cell Symposia: Functional RNAs
2.-4. 12. 2012
Sitges, Spanien
Poster Präsentation
- Second Course on Non-Coding Genome (Institut Curie)
10.-14. 12. 2012
Paris, Frankreich
Poster Präsentation
- Regulating with RNA in Bacteria
4.-8. 6. 2013
Würzburg, Deutschland
Vortrag; erwähnt im Meeting Report (RNA Biol. 2014 May;11(5):403-12)
- Systems Biology of Infection Symposium
23.-27. 6. 2013
Ascona, Schweiz
Vortrag und Poster Präsentation
- ASM Salmonella Meeting
6.-10. 10. 2013
Boston, USA
Vortrag
- EMBO|EMBL Symposium: The Non-Coding Genome
9.-12. 10. 2013
Heidelberg, Deutschland
Vortrag und Poster Präsentation

- Statusseminar "Medizinische Infektionsgenomik"
17./18. 10. 2013
Würzburg, Deutschland
Vortrag
- Fourth Max Planck-Genome-Centre Meeting
3. 12. 2013
Cologne, Deutschland
Vortrag
- EMBO Global Exchange Lecture Course "Biology of bacterial non-coding RNAs"
4.-9. 3. 2014
Buenos Aires, Argentinien
Poster Präsentation
- Second International Congress "Metabolism meets Virulence"
6.-9. 4. 2014
Osnabrück, Deutschland
Vortrag
- Third Mol Micro Meeting
7.-9. 5. 2014
Würzburg, Deutschland
Vortrag
- Third Young Microbiologists Symposium on Microbe Signalling, Organisation and Pathogenesis
2./3. 6. 2014
Dundee, Schottland
Vortrag; erwähnt im Meeting Report (Mol Microbiol. 2012 Nov;86(3):501-12)
- 7. Tagung der Fachgruppe Mikrobielle Pathogenität
16.-18. 6. 2014
Bad Urach, Deutschland
Vortrag
- *Microbiology after the genomics revolution--Genomes 2014*
25.-27. 06. 2014
Institut Pasteur, Paris, Frankreich
Vortrag
- Genomics Day
11.-12. 09. 2014
Helsinki, Finnland
Vortrag
- 4. Gemeinsame Tagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) 2014 und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)
5.-8. 10. 2014
Dresden, Deutschland
Poster Präsentation

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN entfällt	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Schlussbericht zum Projektvorhaben „Medizinische Infektionsgenomik: Transcriptomik der nächsten Generation für bakterielle Infektionen“	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Prof. Dr. Vogel, Jörg	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.06.2014
	6. Veröffentlichungsdatum entfällt
	7. Form der Publikation entfällt
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Julius-Maximilians-Universität Würzburg Institut für Molekulare Infektionsbiologie Josef-Schneider-Straße 2 / Bau D15 97080 Würzburg	9. Ber. Nr. Durchführende Institution Institut für Molekulare Infektionsforschung
	10. Förderkennzeichen 0315836
	11. Seitenzahl entfällt
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) Projekträger Jülich Forschungszentrum Jülich 52425 Jülich	13. Literaturangaben entfällt
	14. Tabellen entfällt
	15. Abbildungen entfällt
16. Zusätzliche Angaben entfällt	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Projekträger Jülich, Jülich,	
18. Kurzfassung Ziel dieses Projekts war es, mithilfe neuartiger Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethoden erstmalig die Genexpression eines bakteriellen Erregers und seines eukaryontischen Wirts simultan zu erfassen. Als Modellsystem wurde die Infektion mit Salmonella Typhimurium, einem wichtigen, fakultativ intrazellulären Pathogen, von unterschiedlichen humanen Zelllinien gewählt. Als das Projekt im Jahr 2010 begann, gab es noch keine Methoden um die Genexpression zweier so unterschiedlicher Organismen wie ein Bakterium und eine humane Zelle gleichzeitig und in einem Schritt zu analysieren. Stattdessen wurden die beiden Organismen nach erfolgter Infektion zur Probennahme wieder separiert. Diese Herangehensweise war sehr zeitaufwändig, erforderte große Mengen an infizierten Zellen und war aufgrund der vielen experimentellen Schritte sehr fehleranfällig. Unser Projekt hat seitdem entscheidend zu einem Paradigmenwechsel in der Infektionsbiologie beigetragen, nämlich dass heutzutage die hohe Sensitivität und Auflösung der RNA-Sequenzierung genutzt werden kann, um die Unterscheidung von Wirt und Pathogen erst während der Datenanalyse (d.h. am Computer) zu realisieren. Infolgedessen wird eine physische Auftrennung der beiden Organismen obsolet, was einen enormen Zeit- und Sensitivitätsgewinn mit sich bringt. So können nunmehr mehrere Proben parallel prozessiert werden. In unserem Projekt wurde beispielsweise ein hoch aufgelöster zeitlicher Verlauf der Salmonellen-Infektion humaner Epithelzellen analysiert. Darüber hinaus ist es möglich vergleichende Infektionsexperimente (z.B. zwischen einem Wildtyp- und einem Mutantenstamm) durchzuführen. Der Erfolg dieses Projekts zeigt sich außerdem darin, dass bereits etliche Zusammenarbeiten mit international führenden Wissenschaftlern verwandter Themenbereiche begonnen wurden. Insgesamt hat dieses Projekt einen entscheidenden Beitrag geleistet, um die RNA-Sequenzierung zweier unterschiedlicher Organismen (sog. Duale RNA-Sequenzierung) zu realisieren und in die Infektionsbiologie einzuführen.	
19. Schlagwörter entfällt	
20. Verlag entfällt	21. Preis entfällt

