Respiratorische *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen: Komparative Genomanalyse zwischen Isolaten von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Isolaten von Patienten mit Mukoviszidose

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Daniel Kopitziok aus Hamburg

> > Gießen 2019

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Trinad Chakraborty

> Gutachter: PD Dr. Torsten Hain Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Zimmer

Tag der Disputation: 03.09.2020

Inhaltsverzeichnis

0	VorwortV
1	Einleitung1
1.1	Biologie und Phylogenie von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1
1.1.	1 Taxonomie von <i>P. aeruginosa</i> 2
1.1.	2 Multilokus-Sequenztypisierung
1.1.	3 Populationsstruktur von <i>P. aeruginosa</i>
1.2	<i>P. aeruginosa</i> als Krankheitserreger3
1.2.	1 Ambulant erworbene Pneumonie (CAP)3
1.2.	2 Mukoviszidose (CF)
1.3	Virulenzfaktoren von <i>P. aeruginosa</i> 6
1.3.	1 Lipopolysaccharide (LPS)7
1.3.	2 Toxine
1.3.	.3 Proteinsekretionssysteme
1.3.	4 Proteasen
1.3.	5 Biofilm
1.3.	.6 Quorum sensing
1.3.	7 Weitere Virulenzfaktoren 10
1.4	Antibiotikaresistenz bei <i>P. aeruginosa</i> 11
1.4.	1 β-Laktam-Antibiotika
1.4.	2 Aminoglykosid-Antibiotika 15
1.4.	3 Fluorchinolon-Antibiotika 16
1.4.	4 Effluxpumpen-vermittelte Antibiotikaresistenz 17
1.4.	5 Antibiotikaresistenz durch verringerte Zellmembranpermeabilität
1.5	Genom von <i>P. aeruginosa</i> 20
1.5.	1 <i>Core</i> -Genom
1.5.	2 Horizontaler Gentransfer
1.5.	3 Accessory-Genom
1.5.	4 Plasmide
2	Zielsetzung der Arbeit26

3 N	Material und Methoden	27
3.1	Material	27
3.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
3.1.2	Bakterienstämme	28
3.1.3	Referenzstämme	29
3.1.4	Nährmedien	29
3.1.5	Kits	30
3.2	Methoden (Labor)	30
3.2.1	Kultivierung von <i>P. aeruginosa</i> -Stämmen	30
3.2.2	Phänotypische Beurteilung	31
3.2.3	Messung des Bakterienwachstums anhand der optischen Dichte	31
3.2.4	MALDI-TOF Analyse	31
3.2.5	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen von	
	Pseudomonas-wirksamen Antibiotika	32
3.2.6	DNA-Extraktion	33
3.2.7	DNA-Quantifizierung	34
3.2.8	Herstellung von Glycerinkulturen	34
3.2.9	Library-Preparation	35
3.2.10	0 <i>Library</i> -Quantifizierung	35
3.2.1 ⁻	1 Genom-Sequenzierung	36
3.3	Methoden (Bioinformatik)	37
3.3.1	Rohdaten	37
3.3.2	Software	37
3.3.3	ASA ³ P- <i>Pipeline</i>	37
3.3.4	Pseudomonas aeruginosa serotyper (PAst)	39
3.3.5	Resistance Gene Identifier (RGI)	39
3.3.6	GECO	40
3.3.7	CLC Sequence Viewer	40
3.3.8	Clustal Omega	41
3.3.9	CCT (CGView Comparison Tool)	41
3.3.10	0 EDGAR	42
3.3.1 ⁻	1 Phylogenie	42
3.3.12	2 BPGA	43
3.3.1	3 PHASTER	43
3.3.14	4 Virulenzfaktoren (ABRicate)	43
3.3.1	5 Plasmid-Detektion (ABRicate)	44

3.3.16	Plasmid-Detektion (Platon)	44
3.4	Statistik	45
4 E	rgebnisse	46
4.1	Kultivierung und phänotypische Beurteilung	
4.1.1	Vergleich der Koloniemorphologie	
4.1.2	Phänotypische Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung	50
4.2	Ergebnisse der Genom-Sequenzierung	54
4.3	Zuordnung zur Populationsstruktur	56
4.3.1	In silico-Serotypisierung	57
4.3.2	Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)	58
4.4	Komparative Genomanalyse	65
4.4.1	Core-/Pangenom-Analyse	65
4.4.2	Funktionale COG-Klassifikation	67
4.4.3	Genomische Inseln	70
4.4.4	Nachweis von Plasmiden	74
4.4.5	Nachweis von Bakteriophagen	75
4.5	Virulenzfaktoren	77
4.5.1	Nachweis von Virulenzgenen	77
4.5.2	Mukoide Phänotypen und <i>mucA</i> -Mutationen	
4.6	Antibiotikaresistenz	80
4.6.1	Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen	80
4.6.2	Nachweis von resistenzvermittelnden Proteinvarianten	84
4.6.3	Nachweis von Efflux-vermittelter Antibiotikaresistenz	87
5 D)iskussion	90
5.1	Genom-Sequenzierung	90
5.2	Morphologie	91
5.3	Antibiotikaresistenz	93
5.4	Populationsstruktur	
5.5	Serotypen	100
5.6	Virulenzfaktoren	101
5.7	Komparative Genomanalyse	105
5.8	Plasmide	107

5.9	Bakteriophagen	109
5.10	Ausblick	110
6	Zusammenfassung	111
7	Conclusion	113
8	Abkürzungsverzeichnis	115
9	Abbildungsverzeichnis	118
10	Tabellenverzeichnis	119
11	Literaturverzeichnis	120
12	Anhang	139
12.1	Inhaltsverzeichnis des elektronischen (E-) Anhangs (CD)	139
12.2	Inhaltsverzeichnis des gedruckten Anhangs	141
13	Erklärung zur Dissertation	145
14	Danksagung	146

0 Vorwort

Die wissenschaftliche Literatur ist insbesondere im Bereich der Genom-Sequenzierung von spezifischen englischsprachigen Fachtermini geprägt, zu denen selten deutsche Äquivalente vorhanden sind. Deshalb wurden die englischen Fachtermini zum größten Teil in dieser Arbeit übernommen und diese mit kursiver Schriftart und großen Anfangsbuchstaben hervorgehoben. So können Neologismen vermieden werden und Vergleiche dieser Arbeit mit der wissenschaftlichen Literatur werden nicht durch Übersetzungen verkompliziert. Allerdings sollen ein paar grundlegende Begriffe der Genom-Sequenzierung und Bioinformatik erläutert werden:

Library:	Gesamtheit der vervielfältigten, für die Sequenzierung vorbereiteten				
	DNA-Fragmente (deutsch: Sequenzierbibliothek).				
Read:	Nukleotidabfolge eines am Stück sequenzierten DNA-Fragmentes.				
Alignment:	Vergleich mehrerer Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen mit				
	Anordnung nach den bestmöglichen Qualitätskriterien.				
Coverage:	Die Anzahl <i>Reads</i> , die bei einem Nukleotid- <i>Alignment</i> ein bestimmtes				
	Nukleotid abdecken (deutsch: Abdeckung).				
Contig:	Zusammenhängende DNA-Sequenz (Konsensussequenz) durch				
	überlappende <i>Reads</i> .				
Assembly:	Der Prozess der Bildung von Contigs aus alignierten, überlappenden				
	Reads.				
Scaffolds:	Aus mehreren Contigs zusammengesetzte, an einer Referenzsequenz				
	ausgerichtete DNA-Sequenz mit potentiellen Lücken, die anhand der				
	Referenz abgeschätzt werden.				
Scaffolding:	Der Prozess der Bildung langer Scaffolds aus Contigs durch Abgleich				
	an einer Referenzsequenz.				
Annotation:	Der Prozess der Lokalisation von kodierenden Regionen, der				
	Bestimmung von Genen (strukturelle Annotation) und der				
	Funktionsvorhersage durch Datenbankabgleiche (funktionale				
Annotation).					

1 Einleitung

1.1 Biologie und Phylogenie von Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa wurde erstmals 1895 von Walter Migula beschrieben und ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives, nicht fermentierendes Bakterium mit einer Breite von $0,5 - 1 \mu m$ und einer Länge von $1,5 - 5 \mu m$. Es kann gerade oder leicht gedreht vorkommen und hat die Möglichkeit sich über eine oder mehrere polare Flagellen fortzubewegen. Charakteristisch für *P. aeruginosa* ist die gelbgrüne (Pyoverdin) bis blaugrüne (Pyocyanin) Pigmentierung sowie ein süßlicher Geruch, der häufig als "lindenblütenartig" beschrieben wird (Kahlon, 2016; Moore et al., 2006).

Lange Zeit wurde *P. aeruginosa* als obligat aerobes Bakterium beschrieben, weil es Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor verwendet. Allerdings ist es in der Lage auch bei anaeroben Verhältnissen mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor zu wachsen und wird daher heute als fakultativ anaerobes Bakterium bezeichnet (Arai, 2011).

Durch sehr vielfältige und komplexe Stoffwechselwege kann sich das ubiquitär vorkommende Umweltbakterium P. aeruginosa an sehr unterschiedliche Umweltgegebenheiten anpassen, Pflanzen, Tiere und Menschen besiedeln und bei ihnen Infektionen auslösen. Als typischer Feuchtkeim kommt P. aeruginosa in allen möglichen marinen Habitaten sowohl in natürlichen, als auch in alltäglichen, menschlichen Lebensräumen vor. Natürliche Habitate von P. aeruginosa sind im Erdboden, Sümpfen, Pflanzenwurzeln und in Gewässern. In Krankenhäusern konnte P. aeruginosa u. a. in Desinfektionsmitteln, Waschbecken, Toiletten, Duschen und auf Beatmungsgeräten nachgewiesen werden. Außerhalb des Krankenhauses ist P. aeruginosa in feuchten Umgebungen wie Schwimmbädern, Whirlpools, aber auch in Kontaktlinsenflüssigkeiten oder im Gemüse zu finden (Lister et al., 2009).

Trotz der weiten Verbreitung von *P. aeruginosa* in der Natur sind die häufigsten schweren Infektionen nosokomial erworben und seltener ambulant. Als opportunistischer Krankheitserreger löst *P. aeruginosa* zum größten Teil Infektionen bei immunsupprimierten oder durch AIDS immungeschwächten Patienten aus (Kielhofner et al., 1992).

Neben chronischen und akuten Lungeninfektionen kann *P. aeruginosa* unter anderem auch Auslöser für Harnwegsinfektionen, Keratitis, Otitis externa oder Infektionen bei schweren Verbrennungen mit darauffolgender Bakteriämie oder Sepsis sein (Bassetti et al., 2018).

1

1.1.1 Taxonomie von *P. aeruginosa*

Die Gattung *Pseudomonas* gehört zur Familie der *Pseudomonadaceae*, die zusammen mit der Familie der *Moraxellaceae* in die Ordnung der *Pseudomonadales* gestellt werden. Die Ordnung *Pseudomonadales* gehört zur Klasse der *Gammaproteobacteria* (Garrity et al., 2015). Phylogenetische Untersuchungen haben ergeben, dass etwa 250 verschiedene Spezies und 18 Subspezies der Gattung *Pseudomonas* bekannt sind. Diese lassen sich phylogenetisch in zwei Abstammungslinien, die *P. aeruginosa-* und die *P. fluorescens*-Linie, unterteilen. Die Abstammungslinien werden in Gruppen differenziert, die wiederum zum Teil noch Untergruppen enthalten. Die *P. aeruginosa-* und die *P. stutzeri*-Gruppe sind (Gomila et al., 2017; Peix et al., 2018).

1.1.2 Multilokus-Sequenztypisierung

Multilokus-Sequenztypisierung (*Multilocus sequence typing*, MLST) ist eine weit verbreitete Methode zur phylogenetischen Klassifizierung von Bakterien. Auch in Zeiten der Komplett-Genom-Sequenzierung (*"whole-genome sequencing"*) ist diese Methode noch sehr geläufig. In der Regel werden die Allele von sieben Haushaltsgenen (*housekeeping genes*) bestimmt. Dabei handelt es sich um Gene, die in allen Stämmen unter allen Umständen exprimiert werden und so hoch konserviert sind, dass sie sich nur durch Punktmutationen (SNPs, Einzelnukleotid-Polymorphismen) unterscheiden. Die Kombination der verschiedenen Allele der Haushaltsgene ergibt ein Allelprofil, welches einem Sequenztyp (ST) zugeordnet ist.

Die phylogenetische Typisierung innerhalb der Spezies *P. aeruginosa* wird mittels der sieben Haushaltsgene *acsA* (Acetyl-CoA-Synthetase), *aroE* (Shikimatdehydrogenase), *guaA* (GMP-Synthase), *mutL* (DNA-*Mismatch*-Reparaturprotein), *nuoD* (NADH-Dehydrogenase), *ppsA* (Phosphoenolpyruvatsynthase), und *trpE* (Anthranilatsynthase) durchgeführt (Curran et al., 2004). Die Datenbank ist erreichbar unter *"https://pubmlst.org/paeruginosa/"*, wird regelmäßig aktualisiert und die Liste der Sequenztypen mit neuen Allelprofil-Kombinationen erweitert. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Stand 29.04.2019) umfasst die Datenbank je nach Haushaltsgen zwischen 129 (*nuoD*) und 296 (*aroE*) verschiedene Allele und definiert somit 3274 ST.

2

1.1.3 Populationsstruktur von *P. aeruginosa*

In einer Studie von Freschi et al. wurden neue Erkenntnisse zur Populationsstruktur von *P. aeruginosa* gesammelt. Insgesamt wurde ein Datensatz von 1315 *P. aeruginosa*-Genomen analysiert. Die Proben wurden aus 19 klinischen und 7 Umweltquellen isoliert und 619 Genome davon neu sequenziert. Aufgrund des großen Datensatzes konnte die Populationsstruktur von drei bekannten Gruppen (Hauptgruppen 1 und 2 und sehr abseits liegenden Gruppe 3) auf fünf Gruppen erweitert werden. Der durch SNPs im *Core*-Genom berechnete phylogenetische Baum ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Die zwei neubeschriebenen Gruppen befinden sich zwischen den Hauptgruppen und Gruppe 3 (Freschi et al., 2018b).



Abbildung 1: Schematischer phylogenetischer Baum mit Kennzeichnung der fünf phylogenetischen Gruppen (A), Gesamtansicht zur Verdeutlichung der tatsächlichen phylogenetischen Distanz zur Gruppe 3 (B) (Adaptiert an Freschi, Vincent, *et al.*, 2018).

1.2 *P. aeruginosa* als Krankheitserreger

1.2.1 Ambulant erworbene Pneumonie (CAP)

Als Pneumonie oder Lungenentzündung werden Infektionen des Lungenparenchyms bezeichnet, die mit verschiedenen Epidemiologien, Pathogenesen, Ausprägungen und klinischen Verläufen einhergehen können. Zur Einschätzung des Erregerspektrums, des Krankheitsverlaufes und der weiterführenden Therapie werden Pneumonien in der "Pneumonie-Triade" eingeteilt. Nach den Kriterien "Ort des Erwerbs" und "Immunstatus des Patienten" werden drei Arten der Pneumonie unterschieden: (Ewig et al., 2016)

- **Ambulant erworbene Pneumonie** (engl.: *community-acquired pneumonia*, CAP), außerhalb des Krankenhauses erworben, immunkompetenter Patient,
- Nosokomial erworbene Pneumonie (engl.: *hospital-acquired pneumonia*, HAP), im Krankenhaus erworben (> 48 h nach Krankenhausaufnahme bis 3 Monate nach Hospitalisation), immunkompetenter Patient,
- Pneumonie unter Immunsuppression (engl.: pneumonia in the immunocompromised host), außerhalb oder im Krankenhaus erworben, schwere Immunsuppression.

Patienten mit CAP leiden in der Regel unter grippeähnlichen Allgemeinsymptomen (Fieber oder Hypothermie, reduziertem Allgemeinzustand, Myalgien, Arthralgien, etc.) und atemabhängigen Symptomen (Husten mit evtl. mukoidem, purulentem oder blutigem Auswurf, Thoraxschmerz, Dyspnoe) (Ewig et al., 2016).

CAP ist eine akut lebensbedrohliche Erkrankung und die Infektionserkrankung mit den meisten Todesfällen weltweit. Im Jahr 2017 betrug die Zahl der Patienten, die aufgrund einer CAP in Deutschland stationär behandelt wurden, etwas mehr als 280.000, die Klinikletalität betrug etwa 13 % (Qualitätsreport 2017-IQTiG, 2017). Die "*Global Burden of Disease*"-Studie der WHO hat gezeigt, dass untere Atemwegserkrankungen im Jahr 2016 weltweit für ca. 2,4 Millionen Todesfälle (4,35 % aller 2016 verstorbenen Menschen) und in Deutschland für ca. 22.425 Todesfälle (2,44 %) verantwortlich waren (IHME, 2016).

P. aeruginosa wird mit zwischen 0,4 % (Von Baum et al., 2010) und 4,2 % (Restrepo et al., 2018) der CAP-Fälle eher selten als Erreger der CAP identifiziert. Der häufigste CAP-Erreger ist *Streptococcus pneumoniae* (42,6 % der Fälle), gefolgt von respiratorischen Viren (14,9 %), *Legionella pneumophila* (6 %), *Haemophilus influenzae* (3,6 %), *Mycoplasma pneumoniae* (3,4 %) und *Staphylococcus aureus* (2,7 %) (Cillóniz et al., 2016a).

Allerdings sollte bei Patienten mit zusätzlichen Risikofaktoren, wie obstruktiven Lungenerkrankungen, z. B. COPD oder Bronchiektasie (insbesondere bei Einnahme von inhalativen Glucocorticoiden) oder bei Ernährung über eine PEG-Sonde eine durch Pseudomonaden ausgelöste Pneumonie in Betracht gezogen werden (Von Baum et al., 2010). Insbesondere inhalative Glucocorticoide gelten als größter Risikofaktor für die Entwicklung einer CAP mit *P. aeruginosa* (Cillóniz et al., 2016b). Liegen Risikofaktoren vor, sollte anhand der Schwere der Pneumonie die nachfolgende Therapie abgewogen werden.

Gegen *P. aeruginosa* wirksame und klinisch eingesetzte Antibiotika sind β-Laktam-Antibiotika der Klasse der Penicilline (Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam), Cephalosporine (Ceftazidim, Cefepim), Monobactame (Aztreonam) und Carbapeneme (Imipenem und Meropenem), Aminoglykosid-Antibiotika (Amikacin, Gentamicin und Tobramycin), Fluorchinolon-Antibiotika (Ciprofloxacin) und Polymyxine (Colistin).

Bei leichtgradiger CAP mit Risikofaktoren wird das orale Antibiotikum Ciprofloxacin häufig mit Amoxicillin gegen Pneumokokken kombiniert (Ewig et al., 2016).

Schwere Verläufe der CAP kommen bei Infektionen mit *P. aeruginosa* öfter vor als bei anderen bakteriellen Erregern (62 % vs. 28 %). Die 30-Tage-Mortalität bei CAP-Erkrankten in Verbindung mit *P. aeruginosa* ist mit 18 % höher als bei anderen Mikroorganismen (6 %) (Cillóniz et al., 2016b). Bei moderater oder schwerer Pneumonie ist eine gegen *P. aeruginosa* wirksame Kombinationstherapie indiziert. Diese beinhaltet die Kombination eines β -Laktam-Antibiotikums (Piperacillin/Tazobactam, Imipenem oder Meropenem) mit einem Fluorchinolon (Ciprofloxacin) oder einem Aminoglykosid und einem Makrolid (Azithromycin). Nach Verbesserung der klinischen Situation oder Antibiotikaresistenzprüfung ist ein Wechsel auf eine Monotherapie empfohlen (Ewig et al., 2016).

1.2.2 Mukoviszidose (CF)

Mukoviszidose, auch zystische Fibrose (engl.: cystic fibrosis, CF) ist eine unheilbare, autosomal-rezessiv vererbbare Stoffwechselerkrankung, die auf Mutationen im CFTR-Gen (engl.: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) beruht. Das CFTR-Gen kodiert für Chloridionen-Kanäle in Epithelzellen. Diese transportieren Chlorid in den Extrazellularraum exokriner Drüsen. Aufgrund des osmotischen Drucks folgen Wassermoleküle den Chloridionen und dies führt zu einer niedrigeren Viskosität des Sekrets. Mutationen im CFTR-Gen können zu fehlenden oder dysfunktionalen Kanälen führen, die eine Erhöhung der Viskosität von Sekreten exokriner Drüsenzellen zur Folge haben. Die Patienten leiden häufig unter Untergewicht, einer Insuffizienz des exokrinen Pankreas und Infektionen mit opportunistischen Pathogenen. CF-Patienten sind zwar grundlegend immunkompetent, aufgrund der geringen mukoziliären Clearance ist die Situation im Lungensystem jedoch mit einer Immunsuppression vergleichbar. Junge Patienten zeigen häufig Besiedelungen durch Staphylococcus aureus oder H. influenzae. Später ist P. aeruginosa der häufigste Besiedler bei fast 60 % der Patienten, die das Erwachsenenalter erreichen (Hauser et al., 2011; Rafeeq und Murad, 2017; Schwarz et al., 2017; Tümmler und Kiewitz, 1999).

Durch Anpassungsmechanismen der Bakterien im mikroaeroben bis anaeroben Milieu der chronisch besiedelten CF-Lunge können die Bakterien kaum durch Antibiotika erreicht werden, wodurch *Pseudomonas*-Stämme die Lungen häufig lebenslang besiedeln. Typische Anpassungsmechanismen während chronischer Infektionen sind sowohl die Änderung der Zusammensetzung der Lipopolysaccharide (LPS), womit der Verlust der Serotypisierbarkeit einhergeht, als auch der Verlust der Flagelle und der damit verbundenen stark eingeschränkten Beweglichkeit. Darüber hinaus werden häufig eine verstärkte Biofilm-, bzw. Alginatproduktion (mukoider Phänotyp) und die Bildung von *small colony variants* (SCV) verzeichnet. SCV zeichnen sich ebenfalls durch erhöhte Biofilmproduktion, aber auch durch starke Oberflächenanheftung und Änderungen der extrazellulären Polysaccharid-Produktion aus (Fricks-Lima et al., 2015; Malone, 2015).

Die Behandlung der CF richtet sich neben symptomatischen Therapiemaßnamen gegen die chronische Besiedelung und Infektion mit Bakterien wie P. aeruginosa. Dabei werden Therapieansätze verfolgt: Die Suppressionstherapie zwei und die Exazerbationstherapie. Bei chronischer Besiedelung soll die Suppressionstherapie eine Reduzierung der Bakterienlast und eine Eindämmung der chronischen Infektion zum Schutz des Bronchialsystems vor strukturellen Schäden erzielen. Hier stehen neben der langfristig eingesetzten inhalativen Therapie auch orale und intravenös applizierte Antibiotika oder Kombinationen zur Wahl. Bei pulmonaler Verschlechterung, wie bei Atemwegsinfektionen, wird eine Exazerbationstherapie eingeleitet, die oral, intravenös oder in Kombination durchgeführt werden kann. Eine intravenöse Suppressionstherapie zur Senkung der Bakterienlast ist je nach Schweregrad und Symptomzunahme individuell abzuwägen und beinhaltet häufig eine Kombination eines β-Laktam Antibiotikums mit einem Aminoglykosid für 10 bis 14 Tage. Die intravenöse Exazerbationstherapie sollte für 14 bis 21 Tage durchgeführt werden. Die zur Wahl stehenden antipseudomonalen Antibiotika sind äquivalent zu den bei der CAP eingesetzten Antibiotika (1.2.1). Eine Steuerung der Behandlung nach erfolgter phänotypischer Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung wird kritisch gesehen und aktuell nicht mehr empfohlen. Die Identifizierung repräsentativer Isolate aus sehr variablen Populationen kann problematisch und aufwändig sein. Testungen können zum einen variieren und nicht-repräsentativ sein, zum anderen in vitro und in vivo aufgrund von Faktoren, wie hochvisköse Lungensekrete, Biofilm und unterschiedlichen Sauerstoffgehälter im Milieu variieren. In Untersuchungen von Hurley et al. zeigten gezielte antibiotische Behandlungen chronischer P. aeruginosa-Infektionen keine besseren Therapieergebnisse als zufällig gewählte Antibiotika (Hurley et al., 2012). Zur und Überwachung hochresistenter Isolate Identifizieruna sind allerdings Resistenztestungen zu empfehlen (Schwarz et al., 2017).

1.3 Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa besitzt eine große Anzahl von Virulenzfaktoren, deren Produktion durch eine Vielzahl von komplexen intra- und interzellulären Regulationsnetzwerken geregelt wird. Dadurch ist *P. aeruginosa* in der Lage andere Bakterien zu töten, dem Immunsystem zu entkommen und in Menschen, Tieren und Pflanzen Infektionen auszulösen (Klockgether und Tümmler, 2017). Die wichtigsten Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* werden im Folgenden erläutert.

1.3.1 Lipopolysaccharide (LPS)

An der äußeren Membran von *P. aeruginosa* befindet sich eine Schicht von Lipopolysacchariden (LPS). Die LPS sind einer der Haupt-Virulenzfaktoren des Bakteriums und spielen eine große Rolle in der Interaktion zwischen Bakterium und Wirt. Sie dienen auch als Rezeptoren für Pyocine und Bakteriophagen, außerdem stehen sie mit der Immunevasion in Verbindung. Die Typisierung der Bakterien anhand ihres Serotyps wurde in den 1980er Jahren durch das *"International Antigenic Typing Scheme"* auf 20 Serotypen (O1 bis O20) bei *P. aeruginosa* definiert. Aufgrund des hohen Aufwands werden klinische Serotypisierungen heute kaum noch angewandt (Thrane et al., 2016).

Die LPS von *P. aeruginosa* bestehen grundlegend aus drei Bestandteilen, dem Kernoligosaccharid, dem Lipid A (Endotoxin) und dem O-Antigen. Häufig produziert *P. aeruginosa* zwei Formen von O-Antigenen, das CPA (*common polysaccharide antigen*) und das OSA (*O-specific antigen*). Zur Definition des Serotyps wird der variable, genetische Bereich des OSA genutzt, weil der Bereich des CPA sehr konserviert ist. Innerhalb der 20 unterschiedlichen Serotypen wurden 11 unterschiedliche OSA-Gencluster identifiziert, die sich auf Genomebene stark voneinander unterscheiden (Raymond et al., 2002). Die Serotypen mit gleichem OSA-Gencluster werden als Serogruppe bezeichnet. Eine Besonderheit stellen hier die Serogruppen O2/O16 und O5/O18/O20 dar, die das gleiche OSA-Gencluster, allerdings jeweils nur O2 und O16 das auf einem Prophagen befindliche Gen *wzy* β besitzen (Thrane et al., 2016). Somit werden mit den Serogruppen O2 und O5 insgesamt 12 Serogruppen unterschieden, die in dieser Arbeit vereinfacht als Serotyp beschrieben werden.

Der im Laufe chronischer Infektionen, wie der CF, gelegentlich auftretende Verlust der Serotypisierbarkeit ist entweder auf eine "Nichttypisierbarkeit" oder eine "Mehrfachtypisierbarkeit" zurückzuführen. Mehrfachtypisierungen korrelieren häufig mit schlechten Behandlungsergebnissen. Chronische Infektionen können auch zu einem Verlust der Produktion des O-Antigens führen. LPS-Modifikationen bedeuten den Verlust der Typisierung und kommen höchstwahrscheinlich aufgrund langer Bakterium-Wirt-Interaktionen zustande. Dadurch können die Bakterien schlechter vom Immunsystem oder Bakteriophagen erkannt werden, was die Fitness des Bakteriums steigert. Jedoch können anfänglich gegen das humane Serum resistente *P. aeruginosa*-Stämme durch Verlust des O-Antigens anfällig gegenüber dem humanen Serum werden. Dieser Mechanismus ist allerdings noch nicht abschließend geklärt (Thrane et al., 2016). In klinischen Isolaten werden häufig die Serotypen O11 und O12 identifiziert, die auch mit MDR (*multidrug-resistant*) in Verbindung stehen. Insbesondere der Serotyp O12 wird immer vorherrschender unter klinischen und hochresistenten Stämmen. Auch durch horizontalen Gentransfer der LPS-Biosynthese-Gene kann es zu einem Serotypenswitch (Änderung des Serotyps) kommen. Während dieser Rekombinationsvorgänge wurde auch der Erwerb von Antibiotikaresistenzgenen beobachtet, was zusätzlich zu erhöhter Resistenz führt (Thrane et al., 2015).

1.3.2 Toxine

Wichtig für die Pathogenität von *P. aeruginosa* ist die Produktion von Toxinen, wie Exotoxin A, verschiedene Exoenzyme und die Phospholipase C, die im Folgenden erläutert werden. Exotoxin A (*exoA*, ADP-Ribosyltransferase) hemmt die Proteinbiosynthese, indem es einen ADP-Ribosyl–Komplex mit dem Elongationsfaktor 2 (EF2) bildet, welcher daraufhin nicht mehr für die Proteinbiosynthese zur Verfügung steht. Dieser Mechanismus ähnelt der Wirkung des Diphterietoxins und führt in der Regel zur Lyse der Zelle.

Exoenzym U (*exoU*) ist ein wirksames Zytotoxin mit Phospholipase A2-Aktivität, das in vielen Zellen zu einer schnellen Nekrose führt. Exoenzym S und T (*exoS*, *exoT*) sind nahverwandte bifunktionelle Typ-III-Toxine mit GAP- (GTPase aktivierendes Protein) und ADPRT- (ADP Ribosyltransferase) Aktivität. Sie bewirken eine Zerstörung des *Aktin-Zytoskeletts* und leiten die mitochondriale Apoptose ein. Das Exoenzym Y (*exoY*) ist eine Adenylatzyklase, welche zu einer Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts führt und die endotheliale Permeabilität erhöht. Das Vorkommen von *exoU* und *exoS* in einem Stamm schließt sich in der Regel gegenseitig aus (Feltman et al., 2001). Es ergeben sich die beiden häufigen Kombinationen *exoU/exoT* oder *exoS/exoT*. Die Phospholipase C (*plcH*) baut Surfactant ab, das verhindert, dass die Lungenalveolen beim Herausströmen der Luft kollabieren (Engel und Balachandran, 2009; Hauser, 2009; Newman et al., 2017).

1.3.3 Proteinsekretionssysteme

P. aeruginosa besitzt fünf Sekretionssysteme für Proteine, von denen das Typ-II- und das Typ-III-Sekretionssystem die Mehrzahl der Toxine sezerniert. Das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) formt eine Nadelstruktur auf der bakteriellen Oberfläche und ermöglicht damit eine Injektion der bakteriellen Toxine (ExoU, ExoS, ExoT, ExoY) direkt in die Wirtszelle. 36 Gene kodieren in fünf Operons für die Biogenese und Regulation des T3SS (Engel und Balachandran, 2009; Hauser, 2009).

1.3.4 Proteasen

Als Proteasen bezeichnet man Enzyme, die andere Proteine spalten. Diese extrazellulären Enzyme können als Toxine fungieren und Wirtszellen und Gewebestrukturen schädigen. Darüber hinaus können manche Enzyme Schutz vor Phagozytose vermitteln.

Das Genom von PAO1 enthält ca. 155 Gene, die für Proteasen kodieren. Dies entspricht etwa 2,8 % des Genoms. Die wichtigsten Proteasen von P. aeruginosa sind die Elastase LasB, die durch Quorum sensing (QS) reguliert wird und Elastin (Stukturprotein u. a. in Blutgefäßen) spaltet, die Zink-Metalloprotease LasA mit Elastase- und staphylolytischer Aktivität und die alkalische Protease AprA, die die Fibrinbildung und Komplementaktivierung hemmt. Zusammen können die Elastase und die alkalische Protease die Grundsubstanz der Dermis und anderer Strukturen sowie Antikörper zerstören (Hoge et al., 2010).

1.3.5 Biofilm

Biofilme stellen eine Wachstumsform von Bakterien dar, bei der die Bakterien in mehrschichtigen komplexen Ansammlungen auf einer Oberfläche adhärieren. Sie sind dabei in einer Matrix eingelagert, die zu 98 % aus Wasser besteht. Der Rest ist aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), also Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren zusammengesetzt. Durch die produzierten EPS sind die Bakterien im Biofilm vor Einflüssen wie Austrocknung, Antibiotika oder dem menschlichen Immunsystem geschützt. Die Produktion des Polysaccharids Alginat trägt zur Architektur des Biofilms bei, ist jedoch nicht essentiell für die Biofilmbildung. Durch Alginat wird der Phagozytoseschutz erhöht und die Lyse durch das Komplementsystem erschwert (Rasamiravaka et al., 2015; Stapper et al., 2004).

Die Regulation der Alginatproduktion in *P. aeruginosa* hängt von der Expressionsregulation des Alginat-Biosynthese-Operons ab. Der Sigmafaktor σ^{22} (AlgU/AlgT) reguliert die Expression durch Bindung an Promoter *algD* des Operons. Gehemmt wird AlgU durch den Anti-Sigma-Faktor MucA. Mutationen in MucA bilden den häufigsten Mechanismus für einen Wechsel in den mukoiden Phänotypen bei *P. aeruginosa*. Die Alginatsynthese ist durch ein komplexes System an induzierenden und hemmenden Faktoren geregelt. So ist die Protease MucD auch ein negativer Regulator der Alginatsynthese (Damron und Goldberg, 2013; Pulcrano et al., 2012).

1.3.6 Quorum sensing

Quorum sensing (QS) bezeichnet die auf der lokalen Zellpopulationsdichte beruhende interzelluläre Kommunikation zwischen Bakterien einer Gattung. Die von allen Bakterien produzierten Autoinduktormoleküle binden bei Erreichen einer extrazellulären Schwellenwertkonzentration an entsprechende, intrazelluläre Transkriptionsfaktoren. Durch komplexe Signalkaskaden und gegenseitige Regulation der vier QS-Systeme Las, Rhl, Pqs und Iqs werden bei Erreichen bestimmter Populationsgrößen die Genexpression vieler Virulenzfaktoren reguliert. (Schuster und Greenberg, 2006) Wichtige von QS regulierte Virulenzgene sind *IasB* (Elastase), *IasA* (Protease), *toxA* (Exotoxin A), *aprA* (alkalische Protease), *rhIAB* (Rhamnolipidsynthese) und *phzA – phG, phzM* (Pyocyaninsynthese). Las und Rhl sind ebenfalls an der Biofilmbildung beteiligt (Lee und Zhang, 2014).

1.3.7 Weitere Virulenzfaktoren

P. aeruginosa produziert toxische, pigmentierte Sekundärmetabolite, sogenannte Phenazine. Das wichtigste und am stärksten exprimierte Phenazin ist das Pyocyanin, das für die grün-bläuliche Farbe verantwortlich ist. Pyocyanin kann in oxidierter oder reduzierter Form vorliegen. Die reduzierte Form ist ein instabiles Radikal, welches mit molekularem Sauerstoff reagieren kann und Superoxide (O_2^{-+}) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bilden kann. Der daraus resultierende oxidative Stress führt zu Gewebe- und Zellschäden, zum Unterbrechen des menschlichen epithelialen Zilienschlages, zur Hemmung des epidermalen Zellwachstums sowie der Lymphozytenproliferation. Außerdem hat Pyocyanin eine antimikrobielle Wirkung und hemmt die Immunreaktion auf eine Entzündung (Kahlon, 2016).

Weitere Virulenzfaktoren stellen die auf der Bakterienoberfläche gelegenen Pili oder Flagellen dar. Sie sind ein wichtiger Faktor für die Motilität und die Anheftung an Grenzflächen, durch die die bakterielle Fortbewegung von infizierten zu unversehrten Gebieten und dadurch die Infektionsausbreitung gewährleistet werden. Die Bewegung wird in Flüssigmedien durch Flagellen und auf festen Oberflächen durch die *twitching motility* der Typ-IV-Pili sichergestellt. Durch die Typ-IV-Pili wird auch die Adhärenz an die Wirtszelle eingeleitet, was das QS-System aktiviert und die Biofilmbildung ermöglicht (Kahlon, 2016).

Siderophore sind eisenchelatbildende Substanzen, die insbesondere in eisenlimitierten Umgebungen ausgeschüttet werden um Fe³⁺ in die Zelle zu transportieren. In *P. aeruginosa* erfüllen Pyoverdin und Pyochelin diese Aufgaben. Pyoverdin bildet den Hauptmechanismus zur Eisenaufnahme in *P. aeruginosa* und sorgt für die grünlich fluoreszierende Farbe. Es ist wichtig für die Virulenz in verschiedenen Infektionsmodellen, so auch in Lungeninfektionen (Visca et al., 2007). Pyochelin hat eine etwas geringere Affinität zu Eisen als Pyoverdin und wird mit langanhaltenden, chronischen Infektionen in Zusammenhang gebracht (Newman et al., 2017).

1.4 Antibiotikaresistenz bei P. aeruginosa

Im Laufe der Entwicklung neuer Antibiotika wurden auch schnell Bakterien mit Antibiotikaresistenzen entdeckt (Ventola, 2015). Besonders in Krankenhäusern besteht die Gefahr der Besiedelung oder Infektion mit Bakterien, gegen die nur eine begrenzte antibiotische Behandlung möglich ist. Die bedeutendsten pathogenen Erreger, die für nosokomiale Infektionen verantwortlich sind, werden unter dem Akronym "ESKAPE-Pathogene" zusammengefasst: Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii, P. aeruginosa und Enterobacter 2013). Die Bakterien können anhand spezies (Pendleton et al., ihrer Antibiotikaresistenzen in MDR, XDR und PDR Erreger eingeteilt werden. Per Definition bezeichnet man MDR (multidrug-resistant) als erworbene Resistenz gegen mindestens ein Antibiotikum in drei oder mehr Antibiotikaklassen, XDR (extensively drug-resistant) als Resistenz gegen mindestens ein Antibiotikum in allen bis auf zwei oder weniger Antibiotikaklassen und PDR (pandrug-resistant) als Resistenz gegen alle Antibiotika in allen Antibiotikaklassen (Magiorakos et al., 2012).

P. aeruginosa zeichnet sich durch eine Vielzahl unterschiedlicher Antibiotikaresistenz-Mechanismen aus. Intrinsisch ist *P. aeruginosa* bereits mit einer geringen Zellmembranpermeabilität und einer großen Anzahl Effluxpumpen und inaktivierenden Enzymen ausgestattet. Der Großteil der beschriebenen Resistenzen ist auf vier grundlegende Mechanismen zurückzuführen, die in Abbildung 2 dargestellt sind. Neben der geringen Permeabilität kann der Verlust von Porinen in der äußeren Zellmembran die Einschleusung eines Antibiotikums verringern, veränderte Zielenzyme und der Erwerb bzw. eine erhöhte Expression von inaktivierenden Enzymen können die Wirkung des Antibiotikums verhindern und eine erhöhte Expression von Effluxpumpen führt zur verstärkten Ausschleusung.



Abbildung 2: Schematische Darstellung einer bakteriellen Zelle mit den vier wichtigsten Antibiotikaresistenzmechanismen bei *P. aeruginosa*. A zeigt keine verstärkten Resistenzmechanismen. B zeigt verstärkte Resistenzmechanismen.

Die Weltgesundheitsorganisation WHO veröffentlichte eine Liste resistenter Bakterien für die dringend neue wirksame Antibiotika benötigt werden. Der Carbapenem-resistente *P. aeruginosa* wurde dabei als kritisch (Priorität 1) eingestuft (Tacconelli et al., 2017).

Der Überwachungsbericht der ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) ermittelte die Antibiotikaresistenzen von über 17.000 *P. aeruginosa*-Isolaten aus EU-Ländern und über 1.700 Isolaten aus Deutschland für 2017 in Bezug auf fünf Antibiotika-Klassen (Abbildung 3). Die Resistenzdaten zeigen, dass gegen Penicilline (Piperacillin ± Tazobactam) und Fluorchinolone am häufigsten resistente *P. aeruginosa*-Isolate gefunden wurden. *P. aeruginosa*-Isolate aus Deutschland haben im Vergleich mit dem europäischen Durchschnitt zwar geringere Resistenzwerte, allerdings wurden unter den getesteten Antibiotika-Gruppen Carbapenem-Resistenzen sowohl in Europa als auch in Deutschland am dritthäufigsten identifiziert. Ceftazidim zeigte als Vertreter der Cephalosporine der dritten Generation etwas weniger Resistenzen, die Aminoglykoside wiesen allerdings die wenigsten Resistenzen auf. Im Jahr 2017 waren in Europa 30,8 % der *P. aeruginosa*-Isolate gegen mindestens eine Antibiotika-Klasse resistent und 3,9 % der Isolate hatten sogar gegen alle fünf getesteten Antibiotika-Klassen Resistenzen (ECDC, 2018).



Abbildung 3: Vergleich der durchschnittlichen prozentualen resistenten *P. aeruginosa*-Isolate aus Europa und Deutschland gegen fünf Antibiotika-Klassen im Jahr 2017 (ECDC, 2018).

Im Folgenden soll auf die Wirkungsweisen der β -Laktam-(1.4.1), Aminoglykosid-(1.4.2) und Fluorchinolon-Antibiotika (1.4.3) und die wichtigsten Resistenzmechanismen gegen diese Antibiotika eingegangen werden. Die Effluxpumpen (1.4.4) und Zellmembranpermeabilität (1.4.5) werden als allgemeinere Resistenzmechanismen im Anschluss erläutert.

1.4.1 β-Laktam-Antibiotika

Hauptbestandteil der bakteriellen Zellwand (Mureinsacculus) ist das Peptidoglykan (Murein). Es besteht aus Polysaccharidketten mit quervernetzten Oligopeptidketten. Die Synthese dieser Quervernetzungen (*cross-links*) wird durch das Enzym Transpeptidase katalysiert (Vollmer und Höltje, 2004). β -Laktam-Antibiotika binden aufgrund der ähnlichen Struktur kovalent an den Serinrest im aktiven Zentrum der Transpeptidase und inhibieren sie auf diese Weise irreversibel. β -Laktam-Antibiotika haben eine bakterizide Wirkung auf wachsende Populationen, auf latente oder ruhende Bakterien ist die Wirkung bakteriostatisch. β -Laktam-Antibiotika haben einen β -Laktam-Ring als chemisches Grundgerüst, durch den weiteren chemischen Aufbau lassen sich allerdings vier unterschiedliche Klassen unterscheiden: Penicilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme.

Die häufigsten bei *P. aeruginosa* auftretenden Resistenzmechanismen gegen β -Laktam-Antibiotika sind erhöhte Expression der intrinsischen β -Laktamasen, der Erwerb neuer β -Laktamasen, die erhöhte Ausschleusung mittels Effluxpumpen (siehe Effluxpumpen) und der Verlust bzw. die geringere Expression von Porinen in der Zellmembran, wodurch die Antibiotikaaufnahme vermindert bzw. verhindert wird (Poole, 2011).

β-Laktamasen sind hydrolysierende Enzyme, welche durch katalytische Spaltung einer Peptidbindung den β-Laktamring eines β-Laktam-Antibiotikums unterbrechen und es so inaktivieren. Grundlegend wird zwischen serinabhängigen, metallunabhängigen β-Laktamasen und den Metallo-β-Laktamasen (MBL) unterschieden. Außerdem können β-Laktamasen nach Ambler anhand ihrer Struktur bzw. Aminosäurensequenz in vier molekulare Klassen unterteilt werden. Die Klassen A, C und D bilden Serinproteasen, bzw. Serin-β-Laktamasen (Serinrest am aktiven Zentrum). β-Laktamasen der Klasse B sind zinkabhängige Metalloproteasen, bzw. Metallo-β-Laktamasen (MBL) (Ambler, 1980).

- Klasse A Penicillinasen,
- Klasse B Metallo-β-Laktamasen,
- Klasse C Cephalosporinasen,
- Klasse D Oxacillinasen.

P. aeruginosa enthält zwei intrinsische β-Laktamasen: die Klasse C Cephalosporinase AmpC (Gen: *ampC*) und eine Klasse D Oxacillinase OXA-50 (Girlich et al., 2004; Lodge et al., 1990). Die AmpC-β-Laktamasen werden bei *P. aeruginosa* in unterschiedliche PDC-Typen (*Pseudomonas-derived cephalosporinase*) unterteilt (Berrazeg et al., 2015). Das Transkriptionsregulator-Gen *ampR* liegt in Leserichtung vor *ampC*, an dessen Expression es maßgeblich beteiligt ist. Genomische, proteomische und phänotypische Analysen zeigten, dass AmpR außerdem als globaler Transkriptionsregulator die Expression hunderter weiterer Gene reguliert. Die von AmpR regulierten Gene stehen unter anderem in Verbindung mit Resistenzen gegen β-Laktam- und nicht β-Laktam-Antibiotika, *Quorum sensing* und weiteren Virulenzfaktoren sowie diversen physiologischen Prozessen (Balasubramanian et al., 2014).

Durch horizontalen Gentransfer erworbene Klasse B-Metallo- β -Laktamasen sind hauptsächlich für β -Laktamase-vermittelte Carbapenem-Resistenzen in *P. aeruginosa* verantwortlich. Die auch als Carbapenemasen bezeichneten Enzyme vom *VIM*- und *IMP*-Typ werden am häufigsten in Carbapenem-resistenten Stämmen nachgewiesen (Poole, 2011).

1.4.2 Aminoglykosid-Antibiotika

Antibiotika der Klasse der Aminoglykoside führen zu einer fehlerhaften Proteinbiosynthese der Bakterien und wirken so bakterizid. Aminoglykoside binden mit hoher Affinität an die A-Stelle, die sich an der 16S rRNA in der 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen befindet. Es findet eine Konformationsänderung der A-Stelle statt, die den geschlossenen Zustand imitiert, welcher normalerweise durch eine Interaktion verwandter tRNA und mRNA ausgelöst wird. Dadurch wird die Möglichkeit des Korrekturlesens des Ribosoms verhindert und die Fehlerrate in der Translation ist fehleranfälligen erhöht. Aufgrund dieser sehr Proteinbiosynthese werden funktionsunfähige Proteine synthetisiert. Der Einbau falsch translatierter Proteine in die Zellmembran erhöht die Permeabilität und erleichtert den nachfolgenden Aminoglykosid-Transport in die Zelle. Dieser positive Rückkopplungsmechanismus führt schnell zu einer erhöhten Aminoglykosid-Konzentration im Zytoplasma und zu einem schnellen bakteriellen Zelltod (Krause et al., 2016; Mingeot-Leclercq et al., 1999).

Resistenzen gegen Aminoglykoside sind durch viele Faktoren beeinflussbar. Neben allgemeinen Mechanismen, wie die geringe Zellmembranpermeabilität und erhöhte Ausschleusung durch Effluxpumpen, sind enzymatische Modifikationen bei Aminoglykosid-Resistenzen von besonderer Bedeutung. Veränderungen der Zielstruktur können auch einen Einfluss haben (Ramirez und Tolmasky, 2010).

Aminoglykosid-Antibiotika können durch Enzyme modifiziert und dadurch inaktiviert werden. Diese Aminoglykosid-modifizierenden Enzyme (AME) können je nach molekularer Reaktion in drei Familien unterteilt werden: AAC (Aminoglykosid-N-Acetyltransferasen), APH (Aminoglykosid-O-Phosphotransferasen) und ANT (Aminoglykosid-O-Nucleotidyltransferasen). Die Nomenklatur zeigt die Enzymfamilie und die Position in der Molekülstruktur, an der die Reaktion stattfindet. Die Zahl in Klammern steht für die Position in der Ringstruktur und der Apostroph definiert den Ring.

- AAC führen eine Acetylierung einer Aminogruppe durch. AAC(3) und AAC(6') sind bei *P. aeruginosa* am häufigsten vorhanden. Durch Acetylierung inaktivierte Antibiotika sind u. a. Gentamicin, Tobramycin, Netilmicin, Amikacin und Kanamycin.
- APH phosphorylieren eine Hydroxygruppe (-OH) am Aminoglykosid-Antibiotikum. APH(3') ist in den meisten *P. aeruginosa*-Stämmen intrinsisch vorhanden. Zu den von APH inaktivierten Antibiotika gehören z. B. Kanamycin, Neomycin und Streptomycin.

 ANT führen eine Adenylierung einer Hydroxygruppe durch. Die häufigste bei *P. aeruginosa* vorkommende ANT ist die ANT(2"). ANT inaktivieren Antibiotika wie Gentamicin, Streptomycin und Tobramycin (Poole, 2005; Ramirez und Tolmasky, 2010).

Neben der Modifikation der Antibiotika kann auch eine Veränderung der antibiotischen Zielstrukturen eine Aminoglykosid-Resistenz verursachen. Ribosomale Proteine oder die 16S-rRNA können mutieren oder durch rRNA-Methylasen modifiziert werden. Durch Methylierung an der Bindungsstelle der Aminoglykoside (A-Stelle der 16S-rRNA) kann die Bindung der Aminoglykoside verhindert werden, was zu einer erhöhten Resistenz gegen Antibiotika, wie Gentamicin, Tobramycin und Amikacin führt (Doi und Arakawa, 2007; Krause et al., 2016).

1.4.3 Fluorchinolon-Antibiotika

Wie die meisten Bakterien besitzt auch *P. aeruginosa* zwei Typ-2 Topoisomerasen, die Topoisomerase II (Gyrase) und die Topoisomerase IV. Beide Typ-2 Topoisomerasen sind in der Lage starke DNA-Verdrillungen zu lösen, indem sie an einem DNA-Strang einen Doppelstrangbruch erzeugen, der andere DNA-Strang durch die Lücke wandert und sie die DNA-Enden wieder verbinden. Der Doppelstrangbruch erfolgt um vier Basenpaare versetzt und mit einem 5' Überhang. Die Gyrase verhindert Torsionsspannungen, die vor Replikationsgabeln und Transkriptionskomplexen auftreten, sodass der DNA-Doppelstrang spannungsfrei gespalten werden kann. Die Hauptaufgabe der Topoisomerase IV ist die Trennung der zwei ineinandergreifenden, ringförmigen DNA-Tochterstränge am Ende der Replikation, die sogenannte Dekatenierung (Aldred et al., 2014).

Die Typ-2 Topoisomerasen sind A₂B₂-Heterotetramere. Die zwei funktionellen Untereinheiten der Gyrase sind GyrA und GyrB, die der Topoisomerase IV sind ParC und ParE. Die jeweils kodierenden Gene sind *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE*. Bei gramnegativen Bakterien stellt die Gyrase das bevorzugte Ziel dar, bei grampositiven Bakterien die Topoisomerase IV (Aldred et al., 2014; Bruchmann et al., 2013).

Fluorchinolon-Antibiotika binden nichtkovalent an die aktive Seite des Topoisomerase-DNA-Komplexes. Durch physikalische Blockierung der DNA-Doppelstrang-Enden wird die Ligation und somit die Bewegung der Topoisomerase auf der DNA verhindert. Wenn es zum Aufeinandertreffen von stabilisierten Topoisomerase II/IV-DNA-Spaltkomplexen mit Replikationsgabeln oder Transkriptionskomplexen kommt, sind permanente Doppelstrangbrüche die Folge. Fluorchinolone wirken aufgrund der Replikationshemmung in niedrigerer Konzentration bakteriostatisch, in höherer Konzentration durch Spaltung der DNA bakterizid (Aldred et al., 2014; Blondeau, 2004).

Mutationen in den kodierenden Genen für die Untereinheiten der Gyrase (*gyrA*, *gyrB*), bzw. der Topoisomerase IV (*parC*, *parE*) bilden den Hauptmechanismus von Fluorchinolon-Resistenzen bei *P. aeruginosa*. Die Genregionen, die für den Teil der Enzyme kodieren, der während der Enzymaktivität an die DNA gebunden ist, werden als QRDR (*quinolone resistance determining region*) bezeichnet (Blondeau, 2004).

Seltener können auch plasmidvermittelte Genfamilien zu Resistenzen führen. Hier sind Qnr-Proteine zu nennen, die die Bindung der Topoisomerasen an die DNA verringern und die Bildung eines Spaltkomplexes verhindern. Außerdem wurde beschrieben, dass das Protein AAC(6')-Ib-cr, eine Variante der Aminoglykosid-Acetyltransferase (mit zwei Punktmutationen), die Wirkung der Antibiotika stark verringert. Diese Mechanismen sowie die Ausschleusung mittels Effluxpumpen spielen bei der Fluorchinolon-Resistenz allerdings eine untergeordnete Rolle (Aldred et al., 2014; Poole, 2011).

1.4.4 Effluxpumpen-vermittelte Antibiotikaresistenz

Effluxpumpen sind membranassoziierte Transportproteine, die für das Bakterium potentiell toxische Substanzen aus der Zelle heraus transportieren. Bakterielle Effluxsysteme können in fünf Familien unterteilt werden: *ATP-binding-cassette* (ABC)-Transporter, *Major facilitator superfamily* (MFS), *Small multidrug resistance* (SMR)-Transporter, *Multidrug and toxic compound extrusion* (MATE)-Transporter und *Resistance-nodulation-cell division* (RND)-Transporter (Li et al., 2004). Die wichtigste Familie der Effluxpumpen in Bezug auf die Ausschleusung von antimikrobiellen Substanzen (Biozide oder Antibiotika) sind die RND-Transporter.

In klinischen *P. aeruginosa* Isolaten wurden eine Vielzahl verschiedenster RND-Effluxpumpensysteme entdeckt. Weil die vier Systeme MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN und MexXY-OprM am häufigsten mit klinischen Antibiotikaresistenzen in Verbindung gebracht werden, wird sich in dieser Arbeit auf diese Systeme beschränkt. Die von den vier Effluxpumpensystemen transportierten Antibiotika sind Tabelle 1 zu entnehmen. MexAB-OprM transportiert nicht nur eine große Anzahl Antibiotika aus der Zelle, sondern auch andere schädliche Stoffe, wie SDS (Natriumlaurylsulfat, Tensid, das u. a. in Reinigungsmitteln enthalten ist), aromatische Kohlenwasserstoffe oder Triclosan (Desinfektionsmittel) (Poole, 2001).

		· /		
	MexAB-OprM	MexCD-OprJ	MexEF-OprN	MexXY-OprM
ß-Laktam	Alle außer	Penicillin, Cefepim,	Carbaneneme	Penicillin, Cefepim,
p-Laktan	Imipenem	Meropenem	Carbaperiente	Meropenem
Fluorchinolon	ja	ja	ja	ja
Makrolid	ja	ja	nein	ja
Tetrazyklin	ja	ja	nein	ja
Chloramphenicol	ја	ja	nein	ja

Tabelle 1: Zusammenstellung der Effluxpumpen-Operons mit den jeweilig aus der Zelle transportierten Antibiotika (Bassetti et al., 2018).

RND-Transporter sind dreiteilig aufgebaut und bestehen aus einem Transportprotein an der inneren Zytoplasmamembran (RND-Bestandteil), einem kanalförmigen Protein an der äußeren Membran (*Outer membrane factor*, OMF) und einem periplasmatisch gelegenem Kanalfusionsprotein (*membrane fusion protein*, MFP). Die drei Bestandteile liegen auf einem entsprechenden Operon, nur MexXY nutzt OprM, das OMF-Gen aus dem MexAB-OprM-Operon (Housseini B Issa et al., 2018).

Die Resistenzen entstehen in der Regel durch Überexpression der Effluxsysteme aufgrund von Mutationen in den Regulatorgenen. Die wichtigsten Regulationsmechanismen der Effluxpumpen sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

MexAB-OprM ist das am besten untersuchte Effluxsystem. Im Gegensatz zu den anderen Systemen wird es dauerhaft exprimiert. Weil MexR und NaID Repressoren von MexAB-OprM sind, haben Mutationen, die ihre Bindungsaffinität herabsetzen, eine erhöhte Expression des Operons zur Folge. Bei MexCD-OprJ und MexXY-OprM liegen mit den entsprechenden Repressoren NfxB und MexZ die gleichen Mechanismen vor. Bei NfxB werden allerdings Typ A- und Typ B-Mutanten unterschieden, die unterschiedliche phänotypische Resistenzen aufweisen. Der Referenzstamm *PAO1* trägt den Wildtyp der Typ B Mutation (Masuda et al., 1996).

ArmR ist ein Antirepressor von MexR. Es bildet einen Komplex mit MexR und hemmt so die Repression des MexAB-OprM Operons (Housseini B Issa et al., 2018). NalC ist ein Repressor von *PA3720-PA3719* (ArmR). Mutationen in *nalC*, *nalD* und *mexR* können zu erhöhter Resistenz führen, wenn das entstehende Protein Defekte aufweist. CpxR zeigt expressionsinduzierende Effekte auf MexAB-OprM bei Abwesenheit von MexR (Tian et al., 2016).



Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bestandteile der vier wichtigsten RND (*Resistance-nodulation-cell division*)-Transporter-Operons in *P. aeruginosa* sowie der aktivierenden und inhibierenden Regulation durch Transkriptionsregulatoren. OMF: *Outer membrane factor*, MFP: *membrane fusion protein*. Adaptiert an Housseini B Issa, Phan und Broutin, 2018.

Die Expression von MexEF-OprN ist in der Regel durch Aktivierung von MexT reguliert. MexT induziert ebenfalls die Expression von MexS, seinem eigenen Repressor. Somit können Mutationen in MexS zu erhöhter MexT-Expression und so zu einer erhöhten Expression von MexEF-OprN und zur Resistenz führen (Bassetti et al., 2018; Fernández und Hancock, 2012).

1.4.5 Antibiotikaresistenz durch verringerte Zellmembranpermeabilität

Die geringe Permeabilität der äußeren Zellmembran von *P. aeruginosa* ist einer der wichtigsten Faktoren der Antibiotikaresistenz. Die Membranpermeabilität von *PAO1* ist ca. 100-fach geringer als die vom Laborstamm *Escherichia coli K12* (Nikaido und Yoshimura, 1982).

Kleine, hydrophile Stoffe, wie basische Aminosäuren oder Peptidverbindungen, haben die Möglichkeit über Porine in der äußeren Zellmembran in das Bakterium zu gelangen. Auf diesem Weg gelangen auch kleine Antibiotika wie Imipenem in die Zelle. Das OprD-Protein (Porin D) beinhaltet verschiedene Loop-Strukturen. Für die Bindung von Imipenem werden *Loop* 2 und 3 intakt benötigt, wohingegen *Loop* 5, 7 und 8 den OprD-Kanal verengen und so die Substratspezifität gewährleisten (Fernández und Hancock, 2012; Ochs et al., 2000). Verluste oder Änderungen im *oprD*-Gen können zu einer defekten Pore und gegebenenfalls zu einer Resistenz gegen Imipenem führen (Lister et al., 2009).

Große Antibiotika (Aminoglykoside, Colistin) hingegen binden an LPS (Lipopolysaccharide) der äußeren Membran und zerstören so die Permeabilitätsbarriere. Sie können dann aktiv in die Zelle transportiert werden. Eine Überexpression von *oprH* schützt die LPS vor Bindung und kann so eine Resistenz gegenüber Aminoglykoside oder Colistin induzieren. Dies ist allerdings nicht sehr verbreitet (Lambert, 2002).

1.5 Genom von *P. aeruginosa*

Der aus einer Wundinfektion isolierte *P. aeruginosa* Stamm *PAO1* ist als Laborstamm am weitesten verbreitet und wurde im Jahr 2000 erstmals sequenziert. Mit 6,3 Millionen Basenpaaren (Mpb) war es bis dahin das größte jemals komplett sequenzierte bakterielle Genom (Stover et al., 2000). Im selben Jahr wurde die interaktive *Pseudomonas*-Datenbank "The Pseudomonas Genome Database" entwickelt, um für bioinformatische Analysen der internationalen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung zu stehen (Croft et al., 2000).

Das Genom von *P. aeruginosa* ist mit durchschnittlich 6 – 7 Mbp eines der größten Genome humanpathogener Bakterien (Ozer et al., 2014) und hat einen durchschnittlichen Gehalt an Guanin und Cytosin (GC-Gehalt) von etwa 67 %. Das

P. aeruginosa-Genom wird häufig als mosaikartig beschrieben mit einem hochkonservierten *Core*-Genom und einem hochvariablen *Accessory*-Genom (Klockgether et al., 2011). Gene, die über horizontalen Gentransfer in das *P. aeruginosa*-Genom aufgenommen wurden, haben in der Regel einen niedrigeren GC-Gehalt. Somit hebt sich das *Accessory*-Genom durch einen GC-Gehalt von im Median 62,4 % im Vergleich zum *Core*-Genom (68,8 %) hervor (Klockgether et al., 2011; Valot et al., 2015).

1.5.1 Core-Genom

Core-Gene sind in der Regel essenziell wichtig zum Überleben des Bakteriums. Sie sind in jedem Stamm einer Spezies unabhängig von der Quelle (Klinik, Labor, Umwelt) vorhanden und bilden die kleinste Schnittmenge an Genen in einem Vergleich mehrerer Genome. In der Literatur werden viele unterschiedliche Ansätze zur Bestimmung des *Core*-Genoms von *P. aeruginosa* verfolgt. Mathee et al. definierten bei fünf analysierten Genomen 5021 Gene, die in allen Genomen zu mindestens 70 % Sequenzidentität vorhanden sind, als das *Core*-Genom (Mathee et al., 2008). Ozer et al. definierten das *Core*-Genom als die Gene, die in mindestens 90 % der Stämme vorhanden sind, um die Beeinflussung durch phylogenetisch weit entfernte Stämme zu minimieren. Sie berechneten ein *Core*-Genom von 5316 Genen bei 12 analysierten Stämmen (Ozer et al., 2014).

Auch neuere Studien mit hohen Anzahlen analysierter Stämme beschäftigen sich mit der Bestimmung einer Genanzahl, die das *Core*-Genom definiert. In Studien von Freschi et al. (n= 1315 *P. aeruginosa*-Stämme) und Poulsen et al. (n= 2560 Stämme) wurden *Core*-Genome von 665 und 321 Genen berechnet (Freschi et al., 2018b; Poulsen et al., 2019).

1.5.2 Horizontaler Gentransfer

Bakterien haben die Fähigkeit mobile genetische Elemente untereinander auf verschiedene Arten auszutauschen. Geschieht dies unabhängig von einem Vermehrungsvorgang, spricht man von horizontalem Gentransfer. Dieser Austausch ist auch zwischen sehr verschiedenen Gattungen möglich, wie zwischen gramnegativen und grampositiven Bakterien (Courvalin, 1994). Dies kann grundsätzlich durch Konjugation mittels Plasmide oder Transposons, durch Transduktion mittels Bakteriophagen, aber auch durch Transformation mittels freier DNA geschehen. Durch horizontalen Gentransfer erworbenes genetisches Material kann folglich entweder chromosomal (im *Accessory*-Genom) oder extrachromosomal (als Plasmid) vorliegen.

1.5.3 Accessory-Genom

Als *Accessory*-Genom (auch *Dispensable*-Genom) werden in komparativen Genomanalysen zusammenfassend die Gene bezeichnet, die in mindestens zwei Stämmen, jedoch nicht in allen Stämmen vorhanden sind. Gene, die in nur einem Bakteriengenom vorkommen, werden *Singletons* genannt. Das Pangenom wird aus der Gesamtheit aller Gene einer analysierten Gruppe von Genomen zusammengesetzt und bildet somit die Summe aller *Core*-Gene, *Accessory*-Gene und *Singletons* (Rouli et al., 2015).

Aufgrund des hochkonservierten *Core*-Genoms trägt das *Accessory*-Genom durch horizontalen Gentransfer zu Differenzen in der Genomgröße und zur metabolischen Diversität der Spezies bei. Die Lokalisation des *Accessory*-Genoms ist über das gesamte bakterielle Genom verteilt. Allerdings sind einige Bereiche prädisponierter für die Integration von mobilen genetischen Elementen, die Verteilung ist also nicht komplett zufällig. Diese genetischen Bereiche werden als *regions of genomic plasticity* (RGP) bezeichnet. Die konservierten ORFs (*open reading frame*), welche ein RGP begrenzen, werden *Anchors* genannt und stellen die genomische Bindungsstelle zur Integration der fremden DNA dar (Freschi et al., 2018a; Klockgether et al., 2011).

Ist der Bereich des RGP größer als 10 kbp (Kilobasenpaare), wird er als "genomische Insel" (*genomic island*), kleinere Bereiche werden als "genomisches Inselchen" (*genomic islet*) definiert. Es gibt Geninseln, die vermehrt mit metabolischen Genen, Resistenzgenen, Fitnessgenen oder Virulenzgenen in Verbindung stehen (Juhas et al., 2009).

1.5.3.1 *Replacement Islands*

Replacement Islands enthalten Gencluster für Virulenzfaktoren, die einen wichtigen Einfluss auf die Fitness von *P. aeruginosa* haben. Sie werden durch homologe Rekombination erworben und sind in fast allen Stämmen einer Spezies konserviert. Die vier *Replacement Islands* in *P. aeruginosa* sind das Flagellin-Glykosylierungs-Gencluster (13.063 bp), das Pilin-Gencluster (3.431 bp), das Pyoverdinsynthese-Cluster (Länge: 46.098 bp) und das O-Antigen-Cluster (16.762 bp) (Klockgether et al., 2011; Kung et al., 2010).

1.5.3.2 Prophagen und Bakteriophagen

Als Bakteriophagen (Phagen) werden Viren bezeichnet, deren natürlicher Wirt Bakterien sind. Transduktion ist der Vorgang der Übertragung des Phagengenoms in das bakterielle Genom. Bakteriophagen können virulent oder temperent sein. Virulente Phagen leiten nach Expression des Virusgenoms und der Herstellung neuer Virionen die

Lyse der Wirtszelle ein (lytischer Zyklus, allgemeine Transduktion). Temperente Phagen treten hingegen in den lysogenen Zyklus ein. Das Phagengenom wird mittels ortsspezifischer Rekombinase in das bakterielle Wirtsgenom eingebaut, ohne die Wirtszelle zu lysieren (spezielle Transduktion) (Kung et al., 2010).

Das eingebaute Phagengenom wird als Prophage bezeichnet. Es kann u. a. mutieren oder rekombinieren und so nicht nur den Genotypen, sondern auch den Phänotypen des Bakteriums stark beeinflussen.

In Genomen von *P. aeruginosa* Stämmen kann eine Vielzahl von phagenähnlichen genetischen Elementen gefunden werden, die vollständig oder unvollständig sein können. Ein besonderes Augenmerk liegt hier auf Phagen der Familie der *Inoviridae*. Diese Viren besitzen einzelsträngige DNA und werden aufgrund der filamentösen Morphologie auch als filamentöse Phagen (Pf) bezeichnet. Diesen temperenten Phagen, insbesondere die häufigen Pf1-*like* Phagen, wird eine wichtige Rolle in der Virulenz in akuten Lungeninfektionen zugeschrieben. Sie können die Biofilmproduktion und die Entwicklung von *small colony variants* (SCV) beeinflussen (Burgener et al., 2019; Knezevic et al., 2015).

1.5.3.3 Transposons, Insertionssequenzen und Integrons

Transposons sind mobile genetische Elemente, die ihre Position innerhalb des Chromosoms ändern können, auf ein Plasmid übertragen werden und auch von einem Plasmid in das bakterielle Genom aufgenommen werden können. Die kleinsten Transposons werden als Insertionssequenz-(IS)-Elemente bezeichnet. Diese transponierbaren Elemente enthalten Gene für das Enzym Transposase, die die Transposition durch Bindung an sich wiederholende Sequenzen (*inverted repeats*, etwa 15 – 40 bp) an den Rändern des IS-Elements vermittelt. Zusammengesetzte Transposons bestehen aus zwei IS-Elementen, die einen DNA-Bereich flankieren, der z. B. Antibiotikaresistenzgene beinhalten kann. Beispielsweise wurde das *Tn3-like* Transposon *Tn4401* in einem hochresistenten *P. aeruginosa* Stamm als Träger des β -Laktamasegens *blaKPC-2* identifiziert (Kung et al., 2010; Livermore, 2003).