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN not applicable	2. type of document (e.g. report, publication) Final Report
3. title Final Report for the project "Medical Infection Genomics: Transcriptomics of the next generation for bacterial infections"	
4. author(s) (family name, first name(s)) Prof. Dr. Vogel, Jörg	5. end of project 30.06.2014
	6. publication date not applicable
	7. form of publication not applicable
8. performing organization(s) (name, address) Julius-Maximilians-Universität Würzburg Institut für Molekulare Infektionsbiologie Josef-Schneider-Straße 2 / Bau D15 97080 Würzburg	9. originator's report no. Institute for Molecular Infection Biology
	10. reference no. 0315836
	11. no. of pages Not applicable
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) Projekträger Jülich Forschungszentrum Jülich 52425 Jülich	13. no. of references not applicable
	14. no. of tables not applicable
	15. no. of figures not applicable
16. supplementary notes not applicable	
17. presented at (title, place, date) Projekträger Jülich, Jülich,	
18. abstract The aim of the present project was to profile, for the first time, gene expression changes in a bacterial pathogen and its eukaryotic host simultaneously by making use of high-throughput sequencing. Salmonella Typhimurium, an important intracellular pathogen, and diverse human cell lines were chosen as a model system of infection. When the project started in 2010, there were no methods available to measure in a single step gene expression changes in two organisms as different as a bacterium and a human cell. Rather, conventional approaches relied on the physical separation of the two organisms after infection had taken place in order to obtain separate samples from pathogen and host. These protocols were very labor-intensive and time-consuming and required large amounts of infected cells as starting material. In addition, as a consequence of the many experimental steps needed, there were a lot of potential sources of bias, rendering the approach error-prone. Our project has since significantly contributed to a paradigm change in the field of infection biology; i.e. the high sensitivity and resolution of state-of-the-art RNA-sequencing can be applied to discriminate among host and pathogen computationally. The physical separation of the two organisms is now obsolete, resulting in a reduction in time/experimental steps and an increase in sensitivity. These benefits allow for the parallel handling of numerous samples. For example, within our project we sampled a highly resolved time-course of Salmonella infection of epithelial cells. Additionally, comparative infection experiments (e.g. between the wild-type and a defined mutant strain) become feasible. The success of this project is further supported by a substantial number of collaborations initiated with internationally leading scientists in related fields. Together, the current project contributed substantially to the establishment of RNA-sequencing for the simultaneous analysis of gene expression patterns in two distinct organisms (referred to as Dual RNA-seq) and its introduction in the field of infection biology.	
19. keywords not applicable	
20. publisher not applicable	21. price not applicable