Die bei gramnegativen Bakterien weit verbreiteten Integrons befinden sich zum größten Teil auf Plasmiden oder Transposons. Integrons enthalten ein ortsspezifisches Rekombinationssystem, das ihnen ermöglicht, spezifische DNA-Bereiche aus einem Chromosom oder Plasmid zu integrieren und selbstständig zu duplizieren, bzw. zu exprimieren. Die integrierten DNA-Bereiche werden als Genkassetten bezeichnet (Kahlon, 2016).

Ein Integron wird aus drei genetischen Elementen gebildet, dem Gen *intl*, der Rekombinationsstelle *attl* sowie dem Promotor (P_c). Das Gen *intl* kodiert für eine Tyrosin-

Rekombinase (Integrase), die für die ortsspezifische Rekombination im Integron zuständig ist. Diese Integrase erkennt die angrenzende Rekombinationsstelle *attl*. Der oberhalb der Integrationsstelle liegende Promotor (P_c) ist essentiell für eine effektive Transkription und Expression der Genkassette, die sich im Integron befindet (Domingues et al., 2012; Klockgether et al., 2011). Integrons wurden in *P. aeruginosa* häufig als Träger von Resistenzgenen für Proteine wie β -Laktamasen oder Aminoglykosid-N-Acetyltransferasen identifiziert (Kung et al., 2010).

1.5.4 Plasmide

Plasmide ringförmige, doppelsträngige die sind kurze. DNA-Fragmente, extrachromosomal in der Bakterienzelle vorliegen. Plasmide können sich selbst replizieren und über Konjugation auf andere Bakterien übertragen werden. Durch Plasmide übertragene Gene können dem Bakterium durch Beeinflussung des Metabolismus, der Virulenz oder Antibiotikaresistenz Vorteile bieten, aber auch durch physiologische Änderungen zu Fitnessreduzierungen führen. Die Konjugation zwischen einem Spender- (Donor) Bakterium und einem Empfänger (Rezipient) verläuft gerichtet über ausgebildete Zellfortsätze (Sexpili). In P. aeruginosa wurde gezeigt, dass das Vorhandensein eines Plasmides der IncP Gruppe mit erhöhter Antibiotikaresistenz korreliert werden kann. Plasmidgene sind häufig in anderen mobilen genetischen Elementen wie Transposons oder Integrons eingebettet (Bi et al., 2016; San Millan et al., 2018). Für P. aeruginosa wurden Plasmide mit Größen zwischen ca. 1 und 500 kbp veröffentlicht (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/plasmids/187).

1.5.4.1 Integrative und konjugative Elemente (ICE)

Als ICE (*integrative and conjugative elements*) oder konjugative Transposons werden mobile genetische Elemente bezeichnet, die Eigenschaften von Plasmiden und Bakteriophagen verbinden. Zum einen können sie wie konjugative Plasmide extrachromosomale genetische Elemente über Konjugation an andere Zellen weitergeben, zum anderen wie Bakteriophagen die genetische Information in das Bakteriengenom integrieren und replizieren (Johnson und Grossman, 2016).

In *P. aeruginosa* Klon C-Stämmen wurde das Plasmid pKLC102 erstmals identifiziert, das zugleich als Plasmid und als genomische Insel im Chromosom nachzuweisen war. Die Insertion geschah durch einen phagenähnlichen Mechanismus in ein *tRNA^{Lys}*-Gen in der Nähe des *pilA*-Gens (Klockgether et al., 2004). ICE der pKLC102-Familie sind sehr verbreitet und wurden in verschiedenen bakteriellen Spezies und Gattungen identifiziert. Neben sehr individuellen DNA-Blöcken sind ein Teil der Gene der pKLC102-

ICE hochkonserviert. Die konservierten Gene sind für strukturelle und mobilisierende Eigenschaften wie der Konjugation zuständig. Die individuellen Gene können für diverse Stoffwechselwege und Virulenzfaktoren kodieren (Klockgether et al., 2011). Die mobile genomische Insel pKLC102 war die erste, die bei *P. aeruginosa* entdeckt wurde und zeichnet sich durch eine hohe spontane Mobilisationsfrequenz von ca. 10 % aus (Kung et al., 2010).

Wichtige pKLC102-verwandte Geninseln, die mit erhöhter Pathogenität assoziiert sind, sind PAPI-1 (*Pseudomonas aeruginosa pathogenicity island-1*) und PAPI-2. Diese Geninseln wurden im Referenzstamm *UCBPP-PA14*, nicht aber in *PAO1* identifiziert und haben eine erhöhte Virulenz in vielen Infektionsmodellen gezeigt.

PAPI-1 ist etwa 108 kbp groß und kodiert für viele Gene, die mit einer erhöhten Virulenz in Verbindung gebracht werden können. Ein Beispiel ist ein komplettes Gencluster für Typ-IV Pili (Kukavica-Ibrulj et al., 2008).

PAPI-2 ist mit 11 kbp eine kleinere genomische Insel, die sich durch einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 56,4 % stark vom bakteriellen Chromosom unterscheidet (Kahlon, 2016). Das Exoenzym ExoU ist beispielsweise auf PAPI-2 kodiert (Harrison et al., 2010).

Weitere ICEs der pKLC102-Familie sind, neben PAPI-1, PAPI-2 und pKLC102 selbst, PAGI-4 (*Pseudomonas aeruginosa genomic island-4*) und PAGI-5 (Kung et al., 2010).

2 Zielsetzung der Arbeit

P. aeruginosa ist ein vielseitiges, opportunistisches Bakterium, das verschiedene Infektionserkrankungen in Menschen, Tieren und Pflanzen verursachen kann. Insbesondere bei nosokomialen Infektionen und bei Patienten mit Mukoviszidose (CF) spielt P. aeruginosa eine zentrale Rolle. Eine von P. aeruginosa ausgelöste ambulant erworbene Pneumonie (CAP) ist zwar seltener, kann allerdings zu schweren Verläufen mit hoher Mortalität führen. Das Umweltbakterium P. aeruginosa besitzt eine große metabolische Variabilität und eine hohe Anpassungsfähigkeit. Der Großteil der Lungen von CF-Patienten wird im Laufe des Patientenlebens mit P. aeruginosa besiedelt. Durch unterschiedliche Anpassungsmechanismen, Veränderungen auf Genomund phänotypischer Ebene können P. aeruginosa-Stämme chronisch in der Lunge von CF-Patienten persistieren. Durch lange, antibiotische Behandlungen sind die Stämme einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt, was die Bildung von Antibiotikaresistenzen fördert. Die Kombination vieler Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzmechanismen kann zu schweren und schwierig zu behandelnden Infektionen mit chronischen oder akuten Verläufen und häufig schlechten Prognosen führen.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine komparative Phänotypen- und Genomanalyse von insgesamt 92 *P. aeruginosa*-Stämmen von CAP- und CF-Patienten durchzuführen. Der Vergleich der 53 Isolate von Patienten mit akuter CAP und der 39 Isolate von Patienten mit chronischer CF soll dabei Anpassungsmechanismen der Bakterien auf die unterschiedlichen ökologischen Nischen dieser beiden Erkrankungen darstellen.

Bei der vergleichenden Analyse werden folgende Schwerpunkte gesetzt:

Bei den phänotypischen Vergleichen der CAP- und CF-Stämme sollen Unterschiede in der Koloniemorphologie und Antibiotikaresistenz ermittelt werden. Auf Genomebene sollen die Populationsstrukturen der CAP- und CF-Stämme in Bezug auf die Multilokus-Sequenztypen, Serotypen und Virulenzfaktoren sowie die Zusammensetzung des Pangenoms und putative funktionale Differenzen näher analysiert werde. Ein weiterer Fokus liegt auf Genen, die durch horizontalen Gentransfer erworben worden sind, und auf der Vorhersage phänotypischer Antibiotikaresistenzen aus Genomdaten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2 und die verwendeten Verbrauchsmaterialien in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Geräte mit Modellbezeichnung und Hersteller.

Gerät / Modell	Hersteller, Firmensitz
Kapillarelektrophorese / Fragment Analyzer	Advanced Analytical, Heidelberg
Kapillarelektrophorese / Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
PCR-Gerät / StepOnePlus	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikro-Plattenzentrifuge / PlateFuge	Benchmark Scientific, Sayreville, USA
Densitometer / DensiCHEK plus	BioMeriéux Deutschland GmbH, Nürtingen
MALDI-TOF Massenspektrometrie / VITEK MS	BioMeriéux Deutschland GmbH, Nürtingen
Antibiotikaempfindlichkeitsprüfgerät / VITEK-2	BioMeriéux Deutschland GmbH, Nürtingen
Pipette / Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge / Centrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette / PIPETMAN Classic	Gilson, Middleton, USA
Pipettierroboter / Microlab Star Let (bis DNA-Extraktion)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Pipettierroboter / Microlab Star (nach DNA-Extraktion)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Brutschrank / B 6060	Heraeus, Hanau
Sicherheitswerkbank (Sterilwerkbank) / Herasafe HS 15	Heraeus, Hanau
Zentrifuge / Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau
Plattenvortexer / MS 3 digital	IKA, Staufen im Breisgau
Sequenziergerät / NextSeq 550	Illumina, San Diego, USA
Präzisionswaage / EG 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasseraufbereitungssystem / Milli-Q Direct 8	Merck KGaA, Darmstadt
Kühlschrank (-20°C) / Economic Super	Robert Bosch GmbH, Gerlingen
Kühlschrank (+4°C) / KSV36VW30 Serie 4	Robert Bosch GmbH, Gerlingen
Vortexer / Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Mikrotiterplattenphotometer / UV VIS infinite M 200	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
PRO NanoQuant	
Tiefkühllagerschrank (-80°C) / Herafreeze HFU T Serie	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Tischautoklav / 2540 EL N	Tuttnauer Systec, Linden
Inkubationsschüttler / Professional 3500	VWR, Radnor, USA
Mikrozentrifuge / Mini Star	VWR, Radnor, USA

Tabelle 3: Verwendetes Verbrauchsmaterial mit Modellbezeichnung und Hersteller.

Verbrauchsmaterial / Modell	Hersteller, Firmensitz
Kunststofffolie / MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, USA
Antibiotikaempfindlichkeitsprüfkarten / AST N-248	BioMeriéux Deutschland GmbH, Nürtingen
DNA-Lagerplatte / 96-Well Hard-Shell Plates, low profile,	BioRad, Hercules, USA
200 μΙ	
1,9 ml Tubes mit Außengewinde (Barcode) / FluidX	Brooks Life Sciences, Chelmsford, USA
Robotic- Pipettenspitzen / CO-RE Tips	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Epsilometer-Test-Streifen / MIC Test Strip (PIP, TZP, CAZ,	Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italien
FEP, ATM, IMI, MRP, AK, CN, TOB, CIP)	
1,4 ml Tubes mit Innengewinde (Barcode)	MICRONIC, Lelystad, Niederlande
Pipettenspitzen (np PREMIUM BIO)	nerbe plus GmbH, Winsen (Luhe)
Mikrotiterplatte / 96- Well Round Bottom DeepWell Block,	Qiagen, Hilden
2 ml	
Impfschlinge / 1 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Impfschlinge / 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte / Abgene 96- Well Storage Plates 800 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PCR Platten für Robotic / Abgene SuperPlate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
96-Well PCR Plates	
Mikrotiterplatte / 96- Well U- (Round-) Bottom Plate, 340 ul	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.1.2 Bakterienstämme

Für diese Arbeit wurden insgesamt 122 Bakterienisolate der Spezies *P. aeruginosa* genutzt. 74 davon wurden von der CAPNETZ Stiftung (https://www.capnetz.de/ (Welte et al., 2004)) zur Verfügung gestellt. Diese von CAP-Patienten isolierten Bakterienstämme wurden in dieser Arbeit "*PAE_00--*" benannt. Weitere 48 Proben wurden aus Proben von Mukoviszidose (CF)-Patienten in der Universität Heidelberg isoliert und ebenfalls für Analysen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden diese Stämme "*PACF_----*" genannt. Die Identifizierung als *P. aeruginosa* erfolgte im Vorhinein durch die mikrobiologischen Labore der mit der CAPNETZ Stiftung kooperierenden Krankenhäuser sowie des Universitätsklinikums Heidelberg.

CAP-Stämme

Den an ambulant erworbener Lungenentzündung (CAP) erkrankten Patienten wurden nach Patientenzustimmung Sekrete aus Rachenabstrich und Sputum sowie Blutproben entnommen. Fakultativ wurde auch Rachenspülwasser, Trachealsekret, BAL (Broncho-Alveoläre Lavage) oder Urin entnommen. Die pseudonymisierten Proben wurden an krankenhausinterne mikrobiologische Labore geschickt, die den pathogenen Erreger identifizierten und isolierten. Die bakteriellen Isolate wurden zwischen 2002 und 2016 gesammelt. Als Lagerung der Bakterienisolate wurde das "Cryobank System" (MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld) genutzt. Die Möglichkeit der automatisierten Laborprozessierung mittels Pipettierroboter besteht allerdings in diesen Formaten nicht, sodass die Anzucht der Bakterien in 1,4 ml-*Tubes* mit Innengewinde (Micronic, Lelystad, Niederlande) erfolgte (siehe 3.2.1).

CF-Stämme

Die Stämme wurden vom Zentrum für Infektiologie, Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die Bakterienisolate wurden zwischen 2014 und 2018 aus Lungen von CF-Patienten gewonnen. Der Transport zur JLU-Gießen geschah mithilfe von "Stabs". "Stabs" werden hergestellt, indem LB-Agar (1,5 %) in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg) gefüllt wird, dieser angeimpft und etwa 12 h inkubiert wird. Dann konnten die Isolate bei 4 °C gelagert werden.

Die CF-Stämme wurden von den "*Stabs*" auf Columbia-Blutagarplatten ausgestrichen und von den Platten aus weiterprozessiert.

3.1.3 Referenzstämme

Die Auswahl der Referenzstämme fiel auf *PAO1*, *DK2*, *LESB58*, *NCGM2.S1*, *PA7* und *UCBPP-PA14*. Durch diese in der Wissenschaft häufig genutzten Referenzstämme lassen sich die Analysen in dieser Arbeit besser einordnen, bzw. mit aktuellen Publikationen vergleichen. Die Referenzstämme sind phylogenetisch weit verbreitet, zur morphologischen Beurteilung und phänotypischen Resistenztestung lag der Referenzstamme *PAO1* aus der hauseigenen Stammsammlung vor. Die anderen Stämme wurden nur in den bioinformatischen Analysen genutzt. Eine Übersicht über die Charakteristiken der genutzten Referenzstämme liefert Tabelle 4.

Stamm	Isolationsherkunft	Besonderheiten	Accession number	Genomgröße in bp	Referenz
PAO1	Wundinfektion, Australien	Erstes komplett sequenziertes <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Genom, am weitesten verbreiteter Labor- und	NC_002516	6.264.404	[1]
UCBPP-PA14	Brandwundinfektion	Hochvirulenter Stamm in Pflanzen und Tieren	NC_008463	6.537.648	[2]
DK2	CF, Dänemark	Unterlief vielen phänotypischen Anpassungen an die CF-Lunge, wie stark verlangsamtes Wachstum, erheblicher Verlust von katabolischer Aktivität und und Beweglichkeit sowie die Inaktivierung wichtiger Regulationsfunktionen	NC_018080	6.402.658	[3]
LESB58	CF, Großbritannien	Stärkere Biofilmbildung, als PAO1 und UCBPP-PA14, jedoch weniger beweglich	NC_011770	6.601.757	[4]
NCGM2.S1	UTI, Japan	Multiresistenter Stamm, hohe Resistenzen gegen Carbapeneme, Amikacin und Fluorchinolone	NC_017549	6.764.661	[5]
PA7	Klinik, nicht respiratorisch, Argentinien	Multiresistent, phylogenetischer Ausreißer	NC_009656	6.588.339	[6]

Tabelle 4: Liste der genutzten Referenzstämme mit zusätzlichen Informationen.

CF= Mukoviszidose (engl.: *cystic fibrosis*), UTI= Harnwegsinfektionen (engl.: *urinary tract infections*), Referenzen: [1] Stover et al., 2000, [2] Rahme et al., 1995, [3] Yang et al., 2011, [4] Kukavica-Ibrulj et al., 2008, [5] Miyoshi-Akiyama et al., 2011, [6] Roy et al., 2010.

3.1.4 Nährmedien

Zur Herstellung des TSB-Flüssigmediums (engl.: *"Tryptic Soy Broth*", deutsch: *"*Soja-Casein-Pepton") wurde 30 g des Nährboden-Pulvers (Zusammensetzung in Tabelle 5) in 1 l Reinstwasser (aufbereitet durch Milli-Q Direct 8, Merck) gelöst und nach Herstellerangaben 15 Minuten lang bei 121 °C autoklaviert (Tischautoklav 2540 EL N, Tuttnauer Systec).

Tabelle 5: Für die Kultivierung verwendetes Flüssigmedium mit Zusammensetzung und Hersteller.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge / I (H ₂ O)	Hersteller, Firmensitz
TSB ("Tryptic Soy Broth")	Trypton	17 g	Merck KGaA, Darmstadt
	Soyton	3 g	
	NaCl	5 g	
	Glukose	2,5 g	
	KH2PO4	2,5 g	
Die in dieser Arbeit verwendeten festen Nährmedien sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Für diese Arbeit verwendete feste Nährmedien (Agarplatten) mit Hersteller und Firmensitz.

Agar / Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Columbia-Blutagar / Columbia Agar mit Schafblut PLUS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
(5 % Schafblut)	
MacConkey-Agar / MacConkey-Nährboden Nr. 3	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Müller-Hinton-Agar / Mueller-Hinton-Agar (ohne Zusatz)) Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

3.1.5 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 7 mit der entsprechenden Methode aufgeführt.

Methode	Kit	Hersteller, Firmensitz
DNA-Extraktion	Genomic DNA from tissue (adaptiert an die Hamilton-Robotic)	Macherey Nagel, Düren
DNA-Quantifizierung	Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Library-Preparation	Nextera XT DNA Library Preparation Kit	Illumina, San Diego, USA
Library-Quantifizierung (einzeln)	Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit (DNF-473)	Advanced Analytical, Heidelberg
Library-Quantifizierung (Pool)	High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

 Tabelle 7: Verwendete Kits verschiedener Methoden mit Hersteller und Firmensitz.

3.2 Methoden (Labor)

3.2.1 Kultivierung von *P. aeruginosa*-Stämmen

Für eine kontinuierliche und reproduzierbare Prozessierung der bakteriellen Stämme wurde der Pipettierroboter "Microlab Star Let" (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) genutzt. Die meisten automatisierten Arbeitsschritte führt der Roboter im 96er Format durch (8 x 12 *Wells* in einer Platte oder 1 *Tube-Rack* (8 x 12 1,4 ml-*Tubes* mit Innengewinde, Micronic, Lelystad, Niederlande). Mittels des Pipettierroboters wurden 750 µl TSB-(Tryptic Soy Broth) Mediums in die *Tubes* gefüllt. Dabei wurden die *Tubes* spaltenweise durch den "LabElite DeCapper" (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) geöffnet, befüllt und automatisch wieder verschlossen. Die Entwicklung des einheitlichen Arbeitsablaufes und die Programmierung der Laborrobotic wurde in Zusammenarbeit mit Jan-Philipp Mengel aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (JLU) entwickelt.

Für das Animpfen der Bakterienkulturen der CAP-Stämme musste ein Cryo-*Bead* mittels autoklavierter Pipettenspitze (Rainin/Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz) aus einem *Tube* des "Cryobank Systems" in ein mit TSB-Medium befülltes 1,4 ml-*Tube* (Micronic) überführt werden. Dieser Arbeitsschritt wurde für jedes *Tube* einzeln und manuell

durchgeführt, um das Kontaminationsrisiko auf ein Minimum zu reduzieren. Für das Animpfen der CF-Stämme wurden die *"Stabs"* auf Blutagarplatten ausgestrichen, 24 Stunden lang bei 37 °C im Brutschrank (Serie BD, Heraeus, Hanau) inkubiert und nach Reinheitsüberprüfung eine Einzelkolonie mittels Einmalimpföse im TSB-Medium des 1,4 ml-*Tubes* (Micronic) gelöst. Die Inkubation der *Racks* mit bis zu 96 der 1,4 ml-*Tubes* fand über Nacht (20 Stunden) bei 37 °C im Inkubationsschüttler statt und die Durchmischung wurde durch einen Plattenvortexer bei 800 min-¹ / RPM durchgeführt. Alle Arbeitsschritte mit offenen bakteriellen Kulturen (Cryo-Kulturen, *"Stabs"*, Agarplatten, angeimpfte *Tubes*) wurden zum Schutz der Kulturen unter der Sicherheitswerkbank (Herasafe HS 15, Heraeus, Hanau) vorgenommen.

3.2.2 Phänotypische Beurteilung

Die analysierten *P. aeruginosa*-Stämme wurden auf Columbia-Blutagar ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Während der Beurteilung der CAP-Stämme auf Blutagar kam bei einzelnen Stämmen der Verdacht einer Mischkultur auf, deshalb wurden die CAP-Stämme zusätzlich auf MacConkey-Agar ausgestrichen. Die morphologische Beurteilung der Bakterienkolonien nach den Kategorien "Koloniegröße", "Kolonierand", "Oberflächenstruktur", "metallischer Glanz" und "hämolytisches Verhalten" erfolgte unter einheitlichen Bedingungen.

3.2.3 Messung des Bakterienwachstums anhand der optischen Dichte

Die quantitative Messung des Bakterienwachstums wurde über eine Messung der optischen Dichte (OD) vorgenommen. Dafür wurden je 290 µl der Bakterienkultur aus den 1,4 ml Innengewinde-*Tubes* (Micronic) in ein *Well* einer 96 *Well round (U)-Bottom plate* (TPP Trasadingen, Schweiz) übertragen. Die restlichen 460 µl Bakterienkultur in den 1,4 ml-*Tubes* wurden für die Herstellung der Glycerinkulturen verwendet.

Die OD-Messung erfolgte mit einem Mikrotiterplattenphotometer (infinite m200, Tecan Austria GmbH, Salzburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm.

Nach der Messung der optischen Dichte wurde die 290 µl Übernachtkultur mit der Plattenzentrifuge (Multifuge 3 L-R, Heraeus, Hanau) bei 2254 x g (RCF) für 5 min zu einem Zellpellet herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pipettierroboter abgenommen und die Pellets bis zur DNA-Extraktion bei -20 °C eingefroren.

3.2.4 MALDI-TOF Analyse

Zur genauen Identifizierung der auf Blutagar ausgestrichenen Bakterienstämme wurde die MALDI-TOF (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*) Analyse genutzt. Für diese massenspektrometrische Analyse wurden kleinste Mengen der Bakterienkultur mit einem autoklavierten Zahnstocher auf einen Probenträger (VITEK MS Target, bioMérieux, Nürtingen) verstrichen und daraufhin 1 µl der Matrix-Lösung (VITEK MS CHCA, α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure, bioMérieux) auf den Probenträger pipettiert. Die Probe kristallisierte daraufhin aus und wurde im MALDI-TOF-Gerät (VITEK MS, bioMérieux) durch einen Laser ionisiert. Dabei wurden die Ionen unter Vakuum in einem elektrischen Feld beschleunigt und anhand der Flugzeit das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) bestimmt. Die ermittelten Daten wurden mit Datenbanken abgeglichen und ermöglichten eine schnelle Identifizierung. Auf die Ergebnisse der Massenspektrometrie wurde mittels der "Myla"-Software (bioMérieux) zugegriffen.

3.2.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen von *Pseudomonas*wirksamen Antibiotika

Für die 53 CAP- und 39 CF-Stämme sowie für den Referenzstamm *PAO1* wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) der therapierelevantesten, antipseudomonalen Antibiotika bestimmt. Die Resistenztestung erfolgte durch das VITEK-2 System (bioMérieux) und der Testkarte AST-N248 (bioMérieux) für gramnegative Stäbchen.

Die Anzucht der Stämme für die Resistenztestung wurde erneut auf Columbia-Blutagar für 24 Stunden bei 37 °C vorgenommen. Für die Herstellung einer Suspension wurden für jeden Stamm 1,5 ml einer sterilen 0,45 %-igen NaCl-Lösung in ein 5 ml Kunststoff-Reaktionsgefäßen (Sarsted, Nümbrecht) gefüllt. Die Übertragung der Bakterienkultur von der Agarplatte in die NaCl-Lösung erfolgte mit autoklavierten Wattestäbchen. Durch kurzes Vortexen (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, USA) wurde die Bakteriensuspension gemischt und die Trübung durch das Densitometer (DensiCHEK, bioMérieux) bei 580 nm gemessen. Bei einem McFarland-Standard zwischen 0,5 und 0,63 (bei mukoidem Phänotyp: 1,0) wurde die Bakteriensuspension mit der AST-Karte zur Testung in das VITEK-2 Gerät eingeführt. Auf die ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen konnte durch die "Myla"-Software (bioMérieux) zugegriffen werden.

Einige Stämme (in Tabelle 11 und Tabelle 12 mit einem "E" markiert) konnten aufgrund eines zu langsamen Wachstums oder eines mukoiden Phänotypen in der VITEK-2-Analyse kein ausreichendes Wachstum erreichen, was zu einem Abbruch der Analyse führte. Für diese Stämme wurde für die Messung der minimalen Hemmkonzentrationen aller getesteten Antibiotika (außer Colistin) ein Epsilometertest (E-Test) durchgeführt. Dafür wurden zur VITEK-2-Methode identische Bakteriensuspensionen hergestellt. Durch flächendeckendes Ausstreichen mit autoklavierten Wattestäbchen wurde ein Bakterienrasen auf Müller-Hinton-Agar hergestellt und zwei E-Test-Streifen (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italien) auf einer Agarplatte platziert. Die Agarplatten wurden für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und die MHKs anschließend manuell abgelesen. Die Auswertung und Interpretation der MHKs erfolgte nach den EUCAST-Richtlinien für Pseudomonaden (Tabelle 8, EUCAST, Version 9.0, vom 01.01.2019).

interpretatio	rissianuarus iur P	seudomonas spp (EOC		2019).	
Klasse	Antibiotikum	Antibiotika- Konzentrationsstufen auf Resistenzkarte AST-N248	Konzentrationsbereich der E-Test-Streifen in	MHK- Inte in r	rpretation ng/l
		in mg/l (VITEK-2)	mg/l	S≤	R >
	Piperacillin	4; 16; 32; 64	0,016 - 256	16	16
	Piperacillin/Tazobactam	2/4; 8/4; 24/4; 32/4; 32/8; 48/8	0,016 - 256	16	16
3-Laktam	Ceftazidim	1; 2; 8; 32	0,016 - 256	8	8
p-∟aktain Antibiotika	Cefepim	2; 8; 16; 32	0,016 - 256	8	8
Antibiotika	Aztreonam	2; 8; 32	0,064 - 1024	16	16
	Imipenem	1; 2; 6; 12	0,002 - 32	4	4
	Meropenem	0,5; 2; 6; 12	0,016 - 256	2	8
	Amikacin	8; 16; 64	0,016 - 256	8	16
Aminoglykosid	Gentamicin	4; 16; 32	0,064 - 1024	4	4
	Tobramycin	8; 16; 64	0,064 - 1024	4	4
Fluorchinolon	Ciprofloxacin	0,5; 2; 4	0,002 - 32	0,5	0,5
Polymyxin	Colistin	4 16 32	-	2	2

Tabelle 8: Überblick der Antibiotikakonzentrationsbereiche der Testkarte AST-N248 (bioMérieux), der Konzentrationsbereiche der E-Test-Streifen (Liofilchem) und die Interpretationsstandards für *Pseudomonas spp* (EUCAST, Version 9.0, 2019).

3.2.6 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem "NuceloMag Tissue"-Kit (Macherey Nagel, Düren), welches an den Microlab Star LET 8 (Hamilton) angepasst wurde. Für die Lyse der Zellen wurden 8 µl Proteinase K-Suspension sowie 65 µl Lysis-Puffer (T1) auf das Zellpellet pipettiert und das Pellet darin resuspendiert. Die Lyse wurde über Nacht (14 h) bei 56 °C und 400 RPM auf einem Plattenvortexer inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Lysat für 8 min bei 2254 x g zentrifugiert. In jedes *Well* einer *96-Well storage plate* (800 µl Volumen) wurden 8 µl magnetischer *Bead*-Suspension und 120 µl Bindepuffer (*binding-buffer*, MB2) vorgelegt. Daraufhin wurden 70 µl des Lysats in das entsprechende *Well* gegeben. Die Durchmischung fand auf dem *Heater Shaker* (Hamilton) mit *Deep-Well*-Adapter des Pipettierroboters bei 1200 RPM und 2,5 mm Schüttelradius für 120 Sekunden statt.

Der *96-Well-*Block wurde auf den Magneten umgelagert und die Proben für 60 Sekunden magnetisch separiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Daraufhin folgte der erste Waschschritt. Der sich wieder auf dem *Heater Shaker* befindliche Block wurde mit 200 µl des Waschpuffer 3 (WB3) durchmischt (siehe MB2) und der Überstand nach Transport auf den Magneten entfernt. Der nächste Waschschritt mit WB4 erfolgte identisch. Bei dem letzten Waschvorgang wurde mit 300 µl des WB5 gewaschen, der Block verblieb währenddessen auf dem Magneten. Zur Lösung der DNA von den *Beads*

wurde 50 µl Eluierungspuffer (*elution buffer*) zugegeben und auf dem *Heater Shaker* bei 56 °C, 1200 RPM und 2,5 mm Schüttelradius für 120 Sekunden geschüttelt. Nach anschließender, zweiminütiger, magnetischer Separation wurde der 50 µl Überstand abgenommen und die gelöste DNA in eine 96-*Well Hard Shell Plate* (BioRad, Hercules, USA) pipettiert.

3.2.7 DNA-Quantifizierung

Die Konzentration der DNA wurde mit dem fluoreszenzbasierenden "Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit" (Invitrogen, Carlsbad, USA) gemessen. Der PicoGreen Fluoreszenzfarbstoff wird 1:200 mit TE-Puffer verdünnt (15 µl Farbstoff + 2985 µl Puffer) und je 25 µl in jedes *Well* einer "96-*Well* Hard Shell PCR Plate" (BioRad, Hercules, USA) vorgelegt. Je nach erwarteter Konzentration können 1 – 5 µl extrahierter DNA zur Messung genutzt werden. In diesem Fall wurden 4 µl DNA mit 21 µl TE-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. In Spalte 1-11 der 96-*Well*-Platte wurden die 25 µl verdünnte DNA zugegeben. In die letzte Spalte werden 25 µl der Standards (λ -DNA Standards 1-8, Invitrogen) pipettiert. Die *Hard Shell Plate* wird mit der "MicroAmp-Optical Adhesive Film" (Applied Biosystems, Foster City, USA) beklebt und für die Fluoreszenzmessung in das "StepOnePlus Real-Time PCR" Gerät (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) eingebracht. Diese misst die Fluoreszenz in drei Zyklen, errechnet den Mittelwert und bestimmt die DNA-Konzentration anhand der Standards.

3.2.8 Herstellung von Glycerinkulturen

Die zur Langzeitlagerung der Bakterienstämme genutzten Glycerinkulturen wurden für die JLU Gießen in den 1,4 ml-*Tubes* (Micronic) und für die CAPNETZ Stiftung in mit Barcodes versehene 1,9 ml-*Tubes* mit Außengewinde (FluidX, Brooks Life Sciences, Chelmsford, USA) erstellt.

Die Anzucht der Bakterienkulturen für die Glycerinkulturen der CAPNETZ Stiftung wurde in den 2 ml *Wells* eines 96-*Well Round Bottom* Block (*Deep-Well* Block), Qiagen, Hilden durchgeführt. Zuvor wurde 1 ml TSB-Medium in jedes *Well* vorgelegt. Angeimpft wurde der *Deep-Well* Block mit 10 µl der in den 1,4 ml-*Tubes* verbliebenden Bakterienkulturen (siehe 3.2.3). Die Inkubation fand 18 Stunden lang bei 37 °C statt. Daraufhin wurde den Kulturen im *Deep-Well* Block 500 µl Glycerin und den Kulturen in den 1,4 ml-*Tubes* 225 µl Glycerin zugegeben, um ein finales Verhältnis von 33 % Glycerin zu erreichen. Die Glycerinkultur wurde aus dem *Deep-Well* Block in die 1,9 ml-*Tubes* mit Außengewinde (FluidX) pipettiert. Alle Glycerinkulturen wurden durch flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C im Tiefkühllagerschrank (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gelagert.

3.2.9 Library-Preparation

Die *Library-Preparation* (Herstellung der Sequenzierbibliothek) wurde mit dem "Nextera XT DNA Library Preparation Kit" (Illumina, San Diego, USA) durchgeführt. Vor der *Library Preparation* wurde die isolierte DNA auf 0,2 ng / µl in einem Gesamtvolumen von 5 µl in nukleasefreiem Wasser (aufbereitet in der Milli-Q Direct 8-Anlage) verdünnt.

Der erste Schritt der *Library-Preparation* war die *"tagmentation"*, welcher die DNA-Fragmentierung (*"fragmentation"*) und die Adapter-Ligation (*tag*) vereinte. Für die Amplifizierung (Vervielfältigung) der *tagmentierten* DNA wurde folgendes PCR (Polymerasekettenreaktion)-Protokoll verwendet:

Die *tagmentierte* DNA wurde zuerst für drei Minuten auf 72°C und daraufhin für 30 Sekunden auf 95°C erhitzt. Dann wurde der folgende Zyklus 13-fach durchlaufen:

- Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 10 Sekunden,
- Primerhybridisierung bei 55 °C für 30 Sekunden,
- DNA-Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden.

Nach Durchlaufen der 13 Zyklen wurde die *Library* noch für fünf Minuten auf 72 °C erhitzt und dann auf 10 °C heruntergekühlt.

Zur Aufreinigung der hergestellten Library fand ein auf magnetischen *Beads* basierender Aufreinigungsschritt statt, der den Anteil der für die *Libraries* zu kurzen Fragmente minimierte.

3.2.10 Library-Quantifizierung

Die Libraries wurden mittels "Fragment Analyzer" (Advanced Analytical, Heidelberg) und dem "Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit (DNF-473), Advanced Analytical" quantifiziert. Der "Fragment Analyzer" ist ein auf Fluoreszenzdetektion basierendes Kapillarsystem zur qualitativen und quantitativen Messung von Nukleinsäuren. In diesem Fall wurden die Längen der hergestellten DNA-Fragmente gemessen, die die Libraries "Fragment Analyzer" beruht auf 48 bilden. Der parallel geschalteten Kapillarelektrophoresen, die eine Trenngelmatrix mit einem fluoreszierenden Farbstoff beinhalten. Die DNA-Fragmente trennen sich nach Fragmentgrößen innerhalb der Kapillaren auf und binden den Fluoreszenzfarbstoff. Eine kontinuierliche Lichtguelle führt am Detektionsfenster zur Fluoreszenzemission des Farbstoffs, die von einem CCD-Sensor detektiert wird. Zum einen wird die Fragmentgröße anhand der Zeit bestimmt, die die Fragmente für das Passieren des Detektionsfenster benötigen. Zum anderen wird durch die Fluoreszenzemission die Konzentration der Libraries bestimmt.

Vor der DNA-Sequenzierung mussten die *Libraries* auf 2 nmol / I verdünnt werden. 5 µl jeder normalisierten *Library* wurden daraufhin zusammen in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf AG) pipettiert (*pooling*). Die Molarität des *Pools* wurde daraufhin nochmals mittels Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und dem "High Sensitivity DNA Kit, Agilent Technologies" gemessen.

3.2.11 Genom-Sequenzierung

Die Genom-Sequenzierung fand mittels NGS (Next-generation-sequencing)-Die Sequenzierung erfolgte 500" Technologie statt. mit einem "Nextseq (Sequenziergerät, Illumina) unter Verwendung einer "NextSeq 500/550 v2 Mid Output Flowcell" (Illumina). Dabei wurde eine paired end-Sequenzierstrategie genutzt, bei der je 150 Zyklen von beiden Seiten der Fragmente sequenziert werden. Die Vorbereitung der Probe (Denaturierung des Pools) und die Beladung der Flowcell erfolgten gemäß Herstellerprotokoll. Es wurde eine Molarität von 1,7 pmol / I gewählt.

3.3 Methoden (Bioinformatik)

3.3.1 Rohdaten

Die Sequenzier-Rohdaten können vom DNA-Sequenziergerät im FASTQ-Format heruntergeladen werden. Das FASTQ-Format ist ein Textformat, welches für einen "paired-end"-Lauf pro Stamm eine R1-(*forward*) und eine R2-(*reverse*) -Datei erstellt.

3.3.2 Software

Eine Zusammenstellung aller in dieser Arbeit verwendeten bioinformatischen Softwareprogramme liefert Tabelle 9.

Tabelle 9: Auflistung aller genutzten bioinformatischen Softwareprogramme mit dem zu bedienenden Betriebssystem oder der Nutzung des GUI (*graphical user interface*) über den Web-Browser aufgelistet.

Methode	Software	Betriebssystem
Pipeline (Assembly , Annotation, etc.)	ASA ³ P 1.0.4	Ubuntu
Serotypisierung	Past 1.0	Ubuntu
Antibiotikaresistenzen	RGI 4.2.2	Ubuntu
Ringförmige referenzbasierte Genomdarstellung, RGPs	ССТ	Ubuntu
Komparative Genomik	GECO	Web-Browser
Komparative Genomik	CLC Sequence Viewer 8	Windows 7
Komparative Genomik	EDGAR 2.3	Web-Browser
COG-Analyse	BPGA 1.3.0	Ubuntu
Phagen-Detektion	PHASTER	Web-Browser
BLAST-Analysen (Virulenzfaktoren, Plasmide)	ABRicate 0.8.10	Ubuntu
Plasmid-Detektion	Platon 1.1.0	Ubuntu
Protein-Alignment	Clustal Omega 1.2.4	Web-Browser
Phylogenetische Darstellung	Mega7 7.0.26	Windows 7

3.3.3 ASA³P-*Pipeline*

ASA³P ist eine automatische und hochskalierbare *Pipeline* zur Assemblierung, Annotation und Charakterisierung von nah verwandten bakteriellen Genomen. Die kommandozeilenbasierte *Pipeline* wurde von Oliver Schwengers aus der Professur der Systembiologie und Bioinformatik der Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen (Leiter: Prof Dr. Alexander Goesmann) entwickelt und vereint verschiedene bioinformatische Programme, von denen die wichtigsten im Folgenden kurz einzeln erläutert werden. Die Ergebnisse sind in einem Webinterface mittels moderner HTML5– Dokumente interaktiv visualisiert.

Als Input für die ASA³P-*Pipeline* dieser Arbeit wurden pro Stamm zwei FastQ-Dateien (R1 und R2) sowie Referenzstamm-Dateien im Genbank-Format benötigt.

Die *Pipeline* beginnt mit FastQC (https://github.com/s-andrews/FastQC), das eine Qualitätskontrolle der Sequenz–Rohdaten durchführt, um technische Fehler bei der Sequenzierung zu identifizieren. Die *Reads* werden anschließend mittels Trimmomatic (Bolger et al., 2014) getrimmt. Somit werden Sequenzieradapter und qualitativ schlechte

Basen oder auch ganze *Reads* entfernt, die den durchschnittlichen Qualitätsschwellenwert nicht überschreiten. Für durch Illumina sequenzierte *Reads* (NGS) werden von ASA³P die folgenden Trimmomatic-Einstellungen vorgenommen: "ILLUMINACLIP: 2:30:10", 'LEADING:15', 'TRAILING:15', 'SLIDINGWINDOW:4:20', 'MINLEN:20', 'TOPHRED33'.

Das Programm FastQ Screen (Wingett und Andrews, 2018) prüft die *Reads* auf Kontamination. Nach dem Trimmen erfolgt ein weiterer Qualitätskontrollschritt mittels FastQC. *Reads*, die die Qualitätskontrolle passieren, werden mittels SPAdes (Bankevich et al., 2012) zu *Contigs* assembliert. Anschließend werden die Genomgröße, der GC-Gehalt, die Anzahl der *Contigs* und die N50-Länge bestimmt. Als Ergebnis des *Assemblies* wird eine Multi-Fasta-Datei ausgegeben.

Anhand der gewählten Referenzgenome werden im Scaffolding-Schritt die Anordnung und Orientierung der Contigs der Stämme gegen die Referenzen ermittelt. So können aneinander liegende Contigs zu langen Scaffolds verbunden werden. Die Längen von Lücken ("gaps") zwischen Contigs können abgeschätzt und überbrückt werden. Bei künstlich überbrückten Contigs setzt das Scaffolding Tool MeDuSa (Bosi et al., 2015) dieses künstliche Stoppcodonsequenz zur Markierung Übergangs eine 'NNNNNNNNNCTAGCTAGCTAGCNNNNNNNNN'. Auch nach dem Scaffolding-Schritt werden erneut die Anzahl der Scaffolds, der übrigen Contigs und die N50-Länge bestimmt. Die Sequenzen sind sowohl als Multi-Fasta (Scaffolds und Contigs) als auch als Pseudogenom-Fasta-Datei vorhanden.

Für die Annotation nutzt ASA³P das *Tool* Prokka (Seemann, 2014). Die Nukleotidabfolge der vorhergesagten ORFs (*open reading frames*) wird in eine Aminosäurensequenz übersetzt und mit den angegebenen Referenzstämmen sowie Datenbanken abgeglichen. So werden die kodierenden Sequenzen und die entsprechenden Aminosäuresequenzen bestimmt und die Informationen als Genbank-Datei herausgegeben. Neben den kodierenden Genen werden auch nicht-kodierende Gene, wie z. B. tRNA und rRNA, annotiert.

Die MLST-Typisierung wird ebenfalls durch ASA³P durchgeführt. Je nach MLST-Schema variiert die Anzahl der genutzten Gene. In diesem Fall wurden sieben Haushaltsgene mittels BLASTn mit den Allelprofilen der PubMLST-Datenbank (Jolley et al., 2018) abgeglichen. Aufgrund der aktuelleren Allelprofil-Datenbank auf der Seite des "Center for Genomic Epidemiology (CGE)" (https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/, Datenbank-Version: 2.0.0, 29.04.2019) wurden neue Allele oder Allelprofile auf der CGE-Internetseite typisiert. Außerdem werden mittels SAMTools (Li et al., 2009) und SNPeff (Cingolani et al., 2012) die Anzahl der SNPs und HI (*high-impact*) SNPs zum Referenzgenom *PAO1* bestimmt.

38

ASA³P ermöglicht noch weitere Analysen, wie die taxonomische Klassifikation, die Detektion von Antibiotikaresistenzgenen und Virulenzgenen sowie *Core*/Pangenom- und phylogenetische Analysen. Für diese Analysen wurden bei der Erstellung dieser Arbeit jedoch andere Software-*Tools* genutzt.

3.3.4 *Pseudomonas aeruginosa* serotyper (PAst)

Zur Bestimmung der Serotypen wurde das *Tool* PAst (*Pseudomonas aeruginosa* serotyper) herangezogen (Thrane et al., 2016). Dieses auf der Programmiersprache Perl basierendes *Tool* ermöglicht eine *in silico* Analyse des Serotyps bei *P. aeruginosa*-Stämmen. Das Gencluster des O-spezifischen Antigens (OSA) wird durch *ihfB/himD* und *wbpM* begrenzt und die Größe variiert zwischen 15 und 25 kbp. PAst führte eine BLAST-Analyse des kompletten Genoms gegen die *P. aeruginosa* OSA-Gencluster-Datenbank durch. Als Input dienten die bereits assemblierten Sequenzdaten (Multi-Fasta-Dateien).

3.3.5 Resistance Gene Identifier (RGI)

Zur Ermittlung der Antibiotikaresistenzgene wurden die Pseudogenome der sequenzierten Stämme mit der "Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)" (Jia et al., 2017) verglichen. Dies wurde mit der kommandozeilenbasierten Version der Software "Resistance Gene Identifier" (RGI) (Jia et al., 2017) durchgeführt, die auf einer BLASTp-Analyse beruht. Mittels BLASTp wurde eine Aminosäurensequenz, die zuvor aus den Pseudogenomen translatiert wurde, mit einer Proteindatenbank abgeglichen. So ließ sich die Übereinstimmung homologer Gene vieler Bakterienstämme mit der CARD-Datenbank vergleichen. Ein Vorteil in der Nutzung von BLASTp ist, dass sich stille Mutationen nicht auf die Identitäts-Übereinstimmung auswirken. Zur Bewertung der Übereinstimmungen wird ein BLASTp-Bitscore bestimmt und nur Treffer über einem bestimmten Grenzwert angezeigt. Aufgrund der verschiedenen Mechanismen der Antibiotikaresistenz bei P. aeruginosa wird der RGI-Output in drei Modelle eingeteilt:

- Protein-Homologie-Modell (protein homolog model, PHM)

Durch das PHM wird das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen überprüft. Die durch das PHM überprüften Gene sind zum größten Teil Antibiotika inaktivierende Enzyme und Bestandteile von Effluxpumpen. Für die *Presence/Absence*-Matrix des Protein-Homologie-Modells wurden Schwellenwerte von 70 % Sequenzidentität und 85 % Längenabdeckung festgelegt. Die Gene *cpxR*, *armR*, *mexA*, *oprM*, *mexC*, *mexD*, *oprJ*, *mexE*, *mexF*, *oprN* und *mexX* wurden mit den Regulatoren in einer separaten Effluxpumpen-*Presence/Absence*-Matrix aufgelistet.

- Protein-Varianten-Modell (protein variant model, PVM)

Die im PVM überprüften Proteine sind häufig Angriffspunkte (Ziele) von Antibiotika. Das PVM detektiert Mutationen, die durch Änderungen in der Aminosäuresequenz und Proteinstruktur die Wirkung von Antibiotika verhindern können. In dieser Arbeit wurden Veränderungen im *gyrA*-Gen mittels PVM identifiziert und dargestellt. Ein Treffer hat mindestens eine Mutation mit Änderung einer Aminosäure und einen BLASTp-*Bitscore*, der höher als der Grenzwert liegt, ansonsten wird er nicht abgebildet. Es werden nur die Treffer vom PVM erfasst, die als Resistenzvarianten in der Datenbank vorliegen.

- Protein-Überexpressions-Modell (protein overexpression model, POM)

Dieses Modell erkennt Mutationen in Transkriptionsregulatoren, die zu einer erhöhten Genexpression führen können. In *P. aeruginosa* stehen die Transkriptionsregulatoren der Effluxpumpen mit Antibiotikaresistenz in Verbindung. Die Regulatoren *nalD*, *nalC*, *mexR*, Typ A/B *nfxB*, *mexS*, *mexT* und *mexZ* werden mit den Genen aus dem PHM in eine Effluxpumpen-Presence/Absence-Matrix zusammengefügt.

3.3.6 GECO

GECO ist ein bioinformatisches *Tool* für komparative Analysen und Visualisierungen von Genen und genomischen Bereichen. Es lassen sich Matrizen homologer und orthologer Gene erstellen und die Visualisierungsfunktion stellt homologe Regionen anhand der Annotation in mehreren Genomen übersichtlich dar. Informationen wie Abweichungen im GC-Gehalt und *Frameshift*-Mutationen lassen sich so übersichtlich erkennen. Als Input werden die annotierten Genome als EMBL-Datei benötigt (Kuenne et al., 2007). In dieser Arbeit wurden Vergleiche der jeweils homologen *mucA*- und *oprD*-Gene der CAP-, CF- und Referenzstämme durchgeführt. Die Grenzwerte lagen bei allen Analysen bei 95 % Identität und 90 % Abdeckung. Bei *oprD* (Ref: *PAO1*) wurden die beiden unterschiedlichen Wildtyp- (WT)-Gene sowie defekte und verkürzte Varianten mit der phänotypischen Imipenem-MHK in Zusammenhang gestellt. Bei *mucA* wurden die WT und die defekten Varianten mukoiden Phänotypen gegenübergestellt. Für die Darstellung des Integrons wurde *sul1* (Ref: *NCGM2.S1*) als zentriertes Gen mit den oben genannten Grenzwerten gewählt.

3.3.7 CLC Sequence Viewer

Der CLC Sequence Viewer 8.0 (https://www.qiagenbioinformatics.com/, Qiagen, Aarhus, Dänemark) ist ein Software-*Tool* für grundlegende bioinformatische Analysen und bildet die kostenfreie Version der CLC Genomics Workbench (Qiagen). Für diese Arbeit wurde

CLC für Dateiumformatierungen von Genbank (.gbk) auf Embl (.emb) genutzt und für die Prädiktion von ORFs (*open reading frames*) genutzt.

3.3.8 Clustal Omega

Für Protein-*Alignments* wurde die Web-Version des *Tools* Clustal Omega verwendet (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). In dieser Arbeit wurden zwei Typen des *oprD*-Gens (Typ A und Typ B, Abbildung S-1) auf Aminosäureebene direkt miteinander verglichen (*aligned*) und die Aminosäuren farblich hervorgehoben. Durch Zeichen unter dem *Alignment* wird die Ähnlichkeit gekennzeichnet. Dabei stehen Sterne (*) für die Übereinstimmung auf Nukleotidebene, Doppelpunkte (:) für eine starke Ähnlichkeit der Aminosäuren, Punkte (.) für schwache Ähnlichkeiten und Leerzeichen () für starke Unähnlichkeiten (Sievers et al., 2011).

3.3.9 CCT (CGView Comparison Tool)

Das CGView Comparison Tool (CCT) ermöglicht visuelle Vergleiche vieler DNA-Sequenzen, in diesem Fall bakterieller Genome. CCT nutzt BLAST für die Vergleiche. Für die "maps for dna vs dna" wurden mittels BLASTn alle CAP- und PACF-Genome auf Nukleotidebene mit dem Referenzstamm UCBPP-PA14 verglichen. Als Input wurden Genbank-Dateien genutzt, zur Berechnung der zirkulären Darstellung wurde das Skript "build blast atlas.sh" genutzt und in der "project settings dna vs dna.conf"-Datei zusätzlich die Parameter ", draw gc content = T", "draw gc skew = T" und "map size = large" geändert. Die generierte zirkuläre Karte zeigt von außen nach innen die CDS, die nach Ähnlichkeit zur Referenz sortierten Genome (außen am ähnlichsten, innen am unähnlichsten), den GC-Gehalt und GC-Skew. Die vergrößerten Ausschnitte wurden mit dem Skript "create zoomed maps.sh" mit dem Zoomfaktor "-z = 10" und Zentrierungen bei "-c = 49119" (RGP-1), "-c = 295321" (RGP-2), "-c = 693590" (RGP-3), "-c = 1316571" (RGP-4), "-c = 1930696" (RGP-5), "-c = 2035227" (RGP-6), (RGP-8), "-c = 2438613" (RGP-7), "-c = 2487189" "-c = 2699181" (RGP-9), "-c = 2861495" (RGP-10), "-c = 2931702" (RGP-11), "-c = 2972722" (RGP-12), "-c = 3192028" (RGP-13), "-c = 3835627" (RGP-14), "-c = 4146370" (RGP-15), "-c = 4350350" (RGP-16), "-c = 4470548" (RGP-17, "-c = 4585831" (RGP-18), "-c = 4755142" (RGP-19), "-c = 4877405" (RGP-20), "-c = 4924166" (RGP-21) und "-c = 5304697" (RGP-22) ausgeführt (Grant et al., 2012).

Das Vorhandensein der RGPs unter den Stämmen wurde anhand dieser vergrößerten Darstellungen durch visuelle Inspektion kontrolliert. Als vorhanden wurden die RGPs oder die eingeteilten Regionen bezeichnet, die mindestens eine Sequenzidentität von 80 % über 70 % der Länge zeigten. Zur Überprüfung des Vorkommens der "Serotyp-Insel" wurde zusätzlich äquivalent zum Referenzstamm *UCBPP-PA14* ein Projekt mit dem Referenzstamm *PA7* berechnet. Anschließend wurde ein vergrößerter Ausschnitt mit dem Zoomfaktor "-z = 25" und Zentrierungen bei "-c = 2009605" erstellt.

3.3.10 EDGAR

EDGAR 2.0 ist eine bioinformatische Software für komparative Genomanalysen beliebig vieler zu vergleichender Genome. Mittels EDGAR 2.0 lassen sich unter anderem orthologe Gene durch "Bidirectional Best BLAST Hits" identifizieren, Pangenom, *Core*-und *Accessory*-Genom sowie *Singletons*, *Average amino acid identity* (AAI) und *Average nucleotide identity* (ANI) berechnen. Diese Berechnungen können in interaktiven phylogenetischen Bäumen, Syntänie-*plots* oder Venn-Diagrammen benutzerfreundlich dargestellt werden.

Es wurde ein EDGAR-Projekt mit den in dieser Arbeit sequenzierten Stämmen und allen geschlossenen *P. aeruginosa*-Genomen, die zum Zeitpunkt des 25.10.2018 in der RefSeq-Datenbank von NCBI ("NCBI-Genome", https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/ genomes/187, (O'Leary et al., 2016)) verfügbar waren, in EDGAR implementiert (Datei E-4).

Für diese Arbeit wurden die Größen des *Core*-, Pan-, und *Accessory*-Genoms und die Anzahl der *Singletons* (Referenz *PAO1*) sowie der Darstellung des *Core*-/Pangenom*development-plots* berechnet. Die weitere Verarbeitung der "Subset"-Größen wurde mit Microsoft Excel übersichtlich dargestellt. Außerdem wurden die phylogenetischen Verhältnisse des *Core*-Genoms berechnet (siehe 3.3.11) (Blom et al., 2019).

3.3.11 Phylogenie

Die Darstellung der phylogenetischen Bäume beruht auf Berechnungen, die mittels EDGAR (Blom et al., 2019) durchgeführt wurden. Die *Core*-Gene wurden mithilfe von MUSCLE (Edgar, 2004) aligniert, d. h. gleich ausgerichtet und miteinander verglichen. Die phylogenetischen Bäume wurden daraufhin durch Fasttree 2.1 (Price et al., 2010) nach der *"approximately-maximum-likelihood*"-Methode auf Aminosäureebene mit *PAO1* als Referenzstamm erstellt. Die Daten des phylogenetischen Baumes wurden im Newick-Dateiformat von EDGAR heruntergeladen und zur Darstellung in MEGA7 (Stecher et al., 2016) geöffnet. Hier wurde die Darstellung des Baums in einen *"radiation-style*" geändert und die CAP-, CF- und Referenzstämme wurden farblich markiert. Zur verbesserten Darstellung wurden die Bäume in PDF-Format gespeichert und in *"Inkscape 0.92" weiterbearbeitet.*

3.3.12 BPGA

BPGA (Bacterial Pan Genome Analysis Tool) ist eine schnelle Pipeline zur Pangenom-Analyse vieler bakterieller Genome einer Spezies. Die Pipeline enthält sieben funktionelle Module. Neben der Pangenom-Analyse (Bestimmung der Größe des Coreund Accessory-Genoms sowie der Anzahl der Singletons und die Auflistung der entsprechenden Gene) führt BPGA weiterführende Analysen durch, wie Multilokus-Sequenztypisierungen und die darauf basierende Phylogenie, Analysen von Regionen mit abweichendem GC-Gehalt sowie funktionelle Analysen durch Zuordnung der Pangenom-Subsets (Core-, Accessory- Genom und Singletons) zu den Kategorien der KEGG- und COG (Cluster of Orthologous Groups)-Datenbank (Chaudhari et al., 2016). BPGA wurde in dieser Arbeit genutzt, um funktionelle Unterschiede der Pangenom-Subsets der CAP- und CF-Stämme in Bezug auf die COG-Kategorien zu untersuchen. Als Input wurden die annotierten Genbank-Dateien verwendet. Die BPGA-Pipeline beginnt mit einem Clustering der orthologen Gene durch USEARCH (Edgar, 2010) mit einem Schwellenwert von 50 % Sequenzidentität und einer Zuordnung der Gene zum Core- und Accessory-Genom sowie zu den Singletons. Die Gen-Sets werden daraufhin für die funktionelle Analyse auf Aminosäure-Ebene durch BLASTp mit der COG-Datenbank verglichen.

3.3.13 PHASTER

Das Vorkommen von Phagen-DNA wurde durch die Web-Version (www.phaster.ca) des Phagen-Identifizierungs-*Tools* PHASTER (PHAge Search Tool - Enhanced Release) überprüft. Dabei wurde ein Schwellenwert von 50 % Übereinstimmung der Phagen-Proteine zur Phage in der Datenbank gesetzt (first_most_common_phage_ percentage) (Arndt et al., 2016). Die Stämme mit Vorkommen des Coat-Proteins (CoaB, Gen: *coaB*) wurden in Tabelle 17 mit einer Fußnote (¹) markiert und als funktionale Phagen identifiziert.

3.3.14 Virulenzfaktoren (ABRicate)

Um eine *Presence/Absence*-Matrix der vorhandenen Virulenzgene aller Genome zu erstellen, wurde jeder Stamm einzeln mithilfe von BLASTx mit der VFDB (*Virulence factor database*) (Liu *et al.*, 2018, http://www.mgc.ac.cn/VFs/) verglichen. Die VFDB-Datenbank (*protein sequences of core dataset*) wurde auf Aminosäureebene heruntergeladen und in ABRicate (https://github.com/tseemann/abricate, BLASTx) implementiert. ABRicate filterte bereits alle Treffer unter 85 % Abdeckung und 85 % Identität heraus ("--mincov 85", "--minid 85"). In der *Presence/Absence*-Matrix werden die Sequenzidentitätswerte angezeigt.

3.3.15 Plasmid-Detektion (ABRicate)

Die CAP-, CF- und Referenzstämme wurden mittels ABRicate (BLASTn) mit allen geschlossenen Plasmiden, die sich in der RefSeg-Datenbank befanden (NCBI, "plasmid annotation report" von P. aeruginosa, Stand: 01.10.2018. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/plasmids/187, O'Leary et al., 2016), verglichen. Dazu wurden die 37 Plasmid-Sequenzdateien (Fasta-Dateien) heruntergeladen und eine Plasmid-Datenbank ("Pseuplas") auf Nukleotidebene erstellt. Die "Pseuplas"-Datenbank sowie eine Liste der enthaltenen Plasmide befinden sich im Anhang ("Pseuplas"-Datenbank: Datei E-1, Plasmidliste: Tabelle S-1). Zur Darstellung der Daten wurde eine Sequenzidentität von mindestens 95 % festgelegt und die Abdeckungen in der Presence/Absence-Matrix dargestellt (mindestens 20 % Längenabdeckung). Es wurden nur die Stämme mit Datenbanktreffern aufgelistet.

3.3.16 Plasmid-Detektion (Platon)

Platon (Plasmid contig detection and characterization for short read draft assemblies, https://github.com/oschwengers/platon, Schwengers et al., 2019, zum gegenwärtigen Zeitpunkt unpubliziert) ist ein Tool von Oliver Schwengers aus der Professur der Systembiologie und Bioinformatik der Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen (Leiter: Prof Dr. Alexander Goesmann) zur Detektion putativer Plasmid-Contigs. Als Input wurden die assemblierten Contigs als Multi-Fasta-Datei benötigt. Platon berechnet RDS (replicon distribution scores) basierend auf einzelnen Marker-Protein-Sequenzen (MPS) und ordnet, anhand der besten durchschnittlichen Scores der Contigs und der Score-Verteilung von Plasmiden und Chromosomen der RefSeq-Datenbank (NCBI, O'Leary et al., 2016), die Contigs dem Chromosom oder Plasmiden zu. Daraufhin testet Platon die Contig-Sequenzen auf Möglichkeiten der Zirkularisierung durch Überlappung und sucht nach rRNA-, Replikations-, Mobilisierungs- und Konjugationsgenen sowie nach Inkompatibilitäts-Gruppen (Datenbank der Inkompatibilitäts-Gruppen: Carattoli et al., 2014). Des Weiteren wird noch eine Analyse durch BLAST+ gegen die Refseg-Plasmid-Datenbank (NCBI) durchgeführt (O. Schwengers et al., 2019). Die von Platon als putative Plasmide bewertete Contigs sind in Datei E-5 aufgelistet.

3.4 Statistik

Vergleichende Aussagen zwischen Daten der CAP- und CF-Stämme wurden in dieser Arbeit durch unterschiedliche statistische Tests begründet. Die statistischen Tests wurden mit "Social Science Statistics" durchgeführt (unter: https://www.socscistatistics.com/, abgerufen am 16.09.2019). Da es sich bei der vorliegenden Analyse um eine explorative Datenanalyse handelt, wurde von einer Korrektur für multiples Testen abgesehen.

Die Verteilungen der morphologischen Kategorien, Antibiotikaresistenzen, Serotypen, phylogenetischen Gruppen sowie die Pangenom-Analysen, COG-Zuordnungen und das Vorkommen von Mutationen in *mucA*, *gyrA* und *oprD* unter den CAP- und CF-Stämmen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test (Abkürzung: Chi²) auf die Nullhypothese überprüft. Wenn mind. 20 % der Erwartungswerte kleiner als n= 5 sind, wurde der Exakte Test nach Fisher (Abkürzung: ETF) angewandt. Aufgrund der Einheitlichkeit wurden alle Zusammenhänge der Verteilungen der genomischen Inseln mit dem Exakten Test nach Fisher durchgeführt. Die Nullhypothese besagt, dass kein Zusammenhang in der Verteilung der Zielvariablen auf die CAP- und CF-Stämme besteht. Die Alternativhypothese ist, dass ein Zusammenhang zwischen einer Zielvariablen und einer Verteilung unter CAP- und CF-Stämmen besteht. Die p-Werte werden hier auf die vierte Nachkommastelle gerundet angegeben. In vergleichenden Abbildungen dieser Arbeit wird für die grafische Darstellung von p-Werten potentieller Zusammenhänge eine unterschiedliche Anzahl von Sternen verwendet (p < 0.05: *, p < 0.01: **, p < 0.001: ***). Der Vergleich der SNP-Anzahl zwischen CAP- und CF-Stämmen konnte nicht mittels t-Test durchgeführt werden, weil keine Normalverteilung der Daten vorlag. Aufgrund dessen wurde hier der Mann-Whitney-U-Test (Abkürzung: MWUT) angewandt.

4 Ergebnisse

4.1 Kultivierung und phänotypische Beurteilung

Die Ergebnisse der optischen Dichtemessung, der MALDI-TOF Identifizierung, der DNA-Konzentrationsmessung und der Messung der *Library*-Molarität wurden in Tabelle 10 zusammengefasst. Zum Einschluss der Stämme in die weiteren Analysen der Arbeit wurden folgende Schwellenwerte für die Messungen der optischen Dichte, der DNA-Konzentration und der *Library*-Molarität festgelegt:

Die Differenz der bei 600 nm gemessenen optischen Dichte (OD_{600}) zur Negativkontrolle (steriles TSB-Medium) muss 0,008, die gemessene DNA-Konzentration muss 0,2 ng/µl und die *Library*-Molarität muss 5 nmol/l überschreiten. Im Folgenden werden erst die Ergebnisse der verarbeiteten CAP- und anschließend die der CF-Stämme beschrieben.

CAP-Stämme

Im Zuge der Anzucht auf Columbia-Blutagar (Thermo Fisher Scientific) zur morphologischen Beurteilung (4.1.1) wurden in einigen Isolaten unterschiedliche Koloniegrößen bzw. -morphologien festgestellt. Aufgrund dessen wurden die CAP-Stämme zusätzlich auf MacConkey-Agar (Thermo Fisher Scientific) ausgestrichen und Mischkulturen aus den weiteren Analysen entfernt (Tabelle 13, Fußnoten). Die OD₆₀₀-Messung ergab ein ausreichendes Wachstum bei 68 von 74 Stämmen. Die MALDI-TOF Analyse bestätigte bei 67 ausreichend angewachsenen Stämmen eine Identifizierung als *P. aeruginosa*, außerdem wurde ein Stamm als Bakterium der Spezies *Proteus mirabilis* identifiziert. Bei vier der sechs ungenügend angewachsenen Stämmen ein Stamm als *Pseudomonas fluorescens* und ein Stamm als *P. aeruginosa* identifiziert. Die sechs in der optischen Dichtemessung ausgefallenen Stämme haben bei der DNA-Konzentrationsmessung ebenfalls den Schwellenwert nicht erreicht. Für die übrigen Stämme konnte eine ausreichende DNA-Konzentration gemessen werden.

Die Herstellung der *Libraries* wurde nur für die Stämme durchgeführt, die für die endgültigen Genomanalysen infrage kommen. Von 67 hergestellten *Libraries* waren 57 erfolgreich und wurden anschließend sequenziert. Die in dieser Arbeit von CAP-Patienten isolierten Stämme wurden "*PAE_00---*" benannt und die Nummerierung wurde vor der Sequenzierung unsortiert vorgenommen.

CF-Stämme

Nach Anzucht der CF-Stämme auf Columbia-Blutagar konnten nur reine Bakterienkulturen festgestellt werden. Alle 48 CF-Stämme haben in der OD₆₀₀-Messung den Grenzwert überschritten und konnten mittels MALDI-TOF Analyse als *P. aeruginosa* identifiziert werden. Auch die DNA-Konzentrationen und die gemessenen *Library*-Molaritäten der Stämme erreichten die Schwellenwerte, sodass alle 48 Isolate sequenziert werden konnten. Die in dieser Arbeit von CF-Patienten isolierten Stämme wurden "*PACF_----*" benannt und die Nummerierung wurde nach der laufenden Nummer in der Stammsammlung vorgenommen.

Tabelle 10: Übersicht aller prozessierten Bakterienisolate. Bei Überschreiten der Schwellenwerte (Differenz OD_{600} zur Negativkontrolle > 0,008, DNA-Konzentration > 0,2 ng/µl und *Library*-Molarität > 5 nmol/l) wurde in den Spalten ein Plus ("+"), ansonsten ein Minus ("-") eingetragen. "MALDI-TOF": Identifizierte Spezies, bei "k. A." in der "Library"-Spalte wurde keine *Library* hergestellt.

Stamm	OD	MALDI-TOF	DNA	Libary	Stamm	OD	MALDI-TOF	DNA	Libary	Stamm	OD	MALDI-TOF	DNA	Libary
-	+	Proteus mirabilis	+	k.A.	PAE_0029	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_15	+	Pseu. aeruginosa	+	+
-	+	Pseu. aeruginosa	+	-	PAE_0030	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_186	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0001	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0031	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_194	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0002	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0032	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_205	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0003	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0033	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_21	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0004	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0034	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_212	+	Pseu. aeruginosa	+	+
-	+	Pseu. aeruginosa	+	-	PAE_0035	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_229	+	Pseu. aeruginosa	+	+
-	+	Pseu. aeruginosa	+	-	PAE_0036	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_23	+	Pseu. aeruginosa	+	+
-	+	Pseu. aeruginosa	+	-	-	-	k.A.	-	k.A.	PACF_233	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0005	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0037	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_277	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0006	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0038	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_281	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0007	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0039	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_3	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0008	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0040	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_305	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0009	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0041	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_34	+	Pseu. aeruginosa	+	+
-	-	Pseu. aeruginosa	-	k.A.	PAE_0042	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_36	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0010	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0043	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_37	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0011	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0044	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_38	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0012	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0045	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_39	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0013	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0046	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_410	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE 0014	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE 0047	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_43	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE 0015	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE 0048	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_46	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0016	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0049	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_466	+	Pseu. aeruginosa	+	+
	-	k.A.	-	k.A.	PAE_0050	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_47	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0017	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0051	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_541	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0018	+	Pseu. aeruginosa	+	+		+	Pseu. aeruginosa	+	-	PACF_57	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE 0019	+	Pseu. aeruginosa	+	+	-	-	Pseu. fluorescens	-	k.A.	PACF_570	+	Pseu. aeruginosa	+	+
-	-	k.A.	-	k.A.	PAE_0053	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_6	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE 0020	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE 0054	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_61	+	Pseu. aeruginosa	+	+
	+	Pseu. aeruginosa	+	-	PAE_0055	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_640	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE 0021	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0056	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_657	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0022	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0057	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_662	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0023	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PAE_0058	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_672	+	Pseu. aeruginosa	+	+
	+	Pseu. aeruginosa	+	-	PAE_0059	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF 73	+	Pseu. aeruginosa	+	+
-	+	Pseu. aeruginosa	+	-	PACF 106	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF 74	+	Pseu. aeruginosa	+	+
-	-	k.A.	-	k.A.	PACF 115	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF 76	+	Pseu. aeruginosa	+	+
-	+	Pseu. aeruginosa	+		PACF 116	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF 813	+	Pseu. aeruginosa	+	+
-	+	Pseu. aeruginosa	+	-	PACF 129	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF 85	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE 0025	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF 13	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF 87	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0026	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF 135	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF 881	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE 0027	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF 137	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF 94	+	Pseu. aeruginosa	+	+
PAE_0028	+	Pseu. aeruginosa	+	+	PACF_147	+	Pseu. aeruginosa	+	+	_				

4.1.1 Vergleich der Koloniemorphologie

Zur phänotypischen Beurteilung wurden die CAP-, die CF-Stämme und der Referenzstamm *PAO1* auf Columbia-Blutagar ausgestrichen und bei 37 °C 24 Stunden lang inkubiert. Es erfolgte eine Einteilung der Stämme anhand von fünf morphologischen Kategorien, welche zuvor von Hornischer et al. beschrieben wurden (Hornischer et al., 2019). Beispiele der Ausprägungen der morphologischen Kategorien wurden in Abbildung 5 dargestellt. Die Kategorien sind:

- [G] Koloniegröße (0= SCV (small colony variant) bis 3= sehr große Kolonien)
- [R] Kolonierand (0= sehr glatter Rand, 1= leicht rauer Rand, 2= sehr rauer Rand)
- [O] Oberflächenstruktur (0= raue Oberfläche, 1= glatte Oberfläche, 2= mukoide, schleimige Oberfläche)
- [M] Metallischer Glanz (0= kein metallischer Glanz, 1= geringer metallischer Glanz, 2= deutlicher metallischer Glanz)
- [H] Hämolyse (0= kein hämolytisches Verhalten, 1= geringes hämolytisches Verhalten, 2= starkes hämolytisches Verhalten)



Abbildung 5: Beispiele für die Ausprägungen der morphologischen Kategorien der auf Columbia-Blutagar ausgestrichenen und bei 37 °C für 24 Stunden inkubierten *P. aeruginosa*-Isolate. Folgende Stämme befinden sich auf den Fotos: G-0: *PACF_657*, G-1: *PAE_0011*, G-2: *PACF_116*, G-3: *PAE_0048*, R-0: *PAE_0053*, R-

1: PAE_0046, R-2: PAE_0013, O-0: PAE_0053, O-1: PAE_0055, O-2: PAE_0014, M-0: PAE_0021, M-1: PAE_0033, M-2: PAE_0037, H-0: PAE_0040, H-1: PAE_0019 und H-2: PAE_0048.



Abbildung 6: Phänotypische Einteilung der CAP-Stämme sowie des Referenzstamms *PAO1* (A) und der CF-Stämme (B) in die oben genannten Kategorien. Rechts der Tabellen: Verteilung der phänotypischen Kategorisierung innerhalb der CAP- (C) und der CF-Stämme (D).

Im Vergleich der in Abbildung 6-C und 6-D dargestellten Verteilungen der morphologischen Ausprägungen lassen sich Unterschiede zwischen CAP- und CF-Stämmen feststellen. Der Anteil der kleinen Kolonien (0 und 1) ist unter den CAP-Stämmen (ca. 42 %, n = 22) deutlich geringer als unter den CF-Stämmen (ca. 85 %, n= 33) (Chi², p < 0,0001). Auch die Bildung von *small colony variants* (SCV, Koloniegröße 0) konnte unter CF-Stämme mit ca. 28 % (n= 11) häufiger beobachtet werden als unter den CAP-Stämmen mit ca. 6 % (n= 3) (Chi², p = 0,0029). Die Kolonieränder der CAP-Stämme verlaufen zu etwa 43 % rau und ohne einen scharfen Übergang (R= 2). Dies war unter den CF-Stämmen mit etwa 13 % der Stämme seltener zu beobachten (Chi², p = 0,0069). Der Anteil der mukoiden (schleimigen) Phänotypen ist unter den CAP-Stämmen mit etwa 9 % (n= 5) geringfügig niedriger als und unter den CF-Stämmen mit etwa 15 % (n= 6) (p = 0,5423). In CAP- und CF-Stämmen zeigen etwa 40 % eine starke hämolytische Aktivität. Ein metallischer Glanz wurde unter CAP-Stämmen seltener als unter den CF-Stämmen beobachtet (Chi², p = 0,0014).

4.1.2 Phänotypische Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung

Die phänotypische Resistenztestung wurde für die 53 CAP- und die 39 CF-Stämme sowie für den Referenzstamm PAO1 in Bezug auf die therapierelevantesten, antipseudomonalen Antibiotika durchgeführt. Die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestungen sind für die CAP-Stämme und PAO1 in Tabelle 11 und für die **CF-Stämme** in Tabelle 12 gezeigt. Die Interpretation der minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) erfolgte nach den **EUCAST-Richtlinien** für Pseudomonaden (EUCAST, Version 9.0, vom 01.01.2019). Neben vereinzelten Ausfällen von Resistenztestungen konnten für einige Stämme trotz wiederholter Testungen aufgrund eines zu geringen Wachstums mit dem VITEK-2 System keine Resistenz-Daten erfasst werden. Für diese Stämme wurde die Empfindlichkeiten gegen die getesteten Antibiotika mittels Epsilometertest (E-Test) durchgeführt und die Stämme in Tabelle 11 und Tabelle 12 mit einem "E" markiert.

Weil die Resistenztestungen des VITEK-2 Systems und des E-Tests in Bezug auf die Colistin-Resistenz als unzuverlässig gelten (EUCAST, Version 9.0, 2019), wurde bei den E-Tests auf eine Colistin-Testung verzichtet. Für die Klassifizierung als MDR, XDR oder PDR Stämme wird definitionsgemäß die Colistin-Testung verlangt. Weil die Resistenzergebnisse von Colistin als sensibel angenommen werden, werden nur die Stämme als XDR Stamm klassifiziert, die abgesehen von der Colistin-Bewertung gegen maximal eine getestete Antibiotikum-Klasse sensibel sind.

CAP-Stämme

Penicilline und Cephalosporine zeigen gegen alle CAP-Stämme Wirkung und die meisten Stämme zeigen ebenfalls Sensibilitäten gegen die anderen getesteten Antibiotika. 10 der 53 CAP-Stämme haben allerdings Resistenzen, am häufigsten gegen Gentamicin und Ciprofloxacin, gegen die jeweils sieben Stämme resistent sind. Gegen Amikacin ist ein Stamm resistent und fünf Stämme intermediär. Des Weiteren zeigen Imipenem mit drei resistenten Stämmen, Tobramycin mit zwei resistenten Stämmen sowie Aztreonam und Meropenem mit einem resistenten Stamm nur vereinzelt Resistenzen.

PAE_0009 besitzt als einziger Stamm Resistenzen gegen Aztreonam und gegen beide getesteten Carbapeneme. Die Stämme *PAE_0004*, *PAE_0026*, *PAE_0029* und *PAE_0032* sind intermediär gegen Amikacin (MHK= 16 mg/l) sowie gegen Gentamicin resistent (MHK= 8 mg/l) und zeigen somit das gleiche Resistenzmuster. Auch *PAE_0028* und *PAE_0033* besitzen innerhalb der Aminoglykoside gleiche MHKs gegen Gentamicin und Tobramycin (MHK= 16 mg/l). *PAE_0040* ist als einziger CAP-Stamm resistent gegen Amikacin.

50

PAE_0009 und *PAE_0040* sind die einzigen MDR Stämme unter den CAP-Stämmen, weil sie unempfindlich gegen mindestens ein Antibiotikum in drei unterschiedlichen Antibiotikaklassen sind. XDR oder PDR Stämme wurden nicht gefunden.

CF-Stämme

Aztreonam (sechs resistente Stämme) und Tobramycin (sieben resistente Stämme) haben unter den CF-Stämmen die niedrigste Resistenzlage. Gegen Piperacillin sind 13 Stämme und gegen Piperacillin/Tazobactam 12 Stämme resistent. Die Cephalosporine Ceftazidim und Cefepim haben mit entsprechend 12 und 11 resistenten Stämmen eine ähnliche therapeutische Wirksamkeit. Unter den Carbapenemen zeigt Meropenem mit fünf resistenten und sieben intermediären Stämmen eine bessere Wirksamkeit als Imipenem (15 Resistenzen).

Die höchsten Resistenzraten wurden für Amikacin (12 resistente und 10 intermediäre Stämme), Gentamicin (18 resistente Stämme) und Ciprofloxacin (20 resistente Stämme) bestimmt.

Bei neun CF-Stämmen waren alle getesteten Antibiotika wirksam. 14 Stämme waren intermediär oder resistent gegenüber Antibiotika in ein bis zwei Klassen. Die sieben identifizierten MDR Stämme sind *PACF_115*, *PACF_129*, *PACF_15*, *PACF_3*, *PACF_36*, *PACF_47* und *PACF_570*. Die neun XDR Stämme sind *PACF_13*, *PACF_137*, *PACF_23*, *PACF_281*, *PACF_34*, *PACF_37*, *PACF_410*, *PACF_657* und *PACF_85*.

Außerdem wurden die Antibiotika innerhalb einer Antibiotikaklasse miteinander verglichen. Unter den Penicillinen waren die minimalen Hemmkonzentrationen von Piperacillin und Piperacillin / Tazobactam bei 73 % der Stämme identisch. Für das alleinige Piperacillin wurde in sechs, bzw. sieben Stämmen (CAP, bzw. CF) höhere und in sieben, bzw. sechs Stämmen (CAP, bzw. CF) niedrigere MHKs gemessen als in Kombination mit Tazobactam.

Bei den Cephalosporinen wurden für den Großteil der CAP-Stämme höhere MHKs für Ceftazidim (CAZ) gemessen als für Cefepim (FEP) (CAZ>FEP: n= 27, CAZ<FEP: n= 9, CAZ=FEP: n= 17). Bei den CF-Stämmen besitzen mehr Stämme höhere MHKs für Cefepim (CAZ>FEP: n= 10, CAZ<FEP: n= 16, CAZ=FEP: n= 13).

Tabelle 11: Ergebnisse der phänotypischen Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung der 53 CAP-Stämme und dem Referenzstamm *PAO1*, getestet durch das VITEK-2 System (AST Karte N-248, BioMeriéux). Die Werte entsprechen den minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) in mg/l. Die mit einem "E" markierten Stämme wurden mittels E-Test getestet. Die Interpretation der MHKs in sensible (grüne Färbung des Feldes), intermediäre (gelbe Färbung) und resistente Stämme (rote Färbung) erfolgte nach EUCAST-Richtlinien (EUCAST, Version 9.0, 2019).

A 411-1	- 41 - 1	A	PAE_000	PAE_000;	PAE_000-	PAE_000;	PAE_000	PAE_000;	PAE_000	PAE_0009	PAE_001(PAE_001	PAE_001;	PAE_001;	PAE_001	PAE_001(PAE_001;	PAE_001	PAE_0019	PAE_002	PAE_002	PAE_0022	PAE_002;	PAE_002	PAE_0026	PAE_002:	PAE_002	PAE_002	PAE_003(
Antibi	otikaklasse	Antibiotikum		10	4	10	0	7	8	10	0	-	0	ω 	4	0)	7	8	0	0		1	ω •	01	0,	7		0	0
	Penicillin		4	10	10	10	0	0	0	10	0	4	0	0	0	4	0	0	4	4	0	4	0	4	°	0	°	4	4
		Piperacillin/ lazobactam	4	8	8	8	8	8	8	16	8	4	16	4	8	4	4	8	4	8	8	4	8	4	8	8	8	4	4
β-Laktam	Cephalosporin	Ceftazidim Cefepim	2	4	4	4	4	4	2	4	4	1	4	4	4	2	2	4	2 8	2	4	1	4	1	4 8	4	2	2 8	2
	Monobactam	Aztreonam	2	4	16	8	16	2	8	32	4	1	16	2	16	2	2	8	1	4	4	1	4	1	4	4	16	1	2
	Orahaman	Imipenem	2	2	2	2	1	2	1	16	1	1	2	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	k.A.	0,5	2	2	1	16
	Carbapenem	Meropenem	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25	16	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	1	0,5	0,25	0,25	0,5	1	0,25	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	•	Amikacin	2	2	16	2	2	2	2	2	2	2	2	2	16	2	4	2	2	2	2	2	2	4	16	2	2	16	2
Amir	noglykosid	Gentamicin	2	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	4	1	4	1	1	1	1	4	8	1	16	8	1
		Tobramycin	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	16	1	1
Fluo	Tobramycin Fluorchinolon Ciprofloxacin		0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	2	0,25	0,25	0,5	0,25	2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	4	0,25	1
Po	olymyxin	Colistin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
			_																										
Antibi	otikaklasse	Antibiotikum	PAE_0031	PAE_0032	PAE_0033	PAE_0034	PAE_0035	PAE_0036	PAE_0037	PAE_0038	PAE_0039	PAE_0040	PAE_0041	PAE_0042	PAE_0043	PAE_0044	PAE_0046	PAE_0047	PAE_0048	PAE_0050	PAE_0051	PAE_0053	Ш РАЕ_0054	PAE_0055	PAE_0056	PAE_0057	PAE_0058	PAE_0059	PAO1
Antibi	otikaklasse	Antibiotikum Piperacillin	PAE_0031 ∞	PAE_0032 4	PAE_0033 4	PAE_0034 4	PAE_0035 👓	PAE_0036 **	PAE_0037 4	PAE_0038 👓	PAE_0039 4	PAE_0040 4	PAE_0041 ∞	PAE_0042 👓	PAE_0043 4	PAE_0044	PAE_0046 👓	PAE_0047 😞	PAE_0048 4	PAE_0050 **	PAE_0051 ∞	PAE_0053 ∞	PAE_0054	PAE_0055 ∞	PAE_0056 4	PAE_0057 🐱	PAE_0058 4	PAE_0059 4	PAO1 4
Antibi	otikaklasse Penicillin	Antibiotikum Piperacillin Piperacillin/Tazobactam	PAE_0031 ∞ ∞	PAE_0032 4 ∞	PAE_0033 4 4	PAE_0034 4 4	PAE_0035 ∞ ∞	PAE_0036 ∞ ∞	PAE_0037 4 4	PAE_0038 & *	PAE_0039 4 4	PAE_0040 4 8	PAE_0041 ∞ ∞	PAE_0042 ∞ ∞	PAE_0043 4 4	PAE_0044 16 8	PAE_0046 8 16	PAE_0047 🐱 🐱	PAE_0048 4 4	PAE_0050 😞 😞	PAE_0051 ∞ ∞	PAE_0053 ∞ ∞	PAE_0054 0,13 0,25	PAE_0055 ∞ ∞	PAE_0056 4 4	PAE_0057 ∞ ∞	PAE_0058 4 4	PAE_0059 4 ∞	PAO1 4 4
Antibio	otikaklasse Penicillin	Antibiotikum Piperacillin Piperacillin/Tazobactam Ceftazidim	PAE_0031 & & 4	PAE_0032 4 8 2	PAE_0033 4 4 1	PAE_0034 4 4	PAE_0035 8 8 4	PAE_0036 8 8 2	PAE_0037 4 4 1	PAE_0038 8 8 4	PAE_0039 4 4 1	PAE_0040 4 8 1	PAE_0041 😄 😄 🛛	PAE_0042 & & 4	PAE_0043 4 4 1	PAE_0044 16 8 4	PAE_0046 8 16 4	PAE_0047 & % 4	PAE_0048 4 4 1	PAE_0050 8 8 4	PAE_0051 & & 4	PAE_0053 & & 4	PAE_0054 0,13 0,25 0,25	PAE_0055 & & 4	PAE_0056 4 4 1	PAE_0057 8 8 4	PAE_0058 4 4 1	PAE_0059 4 8 1	PAO1 4 4 2
<u>Antibio</u> β-Laktam	otikaklasse Penicillin Cephalosporin	Antibiotikum Piperacillin Piperacillin/Tazobactam Ceftazidim Cefepim	PAE_0031 8 8 4 2	PAE_0032 4 8 2 8	PAE_0033 4 4 1 1	PAE_0034 4 4 1	PAE_0035 8 8 4 2	PAE_0036 8 2 2	PAE_0037 4 4 1 1	PAE_0038 8 4 2	PAE_0039 4 4 1 1	PAE_0040 4 8 1 4	PAE_0041 8 8 2 2	PAE_0042 8 8 4 2	PAE_0043 4 4 1 2	PAE_0044 16 8 4 2	PAE_0046 8 16 4 2	PAE_0047 8 8 4 2	PAE_0048 4 4 1 2	PAE_0050 8 8 4 2	PAE_0051 8 8 4 1	PAE_0053 8 8 4 2	PAE_0054 0,13 0,25 0,25 1	PAE_0055 8 8 4 2	PAE_0056 4 4 1 1	PAE_0057 8 8 4 2	PAE_0058 4 4 1 1	PAE_0059 4 8 1 1	PA01 4 4 2 1
<u>Antibio</u> β-Laktam	otikaklasse Penicillin Cephalosporin Monobactam	Antibiotikum Piperacillin Piperacillin/Tazobactam Ceftazidim Cefepim Aztreonam	PAE_0031 8 8 4 2 8	PAE_0032 4 8 2 8 2	PAE_0033 4 4 1 1	PAE_0034 4 4 1 1	PAE_0035 8 8 4 2 4	PAE_0036 8 2 16	PAE_0037 4 4 1 1 2	PAE_0038 8 4 2 4	PAE_0039 4 1 1 1	PAE_0040 4 8 1 4	PAE_0041 8 8 2 2 4	PAE_0042 8 8 4 2 4	PAE_0043 4 4 1 2 1	PAE_0044 16 8 4 2 4	PAE_0046 8 16 4 2	PAE_0047 8 8 4 2 16	PAE_0048 4 1 2 2	PAE_0050 8 4 2 16	PAE_0051 8 4 1 4	PAE_0053 8 4 2 16	PAE_0054 0,13 0,25 0,25 1 0,13	PAE_0055 8 4 2	PAE_0056 4 4 1 1 4	PAE_0057 8 8 4 2 8	PAE_0058 4 4 1 1 1	PAE_0059 4 8 1 1 2	PA01 4 4 1 4
Antibio β-Laktam	otikaklasse Penicillin Cephalosporin Monobactam	Antibiotikum Piperacillin Piperacillin/Tazobactam Ceftazidim Cefepim Aztreonam Imipenem	PAE_0031 8 8 4 2 8 0,25	PAE_0032 4 8 2 8 2 1	PAE_0033 4 4 1 1 1 1	PAE_0034 4 4 1 1 2	PAE_0035 8 4 2 4 1	PAE_0036 8 2 2 16 1	PAE_0037 4 1 1 2 0,25	PAE_0038 8 4 2 4 1	PAE_0039 4 1 1 0,25	PAE_0040 4 8 1 4 4 8	PAE_0041 8 8 2 2 4 1	PAE_0042 8 4 2 4 2	PAE_0043 4 4 1 2 1 1	PAE_0044 16 8 4 2 4 2	PAE_0046 8 16 16 1	PAE_0047 8 8 4 2 16 2	PAE_0048 4 1 2 2 0,25	PAE_0050 8 8 4 2 16 1	PAE_0051 8 8 4 1 1 4 1	PAE_0053 8 4 2 16 1	PAE_0054 0,13 0,25 0,25 1 0,13 0,13	PAE_0055 8 4 2 16 2	PAE_0056 4 4 1 1 1 1 1 1	PAE_0057 8 8 4 2 8 2	PAE_0058	PAE_0059 4 8 1 2 2	PA01 4 4 1 4 2 1 4
<u>Antibio</u> β-Laktam	otikaklasse Penicillin Cephalosporin Monobactam Carbapenem	Antibiotikum Piperacillin Piperacillin/Tazobactam Ceftazidim Cefepim Aztreonam Imipenem Meropenem	PAE_0031 8 8 4 2 0,25 0,5	PAE_0032 4 8 2 2 1 0,25	PAE_0033 4 1 1 1 0,25	PAE_0034 4 4 1 1 2 0,25	PAE_0035 8 4 2 4 1 0,25	PAE_0036 8 2 2 16 1 0,25	PAE_0037 4 1 2 0,25 0,5	PAE_0038 8 4 2 4 1 0,25	PAE_0039 4 4 1 1 0,25 0,25	PAE_0040 4 8 1 4 8 0,25	PAE_0041 8 2 2 4 1 0,25	PAE_0042 8 4 2 4 2 0,25	PAE_0043 4 1 2 1 0,25	PAE_0044 16 8 4 2 4 2 0,25	PAE_0046 8 16 4 2 16 1 0,25	PAE_0047 8 8 4 2 16 2 0,5	PAE_0048 4 1 2 0,25 0,25	PAE_0050 8 4 2 16 1 0,25	PAE_0051 8 4 1 4 0,25	PAE_0053 8 4 2 16 1 0,25	PAE_0054 0,13 0,25 1 0,13 0,5 0,02	PAE_0055 8 8 4 2 16 2 0,25	PAE_0056 4 1 1 4 1 0,25	PAE_0057 8 8 4 2 8 2 0,25	PAE_0058 4 4 1 1 0,25	PAE_0059 4 8 1 2 0,25	PA01 4 4 2 1 4 2 0,5
Antibio β-Laktam	otikaklasse Penicillin Cephalosporin Monobactam Carbapenem	Antibiotikum Piperacillin/Tazobactam Ceftazidim Cefepim Aztreonam Imipenem Meropenem Amikacin	PAE_0031 8 8 4 2 8 0,25 0,5 2	PAE_0032 4 8 2 2 1 0,25 16	PAE_0033 4 4 1 1 1 0,25 4	PAE_0034 4 4 1 1 2 0,25 4	PAE_0035 8 8 4 2 4 1 0,25 2	PAE_0036 8 2 2 16 1 0,25 2	PAE_0037 4 4 1 2 0,25 0,5 2	PAE_0038 8 4 2 4 0,25 2	PAE_0039 4 1 1 0,25 0,25 2	PAE_0040 4 8 1 4 4 0,25 32	PAE_0041 8 2 2 4 1 0,25 2	PAE_0042 8 4 2 0,25 2	PAE_0043 4 4 1 2 1 0,25 8	PAE_0044 16 8 4 2 0,25 2	PAE_0046 8 16 4 2 16 1 0,25 2	PAE_0047 8 8 4 2 16 2 0,5 8	PAE_0048 4 4 1 2 0,25 0,25 2	PAE_0050 8 8 4 2 16 1 0,25 2	PAE_0051 8 8 4 1 4 0,25 2	PAE_0053 8 8 4 2 16 1 0,25 2	PAE_0054 0,13 0,25 0,25 1 0,13 0,5 0,02 6	PAE_0055 8 8 4 2 16 2 0,25 2	PAE_0056 4 1 1 4 0,25 2	PAE_0057 8 8 4 2 0,25 2	PAE_0058 4 1 1 1 2 0,25 2	PAE_0059 4 8 1 1 2 0,25 2	PA01 4 4 2 1 4 2 0,5 2
Antibio β-Laktam	otikaklasse Penicillin Cephalosporin Monobactam Carbapenem	Antibiotikum Piperacillin Piperacillin/Tazobactam Ceftazidim Cefepim Aztreonam Imipenem Meropenem Amikacin Gentamicin	PAE_0031 8 8 4 2 8 0,25 0,5 2 2 2	PAE_0032 4 8 2 8 2 1 0,25 16 8	PAE_0033 4 4 1 1 1 0,25 4 16	PAE_0034 4 4 1 1 2 0,25 4 1	PAE_0035 8 8 4 2 4 1 0,25 2 1	PAE_0036 8 2 2 16 1 0,25 2 1	PAE_0037 4 4 4 1 1 2 0,25 0,5 2 1	PAE_0038 8 4 2 4 1 0,25 2 1	PAE_0039 4 1 1 0,25 0,25 2 1	PAE_0040 4 8 1 4 4 9 0,25 32 8	PAE_0041 8 2 2 4 1 0,25 2 1	PAE_0042 8 8 4 2 4 2 0,25 2 1	PAE_0043 4 4 1 2 1 0,25 8 4	PAE_0044 16 8 4 2 0,25 2 1	PAE_0046 8 16 4 2 16 1 0,25 2 2 2	PAE_0047 8 8 4 2 16 2 0,5 8 4	PAE_0048 4 4 2 2 0,25 0,25 0,25 2 2 2	PAE_0050 8 4 2 16 1 0,25 2 1	PAE_0051 8 4 1 0,25 2 1	PAE_0053 8 8 4 2 16 1 0,25 2 1	PAE_0054 0,13 0,25 1 0,13 0,5 0,02 6 1	PAE_0055 8 4 2 16 2 0,25 2 1	PAE_0056 4 4 1 1 4 0,25 2 1	PAE_0057 8 8 4 2 0,25 2 1	PAE_0058 4 1 1 2 0,25 2 1	PAE_0059 4 8 1 1 2 0,25 2 1	PA01 4 4 2 1 4 2 0,5 2 1
Antibio β-Laktam Amir	otikaklasse Penicillin Cephalosporin Monobactam Carbapenem	Antibiotikum Piperacillin Piperacillin/Tazobactam Ceftazidim Ceftazidim Ceftapim Aztreonam Imipenem Meropenem Amikacin Gentamicin Tobramycin	PAE_0031 8 8 4 2 2 0,25 0,5 2 2 2 1	PAE_0032 4 8 2 8 2 1 0,25 16 8 2	PAE_0033 4 1 1 1 0,25 4 16 16	PAE_0034 4 4 1 1 2 0,25 4 1 1 1	PAE_0035 8 4 2 4 1 0,25 2 1 1	PAE_0036 8 2 2 16 1 0,25 2 1 1 1	PAE_0037 4 4 1 1 2 0,25 0,5 2 1 1 1	PAE_0038 8 4 2 4 1 0,25 2 1 1	PAE_0039 4 4 1 1 0,25 0,25 2 1 1	PAE_0040 4 8 1 4 4 8 0,25 32 8 1	PAE_0041 8 2 2 4 1 0,25 2 1 1	PAE_0042 8 4 2 0,25 2 1 1	PAE_0043 4 4 1 2 1 0,25 8 4 1 1	PAE_0044 16 8 4 2 0,25 2 1 1	PAE_0046 8 16 4 2 16 1 0,25 2 2 2 1	PAE_0047 8 8 4 2 16 2 0,5 8 4 1	PAE_0048 4 4 1 2 0,25 0,25 2 2 1	PAE_0050 8 4 2 16 1 0,25 2 1 1	PAE_0051 8 4 1 0,25 2 1 1	PAE_0053 8 4 2 16 1 0,25 2 1 1	PAE_0054 0,13 0,25 0,25 1 0,13 0,5 0,02 6 1 0,75	PAE_0055 8 4 2 16 2 0,25 2 1 1	PAE_0056 4 4 1 1 0,25 2 1 1	PAE_0057 8 8 4 2 0,25 2 1 1	PAE_0058 4 4 1 1 2 0,25 2 1 1 1	PAE_0059 4 8 1 1 2 0,25 2 1 1 1	PA01 4 4 2 1 4 2 0,5 2 1 1 1
Antibio β-Laktam Amir Fluc	otikaklasse Penicillin Cephalosporin Monobactam Carbapenem noglykosid	Antibiotikum Piperacillin Piperacillin/Tazobactam Ceftazidim Ceftazidim Ceftazidim Ceftazidim Meropanem Amikacin Gentamicin Tobramycin Ciprofloxacin	PAE_0031 8 8 4 2 0,25 0,5 2 2 1 0,25	PAE_0032 4 8 2 8 2 1 0,25 16 8 8 2 2 4	PAE_0033 4 1 1 1 0,25 4 16 16 16 1	PAE_0034 4 4 1 1 2 0,25 4 1 1 1 0,25	PAE_0035 8 8 4 2 4 4 1 0,25 2 1 1 1 0,25	PAE_0036 8 2 2 16 1 0,25 2 1 1 0,25	PAE_0037 4 1 1 2 0,25 0,5 2 1 1 0,25	PAE_0038 8 4 2 4 1 0,25 2 1 1 0,25	PAE_0039 4 1 1 0,25 0,25 2 1 1 0,25	PAE_0040 4 8 1 4 4 8 0,25 32 8 1 1 4	PAE_0041 8 2 2 4 1 0,25 2 1 1 0,25	PAE_0042 8 4 2 4 2 0,25 2 1 1 0,25	PAE_0043 4 4 1 2 1 0,25 8 4 1 0,5	PAE_0044 16 8 4 2 4 2 0,25 2 1 1 1 0,25	PAE_0046 8 16 4 2 16 1 0,25 2 2 1 0,25	PAE_0047 8 8 4 2 16 2 0,5 8 4 1 0,25	PAE_0048 4 1 2 2 0,25 0,25 2 2 1 0,25	PAE_0050 8 4 2 16 1 0,25 2 1 1 0,25	PAE_0051 8 4 1 0,25 2 1 1 0,25	PAE_0053 8 4 2 16 1 0,25 2 1 1 0,25	PAE_0054 0,13 0,25 1 0,13 0,5 0,02 6 1 0,75 0,03	PAE_0055 8 4 2 16 2 0,25 2 1 1 0,25	PAE_0056 4 1 1 1 0,25 2 1 1 1 0,25	PAE_0057 8 8 4 2 0,25 2 1 1 0,25	PAE_0058 4 4 1 1 1 2 0,25 2 1 1 0,25	PAE_0059 4 8 1 1 2 0,25 2 1 1 0,25	PA01 4 4 2 1 4 2 0,5 2 1 1 0,25

Tabelle 12: Ergebnisse der phänotypischen Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung der 39 CF-Stämme, getestet durch das VITEK-2 System (AST Karte N-248, BioMeriéux). Die Werte entsprechen den minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) in mg/l. Die mit einem "E" markierten Stämme wurden mittels E-Test getestet. Die Interpretation der MHKs in sensible (grüne Färbung des Feldes), intermediäre (gelbe Färbung) und resistente Stämme (rote Färbung) erfolgte nach EUCAST-Richtlinien (EUCAST, Version 9.0, 2019).

			PACF_1	PACF_1	PACF_1	PACF_1	PACF_	PACF_1	PACF_	PACF_1	PACF_1	PACF_2	PACF_;	PACF_2	PACF_;	PACF_2	PACF_	PACF_3	PACF_:	PACF_:	PACF_:	PACF_:	PACF_:	PACF_4	PACF_	PACF_	PACF_	PACF_5	PACF_
Antibio	otikaklasse	Antibiotikum	06	15	16	29	13	37	15	86	194	205	21	229	23	281	'ω	305	34	36	37	38	39	110	43	46	47	541	57
	Popicillin	Piperacillin	4	128	4	16	128	128	16	4	4	32	8	8	32	256	128	8	128	2	256	8	64	12	16	4	256	4	4
	Fencinin	Piperacillin/Tazobactam	4	64	4	4	128	128	16	4	4	128	8	8	32	256	128	8	128	0,5	256	4	4	12	16	4	256	4	4
	Conhalosnarin	Ceftazidim	1	16	1	2	64	32	4	4	4	4	1	2	16	256	64	4	64	1,5	32	1	2	16	4	1	48	1	2
β-Laktam	Cephalosporm	Cefepim	2	8	1	2	64	16	4	8	8	4	2	4	16	256	16	2	64	8	32	8	1	256	8	1	32	1	8
р-∟акtam	Monobactam	Aztreonam	2	16	2	1	64	64	32	1	1	2	2	2	64	16	k.A.	16	64	0,38	16	1	1	32	16	1	12	1	1
	Carbananam	Imipenem	0,25	16	2	16	2	2	16	1	2	2	1	16	16	6	2	1	16	16	32	0,25	1	32	0,25	0,25	32	1	0,25
	Carbapeneni	Meropenem	0,25	2	0,5	4	4	1	4	0,25	0,25	0,25	1	2	16	6	1	0,25	16	0,75	12	0,5	0,25	3	0,25	0,25	32	0,25	0,25
		Amikacin	4	16	2	8	64	64	16	16	64	16	16	8	8	16	32	2	32	256	12	2	2	24	16	2	32	2	8
Amin	oglykosid	Gentamicin	4	8	1	8	16	16	8	8	16	4	16	4	4	4	16	1	16	32	6	1	1	8	4	1	8	1	4
		Tobramycin	1	2	1	1	8	16	2	1	8	1	1	1	1	3	4	1	16	12	2	1	1	2	1	1	3	1	1
Fluo	rchinolon	Ciprofloxacin	0,25	0,25	1	1	4	2	2	0,5	1	0,25	2	0,25	2	3	0,5	0,25	4	1,5	8	2	0,25	1	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5
Po	lymyxin	Colistin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	k.A.	0,5	0,5	0,5	k.A.	k.A.	0,5	0,5	k.A.	0,5	0,5	k.A.	0,5	0,5

т

			ACF_	PACF	ACF_6	ACF_6	ACF_6	ACF	ACF	ACF	ACF_8	ACF	ACF_	ACF_
Antibio	otikaklasse	Antibiotikum	570	6	657	62	672	73	74	76	313	85	87	94
	Ponicillin	Piperacillin	12	4	256	8	16	4	8	0,25	4	64	8	8
	Penicinin	Piperacillin/Tazobactam	6	8	256	8	8	4	12	0,38	4	128	16	8
	Conhalosporin	Ceftazidim	2	1	256	4	4	1	12	0,38	1	8	4	4
β-Laktam	Cephalosporm	Cefepim	8	4	256	2	2	2	6	3	1	16	8	1
	Monobactam	Aztreonam	8	1	12	16	16	1	8	0,125	1	1	4	4
	Carbananam	Imipenem	32	0,25	32	1	8	1	0,125	0,25	1	16	0,25	0,5
	Carbapeneni	Meropenem	3	0,25	48	0,25	1	0,25	0,5	0,38	0,25	4	1	0,5
		Amikacin	32	16	12	8	2	8	8	32	2	64	32	2
Amin	oglykosid	Gentamicin	12	4	1024	4	1	4	0,5	8	1	16	k.A.	1
		Tobramycin	1,5	1	1024	1	1	1	1	4	1	8	1	1
Fluo	rchinolon	Ciprofloxacin	3	1	2	0,25	0,25	0,25	4	3	0,25	2	0,5	0,25
Polymyxin		Colistin	k.A.	0,5	k.A.	0,5	k.A.	0,5	k.A.	k.A.	0,5	0,5	0,5	0,5

4.2 Ergebnisse der Genom-Sequenzierung

In Tabelle 13 befinden sich alle *P. aeruginosa*-Stämme, die für diese Arbeit sequenziert wurden. Die Sequenzrohdaten aller neu sequenzierten Stämme wurden mittels ASA³P-*Pipeline* prozessiert. Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung wurden an zwei Zeitpunkten, vor und nach dem *Scaffolding*-Schritt, aufgelistet und bewertet. Die durchschnittliche *Coverage* ("C") wird bei *paired-end Reads* wie folgt berechnet: C = N * L / G, wobei "N" die Anzahl der *Reads* (wird bei *paired-end* Läufen verdoppelt), "L" die durchschnittliche *Readlänge* in Basenpaaren (bp) und "G" die berechnete Genomgröße (in bp) darstellt.

Für die neu sequenzierten Stämme wurden Grenzwerte festgelegt, um die vergleichenden Genomanalysen nicht durch DNA-Sequenzen mit schlechter Sequenzierqualität zu beeinflussen. Die Anzahl der *Contigs* sollte vor dem *Scaffolding* n= 300 und nach dem *Scaffolding* n= 100 nicht überschreiten. Es wird mindestens eine 30-fache durchschnittliche *Coverage* vorausgesetzt. Die nicht in die Analysen aufgenommenen Stämme sind in Tabelle 13 hinter der Stammbezeichnung mit Fußnoten markiert.

Innerhalb der in die Genomanalysen eingeschlossenen Stämme liegt die Anzahl der *Reads* zwischen etwa n= 800.000 und n= 8,5 Millionen, durchschnittlich wurden etwa zwei Millionen *Reads* pro Stamm generiert. *PAE_0034*, der Stamm mit den meisten *Reads*, erreicht so eine durchschnittliche 314-fache *Coverage*, die nahezu vierfach höher ist als die durchschnittliche 79-fache *Coverage*. Assembliert wurden die Genome zu zwischen n= 67 und n= 217 *Contigs* (vor *Scaffolding*) mit N50-Längen zwischen n= 93.980 bp und n= 334.762 bp. Aufgrund der Überbrückung vieler kürzerer *Contigs* zu langen *Scaffolds* ist die Anzahl der *Contigs* vor dem *Scaffolding* um ein Vielfaches höher und die N50-Länge geringer. *PAE_0012* konnte so zu zwei langen *Scaffolds* ohne weitere *Contigs* zusammengeschlossen werden.

Die Genomgrößen aller Stämme reichen von etwa 6,17 – 7,26 Mbp und der GC-Gehalt variiert zwischen 64 und 66 %. Die meisten Gene besitzen die Stämme *PAE_0028, PAE_0033* und *PAE_0048*, deren Genome mit über 7 Mbp auch die größten sind. Die Anzahl der SNPs zum Referenzstamm *PAO1* variiert zwischen etwa n= 19.000 und n= 93.000. Als HI werden SNPs bezeichnet, die einen hohen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins haben, wie der Verlust oder Erwerb neuer Start- oder Stoppcodons und Rasterschub- (*frameshift-*) Mutationen. Zwischen n= 6 und n= 64 HI SNPs befinden sich unter den Stämmen.

Tabelle 13: Übersicht aller in dieser Arbeit sequenzierten Stämme mit Sequenzier- und Genomstrukturdaten, ermittelt durch ASA³P (Oliver Schwengers et al., 2019). Erkrankung= Erkrankung des Patienten, CAP= Ambulant erworbene Lungenentzündung (engl.: *community-acquired pneumonia*), CF= Mukoviszidose (engl.: *cystic fibrosis*), SNPs= Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl.: *single nucleotide polymorphisms*), HI SNPs= SNPs mit hohem Einfluss (*high impact*), die Erläuterung der Fußnoten hinter den Stammbezeichnungen (¹, ²) befindet sich unter der Tabelle.

			Vor Scafi	folding	Nach	n Scaffold	ling						
Stamm	Erkran-	Reads	Contigs	N50	Scaffolds	Contigs	N50	ø	Genom-	Gene	GC	SNPs	HI SNPs
Stamm	kung	[#]	[#]	[bp]	[#]	[#]	[bp]	Coverage	größe [bp]	[#]	[%]	[#]	[#]
PAE_0001	CAP	1.858.675	90	146.441	1	3	6.334.240	74,8	6.333.890	5.930	66	25.374	18
PAE_0002	CAP	1.123.824	124	149.989	3	7	4.781.901	44,1	6.736.612	6.378	65	49.292	20
PAE_0003 '	CAP	1.657.922	112	149.891		12	5.799.774	67,9	6 400 775	6 052	C.F.	61 251	20
PAE_0004		3.560.995	01	220.254	5	1	0.277.988	134,1	6 202 180	0.000	60 66	20 600	39 15
PAE_0005	CAP	1 938 512	130	156 107	5	4	6 281 586	80.4	6 405 850	5.993	65.5	54 108	21
PAE 0007	CAP	2.086.018	118	141.681	5	9	5.341.757	80.1	6.491.999	6.128	65	27.076	11
PAE 0008	CAP	1.207.886	99	180.935	3	5	5.883.828	47,2	6.874.051	6.534	65	24.565	11
PAE_0009	CAP	1.646.702	103	215.014	3	9	6.241.319	71,1	6.250.223	5.853	66	26.015	17
PAE_0010	CAP	5.937.073	80	258.880	3	1	3.911.453	222,9	6.802.526	6.500	65	26.863	11
PAE_0011	CAP	989.766	91	241.911	1	3	6.355.280	42,5	6.354.815	6.019	66	23.285	9
PAE_0012	CAP	4.018.397	67	251.115	2	0	6.338.980	166,4	6.376.260	5.996	65	27.284	16
PAE_0013	CAP	933.729	103	179.027	3	2	6.505.034	36,4	6.772.846	6.391	66	21.097	9
PAE_0014	CAP	2.100.915		120.050		2	6.295.291	85,4	6.626.358	6.304	65	25.571	10
PAE_0015 -	CAP	1.501.003	444 125	130.030		5	2 029 167		6 878 149	6 598	65	23 780	6
PAE_0010	CAP	2 023 912	214	149 859	11	12	3 537 150	80.2	6 708 991	6 393	65	26 807	19
PAE 0018	CAP	815.949	136	139.900	5	10	6.714.637	32.0	6.807.811	6.425	65	19.324	8
PAE 0019	CAP	1.461.176	200	100.383	5	37	4.867.511	59,6	6.506.525	6.202	65	48.466	31
PAE_0020	CAP	1.718.180	86	244.626	1	4	6.305.744	72,1	6.312.517	5.927	66	23.427	8
PAE_0021	CAP	3.821.315	127	156.914	3	11	5.353.781	157,2	6.626.429	6.237	65	23.470	15
PAE_0022	CAP	2.206.605	133	235.900	6	7	5.398.879	93,2	6.523.497	6.144	65	52.999	30
PAE_0023	CAP	966.315	189	104.910	4	24	5.087.083	40,2	6.566.653	6.211	65	56.970	28
PAE_0025	CAP	1.551.520	177	108.625	5	37	6.658.641	60,2	6.920.423	6.689	65	25.675	16
PAE_0026	CAP	4.771.041	123	210.813		10	3.602.454	198,5	6.437.968	6.051	65	53.806	21
PAE_0027		2.059.065	139	163.668		10	2.539.402	100.9	0.702.487	0.372	65 65	20 255	10
PAE_0028	CAP	1 595 145	136	145 227	3	9	3 734 499	63.7	6 714 190	6.347	65	51 845	26
PAE 0030	CAP	945.293	128	176.612	7	5	4.544.698	38.8	6.592.496	6.188	65	41.761	16
PAE 0031	CAP	1.040.159	134	137.311	5	5	6.414.385	42,8	6.432.802	6.043	65	44.366	18
PAE_0032	CAP	1.847.666	122	139.917	3	7	3.490.517	68,1	6.391.046	5.985	66	26.692	13
PAE_0033	CAP	2.235.773	210	160.441	10	22	5.644.220	84,2	7.063.835	6.749	65	28.036	24
PAE_0034	CAP	8.581.376	77	234.012	3	1	5.197.482	314,2	6.320.594	5.971	66	26.724	20
PAE_0035	CAP	3.466.721	152	149.734	5	16	5.480.600	140,9	6.684.943	6.288	65	27.682	13
PAE_0036	CAP	2.161.733	117	174.392	4	9	5.541.710	86,4	6.744.574	6.341	65	27.243	16
PAE_0037	CAP	2.743.622	152	141.181	8	/	2.086.068	102,9	6.678.245	6.312	65	52.412	26
PAE_0038		2.008.580	03	209.424	5	9	0.892.527 5 107 008	101,5	6 324 387	5 010	60 66	26.709	10
PAE_0039	CAP	2 250 934	142	159 432	2	7	6 697 942	88.8	6 774 567	6 4 5 7	65	53 210	30
PAE 0041	CAP	2.209.797	132	165.414	5	8	3.762.831	88.1	6.711.179	6.338	65	53.354	25
PAE_0042	CAP	2.528.404	123	201.206	3	7	5.658.309	98,7	6.861.602	6.516	65	29.624	14
PAE_0043	CAP	2.655.477	106	196.843	2	7	6.385.158	90,4	6.440.938	6.260	65	24.615	10
PAE_0044	CAP	1.696.074	136	147.900	4	24	5.579.727	67,1	6.705.812	6.339	65	25.540	8
PAE_0045 ²	CAP	294.647	738	22.082	9	47	4.489.032	11,6					
PAE_0046	CAP	1.506.231	100	181.712	3	3	3.615.155	64,2	6.254.950	5.873	65	27.042	16
PAE_0047	CAP	1.198.131	217	133.524		3	4.384.722	47,7	6.642.254	6.346	65	25.398	12
PAE_0048		951.177	149	140.554	12	14	4.477.241	30,1	7.022.949	0.707	64,5	20.134	14
PAE_0049		3 047 437	138	213 0/8	2	17	6 /07 /08	123.3	6 500 324	6 153	65	28 170	20
PAE_0050	CAP	1 356 363	141	155 585		9	6 466 162	55.7	6 468 655	6 116	65	25 482	13
PAE 0053	CAP	1.868.941	104	212.421	3	9	3.559.236	71.5	6.633.032	6.262	65	26.324	14
PAE 0054	CAP	1.884.500	105	171.369	5	1	6.202.394	74,8	6.415.538	6.143	65	25.014	37
PAE_0055	CAP	1.921.276	83	245.476	3	2	6.339.060	77,8	6.346.273	6.000	65	27.067	12
PAE_0056	CAP	1.011.659	125	150.253	3	1	6.667.343	38,6	6.764.186	6.409	64,5	21.713	12
PAE_0057	CAP	2.189.307	82	177.753	3	3	6.339.242	88,3	6.347.047	5.995	65	27.194	13
PAE_0058	CAP	2.726.855	71	277.718	1	1	6.337.184	110,3	6.354.114	5.955	65	26.669	11
PAE_0059	CAP	2.447.604	105	210.243		4	2.600.141	92,2	6.846.146	6.392	64,5	53.313	16
PACE 115	CF	1.596.276	114	170.551	2	20	0.278.382	64,5	6.391.393	0.067	65	50.749	29
PACE 115	CE	1.149.739 2.275 082	155	90.804 190.083	5	40 34	3.352.680 2.224.629	45,4 83.0	0.304.905 6 996 811	5.900	00 65	27 0/1	20 18
PACE 129	CF	2.215.002	93	196 662	3	19	6 151 273	96.4	6 168 643	5 802	65	27.518	16
PACE 135 ²	CF	1.809.812	732	129.849	3	636	6.568.266	66.0	0.100.040	5.002	00	21.010	10
PACF_137	CF	2.366.069	109	222.228	2	25	6.516.540	92,2	6.577.501	6.272	65	27.212	24
PACF_13	CF	2.225.045	136	189.772	3	47	6.380.437	88,0	6.413.620	6.062	65	27.525	18
PACE 147 ²	CF	636,477	322	62,299	8	24	3 584 877	23.5					

Fortsetzung der Tabelle 13.

			Vor Scaf	folding	Nach	n Scaffolo	ling						
Ctown	Erkran-	Reads	Contigs	N50	Scaffolds	Contigs	N50	ø	Genom-	Gene	GC	SNPs	HI SNPs
Stamm	kung	[#]	[#]	[bp]	[#]	[#]	[bp]	Coverage	größe [bp]	[#]	[%]	[#]	[#]
PACF_15	CF	1.460.158	121	127.402	2	12	6.633.637	54,6	6.756.041	6.326	65	50.711	32
PACF_186	CF	2.006.416	93	198.460	1	9	6.760.633	75,5	6.782.034	6.403	65	26.195	12
PACF_194	CF	1.961.612	128	143.666	3	31	4.227.206	74,0	6.449.636	6.065	65	26.181	10
PACF_205	CF	1.433.820	139	155.751	2	30	6.306.463	57,3	6.356.146	5.967	65	30.166	12
PACF_21	CF	1.044.164	119	153.409	2	3	6.787.193	39,6	6.789.884	6.430	65	21.736	12
PACF 212 ²	CF	2.463.592	274	252.111	3	199	3.361.767	99,1					
PACF_229	CF	2.109.390	98	155.912	4	6	6.533.304	80,9	6.659.221	6.374	65	26.974	17
PACF_23	CF	804.908	141	140.183	1	29	6.429.753	31,7	6.476.084	6.120	65	19.093	7
PACF 233 2	CF	2.204.208	280	139.361	8	119	3.403.484	83,7					
PACF 277 ²	CF	2.603.365	1111	141.639	2	1.025	6.089.483	95,8					
PACF_281	CF	1.618.378	111	182.274	3	24	6.352.638	65,2	6.386.189	6.089	65	93.014	45
PACF 305	CF	1.433.414	147	190.345	7	13	1.878.157	54,5	6.801.198	6.482	64	49.701	30
PACF 34	CF	1.357.330	176	126.951	3	49	4.674.055	50,4	6.834.027	6.584	65	50.768	57
PACF_36	CF	901.822	202	93.980	5	47	6.194.105	36,5	6.278.365	5.968	65	22.490	25
PACF_37	CF	1.321.056	103	184.290	3	10	4.047.461	51,3	6.595.525	6.188	65	49.967	19
PACF_38	CF	1.113.817	99	155.405	1	3	6.404.370	44,6	6.405.153	6.051	65	24.128	9
PACF_39	CF	2.004.210	109	196.967	3	23	6.332.322	79,4	6.349.988	5.972	65	26.985	12
PACF 3	CF	1.067.034	167	126.637	5	12	3.485.590	41,3	6.652.891	6.255	64,5	44.706	14
PACF 410	CF	1.672.638	215	137.912	5	83	3.490.317	63,6	6.694.544	6.342	65	53.044	46
PACF 43	CF	4.414.680	189	173.661	7	83	6.517.000	159,1	6.687.741	6.330	65	27.285	19
PACF 46	CF	1.072.423	145	135.547	7	6	4.863.473	41,2	6.678.306	6.302	65	44.933	24
PACF 466 ²	CF	766.390	139	125.814	3	16	6.756.091	29,4					
PACF 47	CF	1.671.005	135	135.864	4	12	3.303.209	59,5	6.940.590	6.560	65	23.647	14
PACF_541	CF	1.761.753	133	205.013	6	5	3.851.732	64,5	6.925.298	6.662	64	26.089	11
PACF_570	CF	2.131.091	137	236.594	1	46	6.558.650	81,9	6.584.389	6.253	65	26.252	11
PACF_57	CF	1.174.791	113	163.674	3	5	6.730.269	44,7	6.762.854	6.511	65	23.355	11
PACF 61 ²	CF	1.306.082	237	127.193	7	118	4.433.889	50,7					
PACF 640 ²	CF	2.238.750	472	168.242	7	341	1.778.711	79,6					
PACF_657	CF	2.136.482	171	176.664	2	62	6.711.938	80,0	6.755.953	6.488	65	53.778	64
PACF_662	CF	1.479.509	89	245.767	1	13	6.388.535	58,6	6.394.559	6.007	65	27.386	7
PACF_672	CF	1.411.814	156	162.345	3	43	6.633.595	53,5	6.755.505	6.354	65	49.600	21
PACF 6	CF	1.179.513	109	133.759	2	10	6.370.295	47,2	6.378.500	6.031	65	24.984	14
PACF 73	CF	2.350.733	159	213.369	1	82	6.294.759	93,8	6.344.433	5.944	65	30.645	21
PACF_74	CF	1.201.786	96	194.209	3	6	6.671.242	45,1	6.767.854	6.526	65	23.996	21
PACF_76	CF	4.679.019	119	334.762	3	15	6.630.750	179,0	6.686.696	6.468	65	26.111	17
PACF 813	CF	1.743.800	116	205.046	1	24	6.860.072	64,6	6.878.955	6.565	64	26.053	11
PACF_85	CF	2.114.428	92	267.929	3	15	6.105.416	85,1	6.307.972	5.988	65	26.169	13
PACF_87	CF	875.893	210	131.682	4	89	5.388.777	33,8	6.564.957	6.210	65	21.696	12
PACF 881 ²	CF	1.642.453	2201	114.868	3	2.061	4.556.272	49,9					
PACF_94	CF	1.639.210	147	147.641	7	27	4.005.161	61,5	6.762.422	6.393	65	51.553	26

¹ PAE_0003 und PAE_0049 zeigten auf Blut- und MacConkey-Agar deutliche Zeichen einer Mischkultur durch Unterschiede in den Koloniegrößen und –morphologien. Durch Sequenzierung der subkultivierten Stämme konnte bestätigt werden, dass es sich um unterschiedliche Stämme handelt. Die Entnahme zweier Stämme desselben Patienten sollte die Analysen jedoch nicht beeinflussen. Aufgrund dessen wurden die Stämme in den Analysen dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

² Diese markierten Stämme überschritten in mindestens einer der Kategorien "*Contigs* vor *Scaffolding*" oder "*Contigs* nach *Scaffolding*" die Grenzwerte, bzw. erreichten den Schwellenwert bei der "durchschnittlichen *Coverage*" nicht und wurden in dieser Arbeit von den Analysen ausgeschlossen.

4.3 Zuordnung zur Populationsstruktur

Der Vergleich der CAP- und CF-Stämme in Bezug auf die Populationsstruktur wird anhand der Serotypen (4.3.1), der Multilokus-Sequenztypen (MLST, 4.3.2) und der berechneten phylogenetischen Bäume durchgeführt. Die Zuordnung zu den phylogenetischen Gruppen kann anhand der Position im phylogenetischen Baum bestimmt werden. Auch anhand der durch ASA³P (Oliver Schwengers et al., 2019) zum Referenzstamm *PAO1* bestimmten SNPs (Tabelle 13) lassen sich zumindest die phylogenetischen Hauptgruppen 1 und 2 erkennen. Die SNPs der CAP- (Mittelwert: 33.169 SNPs) und CF-Stämme (34.530 SNPs) sind bimodal verteilt, weshalb die SNPs nicht mittels t-Test, sondern mittels Mann-Whitney-U-Test, verglichen wurden. Der Mittelwert aller analysierten Gruppe 1-Stämme (CAP und CF) von 25.875 SNPs zeigt deutliche Differenzen zu dem Mittelwert aller Gruppe 2-Stämme von 50.909 SNPs (MWUT, p < 0,0001). Um putative Differenzen zwischen CAP- und CF-Stämmen festzustellen, wurden die SNPs innerhalb der jeweiligen phylogenetischen Gruppen miteinander verglichen: Statistisch zeigte sich, dass weder innerhalb der Gruppe 1 noch innerhalb der Gruppe 2 Unterschiede der SNPs zwischen CAP- und CF-Stämmen festgestellt werden konnten (MWUT, Gruppe 1: p = 0,8966, Gruppe 2: p = 0,1616).

4.3.1 *In silico*-Serotypisierung

Die *in silico*-Serotypisierung mittels PAst (Thrane et al., 2016) ergab insgesamt 11 unterschiedliche O-Antigen Serotypen. Die Serotypen zeigen unter CAP- und CF-Stämmen eine ähnliche Verteilung (Abbildung 10-A). Die am häufigsten auftretenden Serotypen in beiden Gruppen sind O6 (CAP: 28 %, n= 15 und CF: 21 %, n= 8), O11 (17 %, n= 9 und 18 %, n= 7) und O1 (11 %, n= 6 und 15 %, n= 6). Es zeigt sich ein geringfügig häufigeres Vorkommen von O9 unter den CF-Stämmen (15 %, n= 6) als unter den CAP-Stämmen (6 %, n= 3). Die Serotypen O2 und O12 wurden nur jeweils zweimal unter den CAP-Stämmen identifiziert.

Als "nt" sind die Stämme markiert, die nicht eindeutig serotypisierbar waren. Es wurden keine mehrfach typisierbaren Isolate gefunden. Zwei Stämme konnten nicht sicher typisiert werden: PAE_0019 mit 54 % Abdeckung der Länge des OSA-Genbereiches (O11) und PACF 281 mit 2 % Abdeckung (O1). Die PAst-Analyse ergab bei allen anderen Stämmen eine Abdeckung der Genregion von mindestens 98 %. Unter den Referenzstämmen lag die Abdeckung zwischen 87,5 % (PAO1) und 95 % (DK2). In Abbildung 10-B sind die phylogenetischen Hauptgruppen, wie in Abbildung 7, farblich hervorgehoben. Die Verteilung der Serotypen innerhalb der phylogenetischen Hauptgruppen ist jeweils in den nebenstehenden Kreisdiagrammen dargestellt. Die Stämme PACF 281 (nt), PAE 0023 (O5) werden in diesem Vergleich nicht berücksichtigt, weil sie nicht den Hauptgruppen 1 und 2 zuzuordnen sind. Die genutzten Referenzstämme werden ebenfalls nicht berücksichtigt. Die phylogenetische Gruppe 1 zeigt eine höhere Serotypenvariabilität als Gruppe 2. Innerhalb der Gruppe 1 zeigen die CAP-Stämme n= 10 und die CF-Stämme n= 6 unterschiedliche Serotypen. Der Serotyp O6 ist in Gruppe 1 mit 39 % (CAP, n= 15) und 30 % (CF, n= 8) am häufigsten vertreten. Unterschiede in der Verteilung innerhalb Gruppe 1 zeigen sich im Serotyp O9, der 8 % (n=3) der CAP-Stämme und 22 % (n=6) der CF-Stämme zugeordnet ist (p=0,1613).

Innerhalb der Gruppe 2 ist O11 deutlich am häufigsten vertreten (CAP: 62 %, n= 8 und CF: 64 %, n= 7). Weitere Serotypen in Gruppe 2 sind O1 (CF), O3 (CAP), O7 (CAP, CF) und O10 (CAP, CF) sowie ein nicht typisierbarer Stamm. O10 ist der einzige Serotyp, der nicht in Gruppe 1 nachgewiesen werden konnte.

4.3.2 Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)

Die Multilokus-Sequenztypisierung ergab eine große Vielzahl unterschiedlicher ST (Sequenztypen). Unter den CAP- und CF-Stämmen wurden entsprechend 38 und 26 unterschiedliche ST gefunden. 31 CAP-Stämme (58 %) und 22 CF-Stämme (56 %) enthalten ein einzigartig vorkommendes Allelprofil. Entsprechend waren sieben ST (CAP) und vier ST (CF) in mehr als einem Stamm vorhanden. Der häufigste ST in beiden Gruppen ist der ST-395 in jeweils vier Stämmen, dann der ST-17 mit Vorkommen in drei CAP-Stämmen und zwei CF-Stämmen. Unter den CAP-Stämmen wurden fünf neue ST identifiziert, von denen vier durch eine neue Kombination bereits bekannter Allele definiert wurden. Es wurde nur ein Stamm mit einem neuen ST durch ein neues Allel gefunden. Unter den CF-Stämmen mit neuem ST befindet sich nur ein Stamm mit neuem Allelprofil. Die anderen sechs neuen ST enthalten neu definierte Allele. Es wurden auch weit verbreitete Klone gefunden, die in der Literatur auch als Hochrisikoklon ("high-risk clones", ST-111, ST-175, ST-235) bezeichnet werden, weil sie häufig als resistente Problemkeime in Krankenhäusern identifiziert werden. Zwei CAP-Stämme können dem ST-111 und ein Stamm dem ST-235 zugeordnet werden. Unter den CF-Stämmen wurde kein Hochrisikoklon identifiziert.

Es zeigte sich auch, dass nahezu alle mehrfach vorkommende Sequenztypen den gleichen Serotypen besitzen. So konnte der ST-17 zu O1, ST-111 zu O12, ST-164 zu O9, ST-260 zu O6, ST-274 zu O3, ST-319 zu O11, ST-395 zu O6, ST-499 zu O1, ST-560 zu O7, ST-620 zu O11 und ST-2644 zu O11 geordnet werden. Die Stämme *PACF_34* und *PACF_657* haben das gleiche Allelprofil, die gleiche Mutation in *nuoD* und haben den Serotypen O11. Ausnahmen sind die Stämme *PAE_0021* und *PACF_47*, die mit ST-244 dem gleichen ST, aber mit entsprechend O2 und O5 unterschiedlichen Serotypen zugeordnet sind.

Tabelle 14: Auflistung der Referenzstämme sowie der CAP- und CF-Stämme mit den Allelen der 7 Haushaltsgene, dem Multilokus-Sequenztyp (MLST), dem Serotyp, der Abdeckung des genetischen OSA-Bereiches ("%OSA", Serotyp bestimmend) und der phylogenetischen Gruppe. NEU= neues, bisher undefiniertes Allel, Neu (AP)= Neues, bisher undefiniertes Allelprofil, OSA= *O-specific antigen*, nt= *nontypeable* (nicht typisierbar).

Stamm	acsA	aroE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	trpE	MLST	Serotyp	%OSA	Phylogen. Gruppe
PAO1	7	5	12	3	4	1	7	549	02	97.46	1
UCBPP-PA14	, ,	1	16	12	1	6	3	253	010	07,40	2
DK2	17	5	10	18	4	10	3	386	03	93,03	1
LESB58	6	5	11	3	4	23	1	146	06	94,97	1
NCGM2 S1	38	11	3	13	1	20	4	235	011	92,90	2
PA7	87	34	43	37	53	107	126	1195	012	91,71	3
PAE 0001	17	5	1	3	4	15	7	262	06	07,00	1
PAF 0002	5	5	57	13	1	74	3	671	010	99,20	2
PAE 0004	123	14	79	3	10	7	124	205	03	99,40 00 70	2
PAE 0005	119	10	3	5	64	6	77	550	09	100.00	1
PAE 0006	5	8	119	6	12	6	3	1197	010	100,00	2
PAE 0007	39	6	9	11	3	3	2	1684	02	00.79	1
PAE 0008	11	5	1	7	q	4	7	17	01	99,70	1
PAE 0009	17	22	91	5	2	10	1	Neu(AP)	06	99.62	1
PAE 0010	6	5	1	1	1	12	1	395	06	100.00	1
PAE_0011	16	22	6	74	2	41	2	285	09	100,00	1
PAE_0012	11	22	11	131	3	53	1	Neu(AP)	O6	99,62	1
PAE_0013	11	5	1	7	9	4	7	17	01	99,67	1
PAE_0014	11	5	1	7	9	4	7	17	01	99,35	1
PAE_0016	6	5	1	1	1	12	1	395	O6	100,00	1
PAE_0017	11	5	6	3	4	15	7	Neu(AP)	04	100.00	1
PAE_0018	40	5	11	3	27	15	10	161	O6	99,62	1
PAE_0019	13	8	9	3	1	6	9	316	nt	53,63	2
PAE_0020	17	5	12	98	4	14	10	611	O5	99,85	1
PAE_0021	17	5	12	3	14	4	7	244	02	98,85	1
PAE_0022	5	4	3	3	1	11	8	319	011	100,00	2
PAE_0023	43	153	NEU	78	48	24	96	Neu(guaA)	O5	98,00	4
PAE_0025	1	5	1	11	4	10	10	164	O9	99,74	1
PAE_0026	5	11	3	5	1	12	130	2644	011	100,01	2
PAE_0027	5	5	57	13	1	40	3	560	07	99,40	2
PAE_0028	17	5	5	4	4	4	3	111	012	99,78	1
PAE_0029	5	4	5	5	5	20	4	532	011	100,01	2
PAE_0030	5	5	57	13	1	40	3	560	07	99,40	2
PAE_0031	5	11	3	5	1	12	130	2644	011	99,81	2
PAE_0032	6	5	6	7	4	4	7	1705	011	99,86	1
PAE_0033	17	5	5	4	4	4	3	111	012	99,78	1
PAE_0034	6	20	1	3	4	4	2	132	06	99,64	1
PAE_0035	14	5	10	7	4	13	7	260	06	99,64	1
PAE_0036	39	5	9	11	27	5	2	277	05	99,68	1
PAE_0037	38	11	3	13	1	2	4	235	011	100,00	2
PAE_0038	6	5	1	1	1	12	1	395	06	100,00	1
PAE_0039	11	293	0	3	4	4	19	3187	07	100,00	1
PAE_0040	32	8	3	18	1	123	118	209	011	100,00	2
PAE_0041	15	4 2	3	11	1	15	1	290 782	06	00.62	2 1
PAF 0042	6	5	1	1	1	12	1	305	00	99,02 100.00	1
PAF 0044	22	5	11	7	1	12	7	274	03	100,00	1
PAF 0046	30	5	11	6	1	12	7	502	03	00,00	1
PAE 0040	173	5	5	223	3	- 1 13	a	3170	01	99,70 100.05	1
PAE 0048	11	20	1	65	4	4	10	381	05	99.02	1
PAE 0050	35	24	36	11	4	15	14	257	06	99.62	1
PAE_0051	15	5	11	3	2	4	3	508	O3	100,00	1

Stamm	acsA	aroE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	trpE	MLST	Serotyp	%OSA	Phylogen. Gruppe
PAE_0053	6	5	4	11	4	12	16	840	O3	99,70	1
PAE_0054	11	8	11	5	4	4	7	412	O6	99,79	1
PAE_0055	11	5	7	27	2	7	33	499	01	99,68	1
PAE_0056	14	5	10	7	4	13	7	260	O6	99,62	1
PAE_0057	11	5	7	27	2	7	33	499	01	99,68	1
PAE_0058	17	5	6	3	4	12	10	Neu(AP)	O6	99,64	1
PAE_0059	9	7	63	13	8	7	8	620	O11	100,00	2
PACF_106	47	4	5	33	1	6	40	207	01	99,03	2
PACF_115	5	8	25	28	11	4	34	436	01	99,35	1
PACF_116	40	6	19	11	4	15	9	709	O5	99,74	1
PACF_129	11	NEU	7	27	2	7	33	Neu(aroE)	01	99,36	1
PACF_13	81	5	9	11	3	6	12	769	O5	99,73	1
PACF_137	1	NEU	1	11	4	10	10	Neu(aroE)	O9	99,40	1
PACF_15	103	8	5	5	1	6	4	377	07	100,01	2
PACF_186	11	5	1	7	9	4	7	17	01	99,67	1
PACF_194	23	5	11	7	1	12	137	1068	O3	100,02	1
PACF_205	6	5	26	3	3	38	61	496	O9	99,65	1
PACF_21	11	5	1	7	9	4	7	17	01	99,67	1
PACF_229	1	5	1	11	4	10	10	164	O9	99,65	1
PACF_23	15	5	1	3	2	12	7	110	O6	99,62	1
PACF_281	87	34	114	37	86	100	170	2211	nt	1,94	3
PACF_3	9	7	63	13	8	7	8	620	O11	99,57	2
PACF_305	5	4	3	3	1	11	8	319	O11	100,00	2
PACF_34	13	4	5	5	NEU	7	15	Neu(nuoD)	011	99,57	2
PACF_36	5	55	11	74	2	10	NEU	Neu(trpE)	O9	100,17	1
PACF_37	5	5	57	13	1	40	3	560	07	99,44	2
PACF_38	11	5	11	11	3	27	7	198	O3	99,83	1
PACF_39	39	6	4	14	4	6	2	908	O5	99,74	1
PACF_410	9	7	63	13	8	7	8	620	011	99,57	2
PACF_43	17	3	5	4	4	4	3	966	04	100,00	1
PACF_46	5	4	3	3	1	11	8	319	011	99,26	2
PACF_47	17	5	12	3	14	4	7	244	05	99,07	1
PACF_541	6	5	1	1	1	12	1	395	06	99,62	1
PACF_57	6	5	1	1	1	12	1	395	06	99,62	1
PACF_570	23	5	11	/	1	12	(2/4	03	99,70	1
PACF_6	11	5	1	2	2	15	2	399	09	99,65	1
PACF_657	13	4	5	5	NEU	/	15	Neu(nuoD)	011	99,57	2
PACF_662	6	5	36	3	3	15	2	2123	09	99,65	1
PACF_6/2	13	8	9	3	1	17	15	309	011	100,00	2
PACF_73	17	14	11	5	1	15	1	Neu(AP)	06	99,63	1
PACE_74	6	5	1	NEU	1	12	1	Neu(mutL)	06	100,02	1
PACE 042	6	5	1	1	1	12	1	395	06	99,68	1
PACE 25	20	5	1 50	1	1	12	1	390	00	100,00	1
PACE 07	20	5 F	10	7	4	10	44	260		99,35	1
PACE 94	4	4	16	, 12	4	6	3	250 253	010	99,62 100.00	2

Fortsetzung der Tabelle 14.



Abbildung 7: Gesamtdarstellung der Populationsstruktur der CAP-Stämme (n= 53, rote Punkte), CF-Stämme (n= 39, blaue Punkte), Referenzstämme (n= 6, grüne Punkte) und der geschlossenen *P. aeruginosa*-Genome (RefSeq-Datenbank, n= 175, ohne Markierungen an der Astenden) zur Veranschaulichung der phylogenetischen Distanz der Hauptgruppen (1 und 2) zur Gruppe 3. Der durch EDGAR (Blom et al., 2019) mit der Maximum-Likelihood-Methode erstellte phylogenetische Baum ist in Abbildung 8 und Abbildung 9 mit gleicher farblicher Markierung vergrößert und komprimiert dargestellt. Die phylogenetische Gruppe 1 ist grau, Gruppe 2 beige, Gruppe 3 violett und Gruppe 4 grün gefärbt.

Abbildung 7 zeigt berechnete phylogenetische Distanz zwischen Isolaten der Gruppen zueinander sowie das Verhältnis der Anzahl der Stämme in den Gruppen. Gruppe 1 stellt mit 71,7 % der CAP- und 69,2 % der CF-Stämme die größte Hauptgruppe dar. Die Gruppe 2 bildet mit 26,4 % der CAP- und 28,2 % der CF-Stämme ebenfalls eine Hauptgruppe. Stämme der phylogenetischen Gruppe 3 unterscheiden sich auf Genomebene stark von den anderen, was durch die große Distanz im phylogenetischen Baum visualisiert wird. Die Stämme *PAE_0023* und *PACF_281* sind die einzigen Vertreter der Gruppen 4 und 3 unter den sequenzierten Stämmen. In Abbildung 8 und Abbildung 9 sind jeweils die Positionen der CAP- (rot), der CF- (blau) und der Referenzstämme (grün) im phylogenetischen Baum dargestellt. In Abbildung 10 ist die Verteilung bzw. das Clustering der Serotypen im phylogenetischen Baum farblich dargestellt. Die gruppenspezifische Verteilung der Serotypen ist anhand der nebenstehenden Kreisdiagramme abgebildet.



Abbildung 8: Darstellung des komprimierten Baumes aus Abbildung 7. In dieser Darstellung sind mit roten Strichen die CAP-Stämme und mit grünen Strichen die Referenzstämme gekennzeichnet. Die Gruppen sind farblich wie in Abbildung 7 markiert.



Abbildung 9: Darstellung des komprimierten Baumes aus Abbildung 7. In dieser Darstellung sind mit blauen Pfeilen die CF-Stämme und mit grünen Pfeilen die Referenzstämme gekennzeichnet. Die Gruppen sind farblich wie in Abbildung 7 markiert.



Abbildung 10-A: Verteilung der Serotypen innerhalb der CAP- und CF-Stämme. Abbildung 10-B: Phylogenetischer Baum der CAP- (rote Punkte), CF- (blaue Punkte) und der Referenzstämme (grüne Punkte). Die Serotypen wurden farblich nach der Legende hervorgehoben und teilweise in Cluster dargestellt. Die Kreisdiagramme zeigen die Verteilungen der Serotypen innerhalb der jeweiligen Vertreter der CAP- und CF-Stämme der phylogenetischen Gruppen 1 und 2.

4.4 Komparative Genomanalyse

4.4.1 *Core-*/Pangenom-Analyse

Abbildung 11 zeigt, dass das *Core*-Genom mit zunehmender Anzahl analysierter Stämme stetig kleiner und das Pangenom größer wird. Das Pangenom nähert sich dabei keinem Wert an, sondern steigt kontinuierlich. Die Analyse der CAP-Stämme mit EDGAR (Blom et al., 2019) ergab eine Pangenomgröße von 13.772 Genen und eine Größe des *Core*-Genoms von 4.570 Genen (Markierung 1). Mit zusätzlichen CF-Stämmen ist das Pangenom auf 17.121 Gene angestiegen und das *Core*-Genoms auf 4.032 Gene gesunken (Markierung 2). Der phylogenetisch weit entfernte Stamm *PACF_281* (Gruppe 3) ist sowohl anhand der sprunghaften Verkleinerung des *Core*-Genoms als auch an der Vergrößerung des Pangenoms an 67. Stelle zu erkennen. Dies ist im Bereich der geschlossenen *P. aeruginosa*-Genome der RefSeq-Datenbank (NCBI) mehrmals zu beobachten. Mit den zusätzlich 175 geschlossenen Genomen ergab das Pangenom eine Größe von 24.638 Genen. Das *Core*-Genom hat sich fast halbiert auf eine Größe von 2.115 Genen (Markierung 3).



Abbildung 11: Der durch EDGAR (Blom et al., 2019) berechnete *Core-*/Pangenom*development-plot* zeigt die Entwicklung der Größe (Genanzahl) des *Core*-Genoms (rote Linie) und des Pangenoms (blaue Linie) mit zunehmender Anzahl analysierter Stämme. Markierung 1: CAP-Stämme (n= 53), Markierung 2: zusätzliche CF-Stämme (n= 92), Markierung 3: zusätzliche geschlossene Genome der RefSeq-Datenbank (n= 267).

Bei einem Vergleich von Abbildung 12-A (CAP) und Abbildung 12-B (CF) zeigt sich bei den CF-Stämmen ein um ca. 200 Gene kleineres *Core*- und ein um ca. 600 Gene kleineres *Accessory*-Genom, wobei hier die geringere Anzahl analysierter Stämme beachtet werden muss. Statistisch konnte durch den Chi-Quadrat-Test kein Zusammenhang in Bezug auf den Anteil der *Core*-Gene am Pangenom der CAP- und CF-Stämme festgestellt werden (p = 0,4180). Die CF-Stämme enthalten im Vergleich mehr *Singletons* (Chi², p = 0,0033) und weniger *Accessory*-Gene (Chi², p = 0,0006) als
die CAP-Stämme. Werden die CAP- und die CF-Stämme in einer Analyse zusammengefasst (Abbildung 12-C), ergibt sich ein *Core*-Genom von ca. 4000 Genen. Bei durchschnittlich 6313 Genen, die CAP- und CF-Stämme bei der Analyse mit EDGAR aufweisen, ergibt sich ein *Core*-Genom, das rund 63 % der durchschnittlichen Genomgröße der Stämme ausmacht. Wie ebenfalls in Abbildung 11 gezeigt, ist in Abbildung 12-D nach Analyse von allen 267 Stämmen das *Core*-Genom mit 2118 Genen auf ca. 34 % der durchschnittlichen Genomgröße gesunken.



Abbildung 12: Prozentuale Aufteilung des Pangenoms in *Accessory*-Genom, *Singletons* und *Core*-Genom. A und B zeigen die Verteilung unter den CAP-(A) und CF-Stämmen (B), jeweils mit zu dem Referenzstamms *PAO1*. C zeigt die Verteilung unter den CAP- und CF-Stämmen mit *PAO1* als Referenz und D unter den CAP-, CF-Stämmen und den geschlossenen *P. aeruginosa*-Genomen der RefSeq-Datenbank (NCBI-Genome).

Die durch EDGAR für jeden Stamm ermittelte Anzahl der Gene des *Core*-Genoms, des *Accessory*-Genoms und der *Singletons* sind in Abbildung 13-A (CAP-Stämme) und Abbildung 13-B (CF-Stämme und *PAO1*) dargestellt. Die meisten *Singletons* enthalten die Stämme *PACF_281* (n= 341, phylogenetische Gruppe 3), *PAE_0023* (n= 208 *Singletons*, Gruppe 4), *PACF_47* (n= 192), *PACF_116* (n= 191), *PAE_0028* (n= 162) und PAE_0018 (n= 145) aus der Gruppe 1 sowie *PAE_0004* (n= 139) und *PAE_0029* (n= 136) aus Gruppe 2. Durchschnittlich wurden unter den CAP-Stämmen 51,7 *Singletons* und unter den CF-Stämmen 64,3 *Singletons* pro Stamm identifiziert.

Werden bei der Berechnung die Stämme aus den Gruppen 3 (*PACF_281*) und 4 (*PAE_0023*) ausgenommen, liegt die durchschnittliche Anzahl der *Singletons* bei 48,7 (CAP), bzw. 56,3 (CF).



Abbildung 13: Übersicht der der in Abbildung 12-C berechneten Anzahl der *Core*-Gene, *Accessory*-Gene und der *Singletons*. Dargestellt sind die CAP- (A), CF-Stämme und der Referenzstamm *PAO1* (B), sortiert nach Anzahl der *Accessory*-Gene, berechnet durch EDGAR (Blom et al., 2019).

4.4.2 Funktionale COG-Klassifikation

Die funktionale Aufteilung der Gensets (*Core-* und *Accessory-*Gene sowie der *Singletons*) auf die COG- (*Cluster of Orthologous Groups*)-Kategorien ist in Abbildung 14-A für die CAP- und in Abbildung 14-B für die CF-Stämme dargestellt. In Abbildung 15 sind die Differenzmengen CAP/CF (CAP-CF) der prozentualen Aufteilung der Gensets und der Kategorien ersichtlich. Das *Core-*Genom ist sowohl bei den CAP- als auch bei den CF-Stämmen hochkonserviert und die prozentuale Verteilung auf die COG-Kategorien zeigt zwischen den Stämmen eine maximale Differenz von 0,4 %. Nach den unbekannten Funktionen [S] werden die meisten *Core-*Gene dem Transport und Metabolismus von Aminosäuren [E] sowie der Transkription [K] zugeordnet.

Die Unterschiede zwischen CAP- und CF-Stämmen beim *Accessory*-Genom zeigen sich übersichtlicher bei Betrachtung der drei übergeordneten COG-Kategorien (vier mit "Wenig charakterisiert"). Es zeigt sich, dass den zellulären Prozessen und Signalen mit insgesamt 21,9 % (n= 892) der CAP-*Accessory*-Gene ein größerer Anteil zugeordnet ist als unter den CF-*Accessory*-Genen (20,0 %, n= 724) (Chi², p = 0,0350). Hier machen die zusätzlichen 1,5 % *Accessory*-Gene (n= 99), die unter den CAP-Stämmen an Replikation, Rekombination und Reparatur [L] beteiligt sind, den größten Teil aus (Chi², p = 0,0289). Dem Metabolismus sind mit 31,3 % (n= 1273) bei den CAP-Stämmen vergleichsweise weniger *Accessory*-Gene als bei den CF-Stämmen 34,0 % (n= 1234)

zugeordnet (Chi², p = 0,0106). Die größte Differenz liegt hier beim Transport und Metabolismus von Kohlenhydraten [G], deren Funktion 1,2 % mehr CF-*Accessory*-Gene erfüllen (Chi², p = 0,0134).



Abbildung 14: Prozentuale Aufteilung der *Core*-Gene, *Accessory*-Gene und der *Singletons* der CAP-Stämme (A) und CF-Stämme (B) auf die COG-(*Cluster of Orthologous Groups*) Kategorien, berechnet von BPGA (Chaudhari et al., 2016).

Die größten Unterschiede zwischen den CAP- und CF-Stämmen sind jedoch unter den *Singletons* zu beobachten. In der übergeordneten Kategorie "Informationsspeicherung und -prozessierung" erfüllen etwa 2,8 % mehr *Singletons* der CF-Stämme Funktionen der Signaltransduktion [T] (Chi², p = 0,0048) und des intrazellulären Transports [U] (Chi², p = 0,0219). Unter den CAP-Stämmen kodieren etwa 4,4 % *Singletons* mehr für Replikations-, Rekombinations- und Reparaturgene [L] als unter den CF-Stämmen (Chi², p < 0,0001). Die Kategorie "Metabolismus" ist zwischen den CAP- und CF-Stämmen insgesamt relativ ausgeglichen. Allerdings sind unter den CF-Stämmen insgesamt etwa 6,7 % mehr *Singletons* dem Transport und Metabolismus von Kohlenhydraten [G] (Chi², p < 0,0001) und Aminosäuren [E] (Chi², p < 0,0001) zugeordnet. Unter den CAP-Stämmen sind etwa 6,5 % mehr *Singletons* für den Transport und Metabolismus von Lipiden [I] (Chi², p < 0,0001) sowie für die Synthese von Sekundärmetaboliten [Q] (Chi², p < 0,0001) zuständig.



Abbildung 15: Differenzmengen CAP/CF (CAP–CF) zwischen den prozentualen Anteilen der *Core*- und *Accessory*-Gene sowie der *Singletons* auf die COG-(*Cluster of Orthologous Groups*) Kategorien. Ein Wert in positiver Richtung steht für einen prozentual höheren Anteil der *Core*- und *Accessory*-Gene sowie der *Singletons* unter CAP-Stämmen gegenüber den CF-Stämmen, ein Wert in negativer Richtung steht entsprechend für ein höheres prozentuales Vorkommen bei den CF-Stämmen. Die Kurzform zur Abkürzung der COG-Kategorien wurde analog zu Abbildung 14-A und B gewählt. Statistisch wurde der Anteil der *Core*-, *Accessory*-Gene sowie der Singletons der einzelnen Kategorien der CAP- und CF-Stämme durch den Chi-Quadrat-Test miteinander verglichen. Die Sterne stehen für die p-Werte (siehe 3.4).



Abbildung 16-A: Zirkuläre Genomdarstellung durch BLASTn-Analyse des Referenzstamms *UCBPP-PA14* gegen die 53 CAP- und 39 CF-Stämme, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012). Von außen nach innen: Gene des Referenzstamms, Stämme nach Ähnlichkeit zum Referenzstamm von außen nach innen sortiert (Stämme in B aufgelistet), GC-Gehalt, GC-*Skew*. Hervorgehoben sind die 22 identifizierten genomischen Inseln. Die Legende befindet sich in C.

Tabelle 15: Auflistung der in Abbildung 16-A markierten genomischen Inseln mit den zwei gängigen Genlokus-Bezeichnungen (*"Identifier"*), der Länge (in bp) und dem GC-Gehalt (in %) im Referenzgenom *UCBPP-PA14*. Bei der Wahl der Ankergene wurde sich an Klockgether et al. 2011 orientiert. REP= *Replacement Island*.

		Von			Bis				
	Identifier	Identifier		Identifier	Identifier				
RGP	"old locus tag"	"locus tag"	Position in bp	"old locus tag"	"locus tag"	Position in bp	Länge (bp)	GC-Gehalt (%)	Anmerkung
1	PA14_00510	PA14_RS00210	42934	PA14_00530	PA14_RS00220	55304	12.371	65,07	
2	PA14_03160	PA14_RS01265	277003	PA14_03420	PA14_RS01420	313638	36.636	59,72	
3	PA14_07960	PA14_RS03185	685881	PA14_08160	PA14_RS03275	701298	15.418	64,89	
4	PA14_15340	PA14_RS06105	1299242	PA14_15670	PA14_RS06280	1333900	34.659	61,93	
5	PA14_22075	PA14_RS08920	1918863	PA14_22290	PA14_RS09025	1942528	23.666	52,03	
6	PA14_23360	PA14_RS09460	2026846	PA14_23470	PA14_RS09500	2043607	16.762	48,08	O-Antigen-Cluster (REP)
7	PA14_27710	PA14_RS11235	2402727	PA14_28730	PA14_RS11700	2474498	71.772	64,93	
8	PA14_28730	PA14_RS11700	2474142	PA14_28895	PA14_RS11765	2500235	26.094	60,28	
9	PA14_30840	PA14_RS12585	2676132	PA14_31290	PA14_RS12815	2722229	46.098	65,15	
10	PA14_32770	PA14_RS13360	2845921	PA14_32860	PA14_RS13410	2877069	31.149	61,01	
11	PA14_33290	PA14_RS13570	2925613	PA14_33370	PA14_RS13605	2937790	12.178	62,43	CRISPR-Cas-System Typ I-f
12	PA14_33600	PA14_RS13700	2955085	PA14_33690	PA14_RS13725	2990358	35.274	65,84	Pyoverdinsynthese-Cluster (REP)
13	PA14_35690	PA14_RS14510	3172559	PA14_36050	PA14_RS14660	3211497	38.939	60,57	
14	PA14_43050	PA14_RS17490	3829632	PA14_43110	PA14_RS17515	3841622	11.991	61,64	
15	PA14_46490	PA14_RS18875	4137111	PA14_46630	PA14_RS18945	4155629	18.519	61,30	
16	PA14_48870	PA14_RS19845	4344257	PA14_49040	PA14_RS19915	4356442	12.186	58,03	
17	PA14_50240	PA14_RS20390	4462626	PA14_50340	PA14_RS20435	4475688	13.063	64,92	Flagellin-Glykosylierungs- Gencluster (REP)
18	PA14_51510	PA14_RS20950	4579750	PA14_51670	PA14_RS21025	4591912	12.163	56,86	PAPI-2 (ExoU)
19	PA14_53560	PA14_RS21805	4748791	PA14_53680	PA14_RS21855	4761493	12.703	53,26	
20	PA14_54830	PA14_RS22325	4859110	PA14_55100	PA14_RS22450	4895700	36.591	61,52	
21	PA14_55410	PA14_RS22580	4917899	PA14_55400	PA14_RS22575	4931810	13.912	69,25	
22	PA14_58900	PA14_RS24030	5246954	PA14_60190	PA14_RS24560	5362439	115.486	60,09	PAPI-1

Die durch CCT erstellte, zirkuläre Genomdarstellung in Abbildung 16-A zeigt die auf einer BLASTn-Analyse basierenden Übereinstimmung der CAP- und CF-Stämme zu dem Referenzstamm UCBPP-PA14. Dieser wurde für die Darstellung ausgewählt, weil er verglichen zum Referenzstamm PAO1 mehr genomische Inseln besitzt, wie z. B. die Pathogenitätsinseln PAPI-1 und PAPI-2. Die Regionen zwischen den RGPs (regions of genomic plasticity) sind zum Großteil hochkonserviert (Core-Genom) und in den meisten Stämmen vorhanden. Die in blauen Kästen hervorgehobenen genomischen Inseln, also RGPs, die größer als 10 kbp sind, wurden in Tabelle 15 im Detail aufgelistet und stellen die heterogenen Sequenz-Regionen im P. aeruginosa-Pangenom dar. Es wurden nur die genomischen Inseln dargestellt, die sich in UCBPP-PA14 befinden, neue Inseln können auf diese Weise nicht identifiziert werden. Insgesamt wurden 22 genomische Inseln gefunden. Die Größe der Inseln variiert zwischen 11.991 bp und 115.486 bp. In den Bereichen der in Abbildung 16-A hervorgehobenen genomischen Inseln ist jeweils ein geringerer GC-Gehalt zu erkennen, der durchschnittliche GC-Gehalt der genomischen Inseln ist in Tabelle 15 notiert. Der durchschnittliche GC-Gehalt liegt bei allen RGPs, außer RGP-21, unter dem Genomdurchschnitt von 66 – 67 % (Tabelle 15). Die Pathogenitätsinseln PAPI-1 (RGP-22) und PAPI-2 (RGP-18), die Replacement Pyoverdinsynthsese-Cluster (RGP-12) und das Islands. die das Flagellin-Glykosylierungs-Gencluster (RGP-17) enthalten, und die CRISPR-Cas-Insel (RGP-11) wurden in diesem Kapitel genauer auf ihr Vorkommen unter den Stämmen untersucht. In Abbildung 17 wurde das Vorkommen der Inseln unter den CAP- und CF-Stämmen ermittelt. Abbildung 18 stellt dar, wie viele der Stämme der phylogenetischen Hauptgruppen (Gruppe 1 und 2) die genomischen Inseln enthalten. Die Pathogenitätsinseln PAPI-1 (RGP-22) und PAPI-2 (RGP-18) wurden aufgrund der Größe und Heterogenität in kleinere Genkassetten eingeteilt. Die mittels CCT vergrößert dargestellten Ausschnitte aller RGPs mit den Einteilungen der RGP-18 und RGP-22 befinden sich im Anhang in den Abbildung E-1 Abbildung E-22. Die RGPs wurden als vorhanden markiert, wenn mindestens 80 % Sequenzidentität über 70 % der Länge vorhanden ist.



Abbildung 17: Vergleich des prozentualen Vorkommens der RGP-11, RGP-12, RGP-17 sowie der in Abschnitten eingeteilten RGP-18 und RGP-22 innerhalb der CAP-(n= 53) bzw. der CF-Stämme (n= 39).

Das Vorkommen der 5 analysierten RGPs ist ähnlich unter den CAP- und CF-Stämmen. Die RGP-11 (CRISPR-Cas-Insel) zeigt hier mit ca. 36 % der Stämme (CAP: n= 19, CF: n= 14) die höchste Übereinstimmung. Die RGP-12 ist etwas häufiger unter den CF-Stämmen identifiziert worden, die RGP-17 mit dem Flagellin-Glykosylierungs-Gencluster zeigt ein geringfügig erhöhtes Vorkommen unter den CAP-Stämmen (35,8 %, n= 19) als unter den CF-Stämmen (25,6 %, n= 10). Das prozentuale Vorkommen der RGP-18, die das Exoenzym-Gen *exoU* enthält (Region 1), variiert geringfügig mit einer Differenz von unter 4 %, jedoch am stärksten in der Region 5 (CAP: 69,8 %, n= 37 und CF: 79,5 %, n= 31).

Die meisten RGPs wurden etwas häufiger unter CF-Stämmen identifiziert. Die größten Unterschiede innerhalb der RGP-22 befinden sich in der Region 1, 10 und 12 mit einem höheren Anteil der CF-Stämme und in Region 5 mit einem höheren Anteil der CAP-Stämme.



Abbildung 18: Vergleich des prozentualen Vorkommens der RGP-11, RGP-12, RGP-17 sowie der in Abschnitten eingeteilten RGP-18 und RGP-22 innerhalb aller Stämme der phylogenetischen Gruppen 1 (n= 65) und 2 (n= 25). Die Sterne stehen für die p-Werte (siehe 3.4, ETF).

Das Vorkommen der genomischen Inseln unter den phylogenetischen Gruppen 1 und 2 zeigt zum Teil große Unterschiede. Zu dieser Analyse von Abbildung 18 muss angemerkt werden, dass zum einen die Anzahl der Stämme in der phylogenetischen Gruppe 1 größer ist und sich zum anderen der Referenzstamm *UCBPP-PA14* in der Gruppe 2 befindet. Zudem werden die CAP- und CF-Stämme zusammen betrachtet, was jedoch durch die sehr ähnliche Verteilung innerhalb der Gruppen ermöglicht wird. RGP-11 ist deutlich häufiger in der phylogenetischen Gruppe 1 gefunden worden (ETF, p = 0,0061). Die RGP-18 zeigt jedoch die größte Variabilität. Die *exoU* enthaltende Region RGP-18-1 ist ausschließlich unter Gruppe 2-Stämmen konserviert, sie fehlt nur in *PAE_0019*. Die Region RGP-18-2 ist deutlich stärker in Gruppe 2-Stämmen vertreten als in Gruppe 1-Stämmen (ETF, p = 0,0164) und RGP-18-5 (ETF, p = 0,0003) sind unter den Stämmen der Gruppe 2 höher konserviert als in Gruppe 1-Stämmen.

Die größten Unterschiede zwischen den Gruppen bei RGP-22 sind in den Regionen RGP-22-7 (ETF, p = 0.0481), RGP-22-11 (ETF, p = 0.0189) und RGP-22-12 (ETF, p = 0.0003) zugunsten einer höheren Konservierung bei den Gruppe 2-Isolaten. Die Pyocin S5 enthaltende Region RGP-22-2 ist deutlich häufiger in Gruppe 1-Isolaten (ca. 25 %, n= 16) als in Gruppe 2-Isolaten (n= 0) gefunden worden (ETF, p = 0.0045).

4.4.4 Nachweis von Plasmiden

Von den 37 geschlossenen Plasmiden in der erstellten "Pseuplas"-Datenbank (RefSeq-Datenbank, NCBI, siehe E-1) konnten nur von drei Plasmiden Bestandteile mit 95 % Sequenzidentität über mindestens 20 % der Länge nachgewiesen werden. Teile des Plasmids pY89 konnten in 20 Stämmen gefunden werden (CAP: n= 13 und CF: n= 7). In den meisten Stämmen ist die gleiche Sequenzregion (22,03 % Abdeckung des Plasmids) wie in den Referenzstämmen *DK2* und *PA7* konserviert. Dem Stamm *PAE_0042* konnte ein größerer Bereich des Plasmids zugeordnet werden (22,04 % und 24,6 %). Das geschlossene Plasmid pKLC102 ist insgesamt mit einer Länge von 103.532 bp annotiert und mindestens 20 % der Länge sind in 15 CAP- und 8 CF-Stämmen identifiziert worden.

Tabelle 16: Ergebnisse der mittels ABRicate-Analyse (BLASTn, https://github.com/tseemann/abricate) identifizierten Bestandteile der in der RefSeq-Datenbank von NCBI publizierten geschlossenen Plasmide. Zuvor wurde ein Schwellenwert von 95 % Sequenzidentität bei den Datenbanktreffern gesetzt. Aufgelistet ist hier die Längenabdeckung der Datenbanktreffer ab 20 %. Stämme ohne Treffer wurden nicht gelistet.

Plasmid	pY89	pKLC102	pMATVIM_7	Plasmid	pY89	pKLC102	pMATVIM_7			
Accession Number	NZ_CP030914	NC_019202	NC_009739	Accession Number	NZ_CP030914	NC_019202	NC_009739			
Plasmidlänge [bp]	85.842	103.532	24.179	Plasmidlänge [bp]	85.842	103.532	24.179			
Ursprünglicher Stamm	Y89	Clone C	07-406	Ursprünglicher Stamm	Y89	Clone C	07-406			
Stämme	Länge	nabdeckung	in [%]	Stämme	Längenabdeckung in [%]					
UCBPP-PA14	-	-	21,41	PAE_0044	-	21	-			
DK2	22.03	-	-	PAE_0051	22,03	-	-			
PA7	22,03	-	-	PAE_0054	22,03	-	-			
PAE_0001	-	36,93; 30,92	-	PAE_0055	-	40,00; 21,50	-			
PAE_0002	24,66	-	-	PAE_0057	-	26,01; 21,50; 40,00	-			
PAE_0008	-	61,58; 21,72	-	PAE_0058	-	85,85	-			
PAE_0013	-	61,42	-	PACF_116	20,34	-	-			
PAE_0014	-	21,48; 61,48	-	PACF_137	-	21	-			
PAE_0016	22,03	-	-	PACF_15	22,03	-	-			
PAE_0017	-	-	21,41	PACF_186	-	62,04	-			
PAE_0018	-	40,47; 49,73	-	PACF_194	-	22,14	-			
PAE_0019	21,5	-	-	PACF_21	-	61,79	-			
PAE_0021	-	50,24; 35,59	-	PACF_229	22,03		-			
PAE_0025	22,03	-	-	PACF_34	-	-	21,41			
PAE_0027	22,03	21,5	-	PACF_37	22,03	21,5	-			
PAE_0028	22,03	-	-	PACF_38	-	85,64	-			
PAE_0030	22,03	21,5	-	PACF_43	22,03	-	21,41			
PAE_0033	22,03	-	-	PACF_541	-	-	21,41			
PAE_0034	-	21,49	-	PACF_657	-	-	21,41			
PAE_0035	-	21	-	PACF_672	-	-	21,41			
PAE_0036	-	21,02	-	PACF_74	22,03	-	-			
PAE_0038	22,03	-	-	PACF_813	22,03	-	-			
PAE_0042	22,04; 24,66	-	-	PACF_87	-	35,38; 46,33	-			
PAE_0043	22,03	-	-	PACF_94	-	21,46	21,41			

In acht Stämmen konnten mehr als 50 % der Plasmidlänge durch zusammenhängende BLASTn-Treffer nachgewiesen werden, auch wenn die Sequenztreffer Lücken aufzeigten. In den Stämmen *PAE_0058* und *PACF_38* konnten allerdings über 85 % des Plasmids zusammenhängend gefunden werden. Von dem dritten Plasmid *pMATVIM_7* wurden 21,41 % der Plasmidlänge in sieben Stämmen identifiziert, von denen sechs CF-Stämme waren.

Neben der ABRicate-Analyse, die auf die annotierten Genbank-Dateien zurückgreift, wurden die assemblierten Contigs (Multi-Fasta-Dateien) mittels Platon auf putative Plasmide oder Plasmidbestandteile überprüft (https://github.com/oschwengers/platon). Insgesamt wurden 268 Contigs aus 73 Stämmen (CAP: n= 41, CF: n= 32) als putative Plasmidbestandteile identifiziert (Datei E-5). Die Contigs, die in der BLAST+-Analyse Plasmidtreffer ergaben, stimmten allerdings nur mit Plasmidbestandteilen überein, die auch durch Integration in das Genom aufgenommen worden sein können. Ein ermitteltes Contig ("NODE_13_length_159568_cov_26.1423" aus PACF_94) wurde aufgrund des Auftretens der Inkompatibilitätsgruppe IncQ2 genauer untersucht. Eine BLASTx-Analyse ergab, dass die Genregion zwischen dem ersten Gen ("PA14 RS05595/PA14 13940": putative S-type pvocin protein) und dem letzten Gen im Contig ("PA14_RS06210/PA14_15540": putative mating pair formation protein TrbL) ebenfalls im Referenzstamm UCBPP-PA14 vorkommt. Ein Teil des Contigs bildet die in 4.4.3 erläuterte genomische Insel "RGP-5", die unter allen Stämmen nur in PACF 94 wie im Referenzstamm UCBPP-PA14 vorhanden ist (Abbildung E-5). Im Referenzstamm hat die oben genannte Genregion eine Größe von 119.743 bp, das Contig ist jedoch 159.568 bp groß.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Suche nach publizierten Plasmiden (ABRicate) sowie die Identifizierung putativer neuer Plasmide (Platon) zu genomischen Inseln geführt hat.

4.4.5 Nachweis von Bakteriophagen

Tabelle 17 zeigt alle mittels PHASTER identifizierten Phagen, die den Schwellenwert ("first_most_common_phage_percentage" von 50 %) erreichten. Die durchschnittliche Anzahl der von PHASTER pro Stamm identifizierten Bakteriophagen, die den Schwellenwert erreichten, beträgt unter den CAP-Stämmen 1,9 und unter den CF-Stämmen 1,77. Ein Fokus liegt auf den filamentösen Pf-1 Phagen, die das Mantel-Gen *coaB* enthalten. Diese Pf-1 Phagen wurden in 47,2 % (n= 25) der CAP-Stämme und in 33,3 % (n= 13) der CF-Stämme identifiziert. Unter den Pf-1 positiven CAP-Stämmen

werden 84 % (n= 21) der phylogenetischen Gruppe 1 zugeordnet, unter den Pf-1 positiven CF-Stämmen sind es 61,6 % (n= 8).

Tabelle 17: Auflistung der Bakteriophagen-Treffer unter CAP-, CF- und Referenzstämmen, die den Schwellenwert von mind. 50 % Genauigkeit der von PHASTER (Arndt et al., 2016) identifizierten Phagen (first_most_common_phage_percentage) erreichten. Die mit einer Fußnote (¹) markierten Pf-1 Phagen enthalten *coaB*. Int= Intakt (*intact*), Inc= Unvollständig (*incomplete*), Que= Fraglich (*questionable*). Die Accession numbers der Phagen befinden sich unter der Tabelle.

<u>.</u>	Pf1	F10	JBD25	JBD93	phi297	phi3	phiCTX	Andere		Pf1	F10	JBD25	JBD93	phi297	phi3	phiCTX	Andere
PAO1	Int ¹	-	-	-	-	-	-	-	PAE_0048	-	Que	-	-	-	-	-	JBD44 (Inc), PMG1 (Int), YMC11 (Que)
UCBPP-PA14	Int 1	-	-		-	-	-	-	PAE 0050	Inc 1		-	-	Int	-	Int	phi92 (Inc),
DK2	-	-	-	-	-	-		-	PAE 0051	Que 1	-	-	-	-	Int	-	F116 (Int) JBD18 (Int)
								MD8 (Que)									()
LESB58	Int	Que	-	-	-	-	-	JD024 (Que), PMG1 (Int)	PAE_0053	Que ¹	-	-	-	-	-	-	-
NCGM2.S1		-	Int	Que	-	-	-	JBD44 (Inc)	PAE_0054	-	-	-	-	-	-	-	D3 (Que)
PA7	Int 1	-	-	-	-	Int, Int	t -	-	PAE_0055	-	-	-	-	-	-	-	phi2 (Int)
PAE_0001	Que	-	-	-	-	-	-	-	PAE_0056	-	Int	-	-	Int	-	-	-
PAE_0002	-	-	-	-	-	Int	-	D3 (Inc)	PAE_0057	-	-	-	-	-	-	-	phi2 (Int)
PAE_0004	Que 1	-	-	-	-	-	-	-	PAE_0058	Que	-	-	-	-	-	-	-
PAE_0005	Que 1	-	-	-	-	-	int	-	PACE 106	- Int 1	-	-	-	-	-	-	IBD69 (Int)
PAE_0000					Int	-	Int		PACE 115				-		-	-	E116 (Inc)
PAE_0008	Inc ¹	-	-	-	-	-	-	MD8 (Que)	PACF_116	-	-	-	-	-	-	-	DMS3 (Int), phi2 (Int)
PAE 0009	-	-	-	-	-		-	-	PACE 129	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 0010	Que ¹	-	Inc	Que	-	-	Int	PMG1 (Int)	PACF 13	Que ¹	-	-	-	-	-	-	-
PAE 0011	Inc	-	Int	-	-	-	-	-	PACE 137	Int	-	-	-	-	-	-	-
PAE 0012	Inc ¹	Que	-	-	-	-	Int	-	PACE 15	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 0013	Inc, Inc 1	-	-	-	-	-	-	-	PACF 186	Que	-	-	-	-	-	-	-
PAE_0014	Inc 1	-	-	-	-	-	-	-	PACF 194	Que ¹	-	-	-	-	-	-	-
 PAE_0016	Que ¹	Que	-	-	-	-	-	JD024 (Int), JBD18 (Int)	PACF_205	-	-	Int	-	-	-	-	-
PAE_0017	-	-	-	-	-	-	Int	- ` `	PACF_21	Int, Inc 1	-	-	-	-	-	-	-
PAE_0018	Que ¹	-	Int	-	-	-	-	-	PACF_229	Que, Que ¹	Int	-	-	-	-	-	-
PAE_0019	-	Que	-	Int	-	-	-	D3 (Inc)	PACF_23	-	-	-	Int	-	-	Int	-
PAE_0020	-	-	-	-	-	-	Int	-	PACF_281	-	-	-	-	-	-	-	Aaphi23 (Inc)
PAE_0021	-	-	-	-	Int	-	-	-	PACF_3	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE_0022	Inc	-	-	-	-	-	-	-	PACF_305	Que ¹	-	Int	-	-	-	-	JBD44 (Inc)
PAE_0023	Int 1	-	-	-	-	-	-	Aaphi23 (Inc)	PACF_34	-	Que	-	-	-	Int	Int	-
PAE_0025	Que ¹	Inc, Inc	Int	Que	-	-	-	-	PACF_36	Que	-	Int	-	-	Int	-	-
PAE_0026	-	-	-	-	-	-	Int	-	PACF_37	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE_0027	-	-	Inc	Que	-	-	-	JBD18 (Inc)	PACF_38	-	-	-	-	-	-	Int	-
PAE_0028	-	-	-	-	-	Int	-	-	PACF_39	Que	-	-	-	Int	-	Int	-
PAE_0029	Que ¹	-	-	-	-	-	-	phi2 (Int), YMC11 (Int)	PACF_410	-	-	-	-	Inc	-	-	-
PAE_0030	-	-	-	-	-	-	-	-	PACF_43	-	-	Int	-	-	-	-	-
PAE_0031	-	-	-	-	-	-	Int	-	PACF_46	Inc	-	Int	-	-	-	-	-
PAE_0032	Que ¹	-	-	-	-	-	-	-	PACF_47	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE_0033	-	-	Int	-	-	-	-	-	PACF_541	-	Inc	-	Que	-	-	Int	-
PAE_0034	Inc ¹	-	-	-	Int	-	-	-	PACF_57	Que ¹	Int	Int	Que	-	-	Int	-
PAE_0035	Que ¹	-	-	-	-	-	Int	-	PACF_570	Int 1	-	Que	-	-	-	-	-
PAE_0036	Inc	-	-	-	-	-	-	-	PACF_6	-	-	Int	-	-	Int	-	-
PAE_0037		-	Int	-	-	-	-	Tr60 (Int)	PACF_657	Que 1	Que	-	-	-	Int	Int	-
PAE_0038	Que	-	Inc	Que	-	-	Int	-	PACF_662	-	-	-	-	-	Int	-	-
PAE_0039	Que	-	-	-	-	-	-	-	PACF_672	Int '	-	-	-	-	-	Int	MD8 (Que)
PAE_0040	Que	-	Int	-	-	-	-	PM105 (Que)	PACF_73	1	-		-	-	-		-
PAE_0041	Inc	-	Int	-	-	-	-	-	PACE_74	Int '	-	Int	Que	-	-	Int	-
PAE_0042	-	-	-	-	-	-	-	TMC11 (Int)	PACE_76	-	Int	Int	Que	-	-	Int	-
PAE_0043	Que	-	Int	Int	Int	-	Int	-	PACE 813	Que '	-	Int	Que	-	-	Int	-
PAE_0044	-	-	-	-	-	int	-	D3 (INT)	PACE 07	-	-	int	-	-	-	INT	-
PAE_0040	-	-	-	-	-	-	IIIL	-		- Int 1	-	-	-	-	-	-	-
PAE_0047	inc, inc '	-	-	-	-	-	-	-	FAUF_94	int -	Que	-	-	-	-	-	-

Accession numbers der Phagen: Pf1 (NC_001331), F10 (NC_007805), JBD25 (NC_027992), JBD93 (NC_030918), phi297 (NC_016762), phi3 (NC030940), phiCTX (NC_003278). Andere (weniger als fünf Treffer): Aaphi23 (NC_004827), D3 (NC_002484), DMS3 (NC_008717), F116 (NC_006552), JBD18 (NC_027986), JBD24 (NC_020203), JBD44 (NC_030929), JBD69 (NC_030908), JD024 (NC_02433), MD8 (NC_031091), phi2 (NC_030931), phi92 (NC_023693), PM105 (NC_028667), PMG1 (NC_016765), Tr60 Ab31 (NC 023575), YMC11/02/R656 (NC 028657).

4.5 Virulenzfaktoren

4.5.1 Nachweis von Virulenzgenen

Die CAP-, CF- und Referenzstämme wurden mittels ABRicate (https://github.com/tseemann/abricate) mit den Einträgen der VFDB-Datenbank (http://www.mgc.ac.cn/VFs/) auf Aminosäureebene (BLASTx) verglichen. Es wurden insgesamt 242 unterschiedliche Virulenzgene unter den CAP-, CF- und Referenzstämmen gefunden. Aufgrund der großen Vielzahl an Virulenzgenen wurde eine Auswahl wichtiger Gene auf ihr Vorkommen unter den CAP- und CF-Stämmen untersucht und in Abbildung 19 dargestellt. Die komplette Liste sowie die komplette *Presence-/Absence*-Matrix identifizierter Virulenzgene befindet sich in Datei E-2.

Aus Abbildung 19 geht hervor, dass *exoS* oder *exoU* nur einmalig in den Stämmen auftreten und nie im selben Genom gefunden wurden. In den Stämmen *PAE_0029*, *PACF_281* und dem Referenzstamm *PA7* befindet sich keines der beiden Gene.

Die Exoenzym-Gene *exoT* und *exoY* sowie das Exotoxin A-Gen *toxA* konnten in den meisten CAP- und CF-Stämmen nachgewiesen werden. Die Vertreter der phylogenetischen Gruppe 3 enthalten weder Gene für die Exoenzyme noch für das Exotoxin A. *PACF_281* ist der einzige CF-Stamm, in dem *exoT* nicht gefunden wurde. Unter den CAP-Stämmen fehlt *exoT* nur in *PAE_0004*, ebenso wie *exoY*, welches in fünf weiteren CAP-Stämmen und in drei CF-Stämmen fehlt.

Das Exotoxin-Gen *toxA* konnte in zwei CAP-Stämmen nicht gefunden werden, von denen der Stamm *PAE_0023* der phylogenetischen Gruppe 4 und PAE_0022 der Gruppe 2 zugeordnet wird. Unter den CF-Stämmen fehlt *toxA* in fünf Stämmen (*PACF_305*, *PACF_34*, *PACF_36*, *PACF_46*, *PACF_657* aus Gruppe 2 und *PACF_281* aus Gruppe 3).

Die Gene für Elastasen und Proteasen sind unter CAP- und CF-Stämmen hochkonserviert. Das Protease-Gen *lasA* wurde nur in dem Stamm *PACF_36* nicht identifiziert, ansonsten jedoch, wie das Elastase-Gen *lasB*, in allen Stämmen gefunden. Die Gene *aprA* (kodierend für die alkalische Protease) und *plcH* wurden in allen, außer jeweils einem Stamm, identifiziert. Das für die alkalische Protease kodierende Gen *aprA* fehlt in *PAE_0043* und *plcH*, das für die Phospholipase C kodiert, fehlt in *PACF_281*.



Abbildung 19: Presence/Absence-Matrix einer Auswahl der Virulenzgene von P. aeruginosa unter den CAP-, CF- und Referenzstämmen. Die Übereinstimmungen mit der VFDB-Datenbank (http://www.mgc.ac.cn/VFs/) wurden mittels ABRicate (https://github.com/tseemann/abricate) auf Aminosäureebene überprüft (BLASTx). Grün: Perfekte Übereinstimmung (100 % Identität über mind. 85 % der Länge), Gelb: Ähnliche Treffer (> 85 % Identität über mind. 85 % der Länge) und Rot: Kein Treffer (weniger als 85 % Identität, bzw. weniger als 85 % Längenabdeckung).

4.5.2 Mukoide Phänotypen und *mucA*-Mutationen

Die Bildung mukoider Phänotypen auf Columbia-Blutagarplatten wurde wie in 4.1.1 beschrieben in fünf CAP-Stämmen und sechs CF-Stämmen nachgewiesen. Tabelle 18 zeigt, dass defekte bzw. fehlende *mucA*-Gene (*mucA*-negative Stämme) deutlich häufiger unter CF-Stämmen gefunden wurden (Chi², p < 0,0001) und dass mukoide Phänotypen nur in Verbindung mit *mucA*-negativen Stämmen auftreten. Unter den CAP-Stämmen besitzen alle fünf *mucA*-negativen Stämme einen mukoiden Phänotypen. Unter den CF-Stämmen sind 18 Stämme *mucA*-negativ, von denen sich jeweils ein Drittel (n= 6) unter jedem der drei Ausprägungen (0, 1, 2) der phänotypischen Oberflächen-Kategorien (Abbildung 6, [O]) befinden. Es besitzen also nur 33 % der *mucA*-negativen CF-Stämme einen mukoiden Phänotypen.

Tabelle 18: Übersicht der Ausprägung des *mucA*-Gens und der phänotypischen Kategorien der Oberflächenstruktur (siehe 4.1.1). WT= Wildtyp (komplette Länge), D= defektes Gen, 0= raue Oberfläche, 1= glatte Oberfläche, 2= mukoide, schleimige Oberfläche.

Stamm	mucA	Phänotyp	Stamm	mucA	Phänotyp	Stamm	mucA	Phänotyp	Stamm	mucA	Phänotyp
PAO1	WT	0	PAE_0022	WT	0	PAE_0050	WT	0	PACF_305	WT	1
UCBPP-PA14	WT	k. A.	PAE_0023	WT	1	PAE_0051	WT	0	PACF_34	WT	1
DK2	D	k. A.	PAE_0025	D	2	PAE_0053	WT	0	PACF_36	WT	0
LESB58	WT	k. A.	PAE_0026	WT	0	PAE_0054	D	2	PACF_37	D	2
NCGM2.S1	WT	k. A.	PAE_0027	WT	1	PAE_0055	WT	1	PACF_38	WT	0
PA7	WT	k. A.	PAE_0028	WT	1	PAE_0056	WT	1	PACF_39	D	1
PAE_0001	WT	1	PAE_0029	WT	0	PAE_0057	WT	1	PACF_410	D	2
PAE_0002	WT	0	PAE_0030	WT	0	PAE_0058	WT	0	PACF_43	D	2
PAE_0004	WT	1	PAE_0031	WT	1	PAE_0059	WT	0	PACF_46	WT	0
PAE_0005	WT	1	PAE_0032	WT	0	PACF_106	WT	1	PACF_47	WT	0
PAE_0006	WT	1	PAE_0033	WT	0	PACF_115	WT	1	PACF_541	WT	1
PAE_0007	WT	1	PAE_0034	WT	1	PACF_116	WT	0	PACF_57	D	0
PAE_0008	WT	0	PAE_0035	WT	0	PACF_129	D	0	PACF_570	D	2
PAE_0009	WT	0	PAE_0036	D	2	PACF_13	WT	0	PACF_6	D	1
PAE_0010	WT	1	PAE_0037	WT	0	PACF_137	D	0	PACF_657	WT	1
PAE_0011	WΤ	1	PAE_0038	WΤ	0	PACF_15	WT	1	PACF_662	WT	1
PAE_0012	WT	1	PAE_0039	WT	1	PACF_186	D	1	PACF_672	WT	1
PAE_0013	WT	1	PAE_0040	WT	0	PACF_194	WT	1	PACF_73	D	0
PAE_0014	D	2	PAE_0041	WT	0	PACF_205	WT	0	PACF_74	D	1
PAE_0016	WT	0	PAE_0042	WT	0	PACF_21	D	0	PACF_76	D	0
PAE_0017	WT	0	PAE_0043	D	2	PACF_229	D	2	PACF_813	WT	1
PAE_0018	WT	1	PAE_0044	WT	0	PACF_23	D	1	PACF_85	D	1
PAE_0019	WΤ	0	PAE_0046	WT	0	PACF_281	WT	0	PACF_87	WT	0
PAE_0020	WT	1	PAE_0047	WT	0	PACF_3	D	2	PACF_94	WT	0
PAE_0021	WT	1	PAE_0048	WT	0				-		

4.6 Antibiotikaresistenz





Abbildung 20: *Presence/Absence*-Matrix der mittels RGI (Jia et al., 2017, Protein-Homologie-Modell) identifizierten Antibiotikaresistenzgene der CAP- und Referenzstämme. Die Identitätswerte (in %) sind farblich dargestellt: Grün: Perfekte Übereinstimmung (100 % Identität über mind. 85 % der Länge), Gelb: Ähnliche Treffer (> 70 % Identität über mind. 85 % der Länge) und Rot: Kein Treffer (weniger als 70 % Identität, bzw. weniger als 85 % Längenabdeckung).



Abbildung 21: *Presence/Absence*-Matrix der mittels RGI (Jia et al., 2017, Protein-Homologie-Modell) identifizierten Antibiotikaresistenzgene der CF-Stämme. Die Identitätswerte (in %) sind farblich dargestellt: Grün: Perfekte Übereinstimmung (100 % Identität über mind. 85 % der Länge), Gelb: Ähnliche Treffer (> 70 % Identität über mind. 85 % der Länge) und Rot: Kein Treffer (weniger als 70 % Identität, bzw. weniger als 85 % Längenabdeckung).

Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen eine Vielzahl verschiedener Antibiotikaresistenzgene unter den CAP- und CF-Stämmen. Zur verbesserten Übersicht ist in der linken Spalte die beeinflusste Antibiotikaklasse übergeordnet, bzw. Proteine als "Efflux" oder "Effluxregulation" gekennzeichnet, die zu Effluxpumpenssystemen gehören, aber nicht in 4.6.3 genauer analysiert werden. In Abbildung 20 sind neben den CAP-Stämmen noch die Referenzstämme dargestellt. Weil die auf einer BLASTp-Analyse (Vergleich von translatierten Aminosäurensequenzen) beruhenden RGI- Software (Jia et al., 2017) die Ergebnisse auf Proteinebene ausgibt, wird in diesem Teil der Arbeit das Vorkommen von Proteinen beschrieben (Protein-Nomenklatur). Die Aussagen über die Funktionalität der Proteine basieren allerdings dabei nur auf der Genomsequenzebene und sind folglich als Vorhersage zu sehen. Insbesondere unter den AMEs (Aminoglykosid-modifizierende Enzyme) enthalten *NCGM2.S1* und *PA7* einzigartige Varianten. *PA7* zeigt durch das Fehlen von CatB7, FosA, MexM, MexP, OpmD, OpmE und BasS sowie den Besitz von OprA eine hohe Übereinstimmung mit *PACF_281*, dem anderen Vertreter aus der phylogenetischen Gruppe 3.

Das häufigste AME ist die APH-Variante APH(3')-IIb, die nur in drei CF-Stämmen fehlt. Unter den CAP-Stämmen befinden sich zwei (*PAE_0028* und *PAE_0033*) und unter den CF-Stämmen vier Stämme (*PACF_21*, *PACF_34*, *PACF_657* und *PACF_94*) mit zusätzlich identifizierten AMEs. Komparative Analysen zeigten das Vorkommen des Sulfonamid-Resistenzgens *sul1* in fünf von sechs Stämmen mit diesen erworbenen Resistenzgenen (Abbildung 20 und Abbildung 21). Durch das Genomanalyse-*Tool* GECO (Kuenne et al., 2007) wurde in Abbildung 22 ein Integron dargestellt, das am 5'-Ende vom Integrase-Gen *int1* und am 3'-Ende vom Sulfonamid-Resistenzgene *sul1* begrenzt wird und in dessen Genkassette sich viele der erworbenen Resistenzgene befinden. Als Referenz wurde der Stamm *NCGM2.S1* gewählt, der das Integron sowie erworbene Resistenzgene enthält. *PACF_34* und *PACF_657* zeigen eine verkürzte Variante des Integrase-Gens *int1* (822 bp, hellblau in Abbildung 22) verglichen mit den anderen Stämmen (1014 bp, lila in Abbildung 22).

In *PACF_34* und *PACF_657* wurden das AME-Gen *ant(2")-la*, in *PAE_0028* und *PAE_0033* das Gen *aac(6')-llc* und in den anderen in Abbildung 22 dargestellten Stämmen das Resistenzgen gegen quartäre Ammoniumsalze, *qacE*, im Zuge der ASA³P-*Pipeline* (Oliver Schwengers et al., 2019) von Prokka (Seemann, 2014) nicht als Gen vorhergesagt. Deshalb wurde es von GECO in der Genvisualisierung nicht abgebildet. Die ORFs (*open reading frames*) der Genkassette wurde daraufhin mit dem CLC Sequence Viewer (Qiagen) dargestellt, die Gene *ant(2")-la*, *aac(6')-llc* und *qacE* mit BLASTx-Analysen (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) identifiziert (> 95 % Sequenzidentität und Längenabdeckung) und in Abbildung 22 als weißer Pfeil mit roter Umrandung abgebildet.



Abbildung 22: Komparative Darstellung der von *sul1* und *intl* begrenzten Genkassette (grau hinterlegt), erstellt mit GECO (Kuenne et al., 2007). Dargestellt wurden nur die Stämme, die *sul1* enthalten. Gene außerhalb des Integrons sind nur bei *NCGM2.S1* anhand der *Identifier* markiert. Die als weißer Pfeil mit rotem Rand markierten Gene wurden nicht automatisch mit Prokka annotiert, sondern das Vorhandensein von *ant(2")*, *aac(6')* und *qacE* auf DNA-Sequenzebene mit BLASTx manuell überprüft und in die Abbildung eingefügt.

Unter den β -Laktamasen wurde die intrinsische Klasse D-Oxacillinase (OXA-50) in jedem Stamm gefunden. Von der Klasse C-Cephalosporinase AmpC wurden unter den Stämmen unterschiedliche PDC-(*Pseudomonas-derived cephalosporinase*-) Typen nachgewiesen. In den Stämmen *PAE_0026*, *PAE_0031*, *PACF_281* und *PACF_43* konnte die intrinsischen β -Laktamase nicht identifiziert werden. Mit 36 % der CAP-(n= 19) und 49 % der CF-Stämme (n= 19) ist PDC-9 die häufigste AmpC-Variante und im Verhältnis häufiger unter CF-Stämmen vertreten als unter den CAP-Stämmen. In *PACF_34* und *PACF_657* kann außerdem die Klasse D- β -Laktamase NPS-1 nachgewiesen werden.

Resistenzenzyme gegen Chloramphenicol (CatB7), Fosfomycin (FosA), Polymyxin (ArnA, BasS) und Bicyclomycin (bcr-1) sind hochkonserviert und fehlen nur in vereinzelten Stämmen.

Der große Einfluss der Effluxpumpen an der Antibiotikaresistenz zeigt sich in der Vielzahl der kodierenden Gene. Die für *P. aeruginosa* wichtigsten Operons und Transkriptionsregulatoren sind in Abbildung 24 separat aufgeführt und aus den Abbildung 20 und Abbildung 21 entfernt worden, um Doppelungen zu vermeiden. In dieser Arbeit wurde sich auf die wichtigsten Effluxpumpensysteme (4.6.3) beschränkt. Die anderen bekannten Effluxsystemen sind MexGHI-OpmD (Aktivator: SoxR), MexJK-OpmH/OprM (Repressor: MexL), MexMN-OprM, MexPQ-OpmE, MexVW-OprM, MexXY-OprA, MuxAB-OpmB, TriABC-OpmH, PmpM, EmrE und cmx. Ihnen wird in der Literatur allerdings eine in Bezug auf die Antibiotikaresistenz untergeordnete Rolle zugeordnet (Li und Nikaido, 2009).

4.6.2 Nachweis von resistenzvermittelnden Proteinvarianten

4.6.2.1 Ciprofloxacin-Resistenz

Das Protein-Varianten-Modell der RGI-Software (Jia et al., 2017) bestimmt nur SNPs, die publizierte Aminosäureaustausche in Zielstrukturen von Antibiotika hervorrufen. In diesem Fall wurden nur SNPs in der QRDR (*quinolone resistance-determining region*) der Gene *gyrA* und *parE* identifiziert, die Aminosäureaustausche in den entsprechenden Enzymen GyrA und ParE zur Folge haben und die zu einer Ciprofloxacin-Resistenz führen können. Publizierte SNPs der Gene der anderen Topoisomerase-Untereinheiten (*gyrB* und *parC*) wurden nicht gefunden. Äquivalent zu den anderen Modellen der RGI-Software (BLASTp-basierend) werden auch in diesem Teil der Arbeit die Effekte auf Aminosäureebene beschrieben, auf die Funktionalität oder eine mögliche Beeinflussung nicht-publizierter SNPs kann jedoch keine sichere Aussage getroffen werden. In Tabelle 19 werden die mittels RGI ermittelten Aminosäureaustausche und die Ciprofloxacin-MHKs dargestellt. Die Gene *gyrA* und *parE* der Stämme ohne publizierte SNPs entsprechen nicht zwangsläufig dem Wildtyp, sondern können auch SNPs beinhalten, die sich nicht in der QRDR befinden.

Unter den CAP- und CF-Stämmen sind zwei unterschiedliche Aminosäureaustausche gefunden worden: T83I (Threonin zu Isoleucin) und D87N (Asparaginsäure zu Asparagin). T83I wurde unter CAP-Stämmen sechsmal und unter CF-Stämmen siebenmal gefunden und ist damit häufiger als D87N mit Vorkommen in einem CAP-Stamm und zwei CF-Stämmen. Unter allen Stämmen ist nur im Stamm *PAE_0001* ein publizierter *parE*-SNP gefunden worden. Statistisch konnte kein Zusammenhang bezüglich eines erhöhten Vorkommens von *gyrA*-Mutationen in CAP- oder CF-Stämmen durch den Chi-Quadrat-Test festgestellt werden.

Sechs der sieben CAP-Stämme mit Aminosäureaustauschen in GyrA zeigen eine Ciprofloxacin-Resistenz, *PAE_0030* ist resistent ohne publiziertes SNP in *gyrA* und *PAE_0043* ist trotz SNP sensibel. Unter den neun CF-Stämmen mit Aminosäureaustauschen in GyrA sind acht Stämme resistent und *PACF_3* sensibel gegen Ciprofloxacin. 12 Stämme sind ohne publizierte *gyrA*- oder *parE*-SNPs gegen Ciprofloxacin resistent.

Tabelle 19: Auflistung der durch RGI (Jia et al., 2017, Protein-Varianten-Modell) identifizierten Aminosäureaustausche in den Enzymen GyrA und ParE (kodierende Gene: *gyrA* und *parE*) der CAP-, CF-Stämme und *PAO1* sowie der mittels VITEK-2 System bestimmten MHKs (mit "E" markierte MHKs wurden durch E-Tests erhoben. CIP: Ciprofloxacin-MHK in mg/l, Färbung nach sensibler (MHK: < 0,5 mg/l, grüne Färbung) und resistenter (MHK: > 0,5 mg/l, rote Färbung) Interpretation (nach EUCAST-Richtlinien, EUCAST, Version 9.0, 2019).

Stamm	gyrA	parE	CIP	Stamm	gyrA	parE	CIP	Stamm	gyrA	parE	CIP	Stamm	gyrA	parE	CIP
PAO1	-	-	0,25	PAE_0027	-	-	0,25	PAE_0053	-	-	0,25	PACF_34	T83I	-	4
PAE_0001	-	A473V	0,25	PAE_0028	T83I	-	4	PAE_0054	-	-	0,03 ^E	PACF_36	-	-	1,5 ^E
PAE_0002	-	-	0,25	PAE_0029	-	-	0,25	PAE_0055	-	-	0,25	PACF_37	T83I	-	8 ^E
PAE_0004	-	-	0,25	PAE_0030	-	-	1	PAE_0056	-	-	0,25	PACF_38	-	-	2
PAE_0005	-	-	0,25	PAE_0031	-	-	0,25	PAE_0057	-	-	0,25	PACF_39	-	-	0,25
PAE_0006	-	-	0,25	PAE_0032	T83I	-	4	PAE_0058	-	-	0,25	PACF_410	D87N	-	1 ^E
PAE_0007	-	-	0,25	PAE_0033	T83I	-	1	PAE_0059	-	-	0,25	PACF_43	-	-	0,5
PAE_0008	-	-	0,25	PAE_0034	-	-	0,25	PACF_106	-	-	0,25	PACF_46	-	-	0,25
PAE_0009	D87N	-	2	PAE_0035	-	-	0,25	PACF_115	-	-	0,25	PACF_47	-	-	0,5 ^E
PAE_0010	-	-	0,25	PAE_0036	-	-	0,25	PACF_116	-	-	1	PACF_541	-	-	0,25
PAE_0011	-	-	0,25	PAE_0037	-	-	0,25	PACF_129	-	-	1	PACF_57	-	-	0,5
PAE_0012	-	-	0,5	PAE_0038	-	-	0,25	PACF_13	-	-	4	PACF_570	-	-	3 ^E
PAE_0013	-	-	0,25	PAE_0039	-	-	0,25	PACF_137	-	-	2	PACF_6	-	-	1_
PAE_0014	T83I	-	2	PAE_0040	T83I	-	4	PACF_15	-	-	2	PACF_657	T83I	-	2 ^E
PAE_0016	-	-	0,25	PAE_0041	-	-	0,25	PACF_186	-	-	0,5	PACF_662	-	-	0,25
PAE_0017	-	-	0,25	PAE_0042	-	-	0,25	PACF_194	-	-	1	PACF_672	-	-	0,25
PAE_0018	-	-	0,25	PAE_0043	T83I	-	0,5	PACF_205	-	-	0,25	PACF_73	-	-	0,25
PAE_0019	-	-	0,25	PAE_0044	-	-	0,25	PACF_21	-	-	2	PACF_74	T83I	-	4 ^E
PAE_0020	-	-	0,25	PAE_0046	-	-	0,25	PACF_229	-	-	0,25	PACF_76	T83I	-	3⁻
PAE_0021	-	-	0,25	PAE_0047	-	-	0,25	PACF_23	-	-	2_	PACF_813	-	-	0,25
PAE_0022	-	-	0,25	PAE_0048	-	-	0,25	PACF_281	T83I	-	3⊏	PACF_85	D87N	-	2
PAE_0023	-	-	0,25	PAE_0050	-	-	0,25	PACF_3	T83I	-	0,5	PACF_87	-	-	0,5
PAE_0025	-	-	0,25	PAE_0051	-	-	0,25	PACF_305	-	-	0,25	PACF_94	-	-	0,25
PAE 0026	-	-	0.25												

4.6.2.2 Imipenem-Resistenz

Mit dem Software-*Tool* GECO (Kuenne et al., 2007) für komparative Genomanalysen wurden in Abbildung 23-A diejenigen Gene als orthologe Gene (gleicher Typ) markiert, die mindestens 95 % Sequenzidentität über 90 % der Länge (Referenz: *PAO1*) besitzen. Die dargestellte Genregion zeigt nur Stämme mit verkürzten oder defekten *oprD*-Varianten. Die nicht dargestellten Stämme entsprechen dem *oprD*-Typ-A-WT (in *PAO1*) oder *oprD*-Typ-B-WT (in *LESB58*), wie in Tabelle 20 aufgelistet.

In den Abbildung 23-B und Abbildung 23-C wird die Verteilung der *oprD*-Typen unter den CAP- und CF-Stämmen in Kreisdiagrammen dargestellt. Es zeigt sich ein ähnlicher Anteil des Typ A-Wildtyps. Der Anteil defekter *oprD*-Gene zu WT-*oprD*-Genen ist unter den CF-Stämmen mit 23,1 % (n= 9) deutlich größer als unter den CAP-Stämmen (1,9 %, n= 1) (ETF, p = 0,0011). Auch verkürzte Varianten sind unter den CF-Stämmen (n= 3) geringfügig häufiger als unter den CAP-Stämmen (n= 1) gefunden worden (ETF, p = 0,1364).



Abbildung 23-A: Vergleich der zwei WT-(Wildtyp-) *oprD*-Varianten (*PAO1* und *LESB58*) sowie aller identifizierten defekten Gene (D) und verkürzte Varianten (-V), erstellt mit GECO (Kuenne et al., 2007). Abbildung 23-B und Abbildung 23-C zeigen die Verteilung der verschiedenen *oprD*-Typen unter den CAP- und CF-Stämmen.

Bei Gegenüberstellung mit den phänotypischen Imipenem-MHKs, wie in Tabelle 20 aufgeführt, zeigt sich, dass alle Stämme mit verkürztem oder defektem *oprD* eine Imipenem-Resistenz aufweisen. Nur bei *PAE_0025* kann dies aufgrund der ausgefallenen Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung nicht bestätigt werden. Imipenem-Resistenzen bei einem *oprD*-Wildtyp wurden unter zwei CAP- und drei CF-Stämmen gefunden.

Tabelle 20: Übersicht der *oprD*-Typen (rot: defekte Proteine und gelb: verkürzte Proteine), der *oprD*-Länge in bp und der durch das VITEK-2-System bestimmten Imipenem-MHKs aller Stämme in mg/l (die mit einem "E" markierten MHKs wurden durch E-Tests erhoben). Färbung nach sensibler (MHK: < 4 mg/l, grüne Färbung) und resistenter (MHK: > 4 mg/l, rote Färbung) Interpretation (nach EUCAST-Richtlinien, EUCAST, Version 9.0, 2019).

Stamm	<i>oprD</i> -Typ	oprD- Länge [bp]	lmipenem- MHK [mg/l]	Stamm	oprD-Typ	oprD- Länge [bp]	lmipenem- MHK [mg/l]	Stamm	oprD-Typ	<i>oprD</i> - Länge [bp]	lmipenem- MHK [mg/l]
PAO1	Typ A-WT	1332	2	PAE_0030	Typ B-WT	1326	16	PACF_15	Typ A-WT	1332	16
UCBPP-PA14	Typ A-WT	1332	k. A.	PAE_0031	Typ A-WT	1332	0,25	PACF_186	Typ B-WT	1326	1
DK2	Typ B-WT	1322	k. A.	PAE_0032	Typ B-WT	1326	1	PACF_194	Typ B-WT	1326	2
LESB58	Typ B-WT	1326	k. A.	PAE_0033	Typ B-WT	1326	1	PACF_205	Typ B-WT	1326	2
NCGM2.S1	D	-	k. A.	PAE_0034	Typ B-WT	1326	2	PACF_21	Typ B-WT	1326	1
PA7	Typ B-WT	1326	k. A.	PAE_0035	Typ B-WT	1326	1	PACF_229	Typ B-V	1284	16
PAE_0001	Typ B-WT	1326	2	PAE_0036	Typ A-WT	1332	1	PACF_23	D	-	16_
PAE_0002	Typ B-WT	1326	2	PAE_0037	Typ A-WT	1332	0,25	PACF_281	D	-	6 [⊏]
PAE_0004	Typ B-WT	1326	2	PAE_0038	Typ B-WT	1326	1	PACF_3	Typ A-WT	1332	2
PAE_0005	Typ B-WT	1326	2	PAE_0039	Typ B-WT	1326	0,25	PACF_305	Typ A-WT	1332	1
PAE_0006	Typ A-WT	1332	1	PAE_0040	Typ B-WT	1326	8	PACF_34	D	-	16_
PAE_0007	Typ A-WT	1332	2	PAE_0041	Typ A-WT	1332	1	PACF_36	D	-	16 ⁻
PAE_0008	Typ B-WT	1326	1	PAE_0042	Typ B-WT	1326	2	PACF_37	D	-	32⊏
PAE_0009	D	-	16	PAE_0043	Typ B-WT	1326	1	PACF_38	Typ A-WT	1332	0,25
PAE_0010	Typ B-WT	1326	1	PAE_0044	Typ B-WT	1326	2	PACF_39	Typ A-WT	1332	1
PAE_0011	Typ B-WT	1326	1	PAE_0046	Typ B-WT	1326	1	PACF_410	D	-	32⊏
PAE_0012	Typ B-WT	1326	2	PAE_0047	Typ B-WT	1326	2	PACF_43	Typ B-WT	1326	0,25
PAE_0013	Typ B-WT	1326	1	PAE_0048	Typ B-WT	1326	0,25	PACF_46	Typ A-WT	1332	0,25
PAE_0014	Typ B-WT	1326	2	PAE_0050	Typ B-WT	1326	1	PACF_47	Typ A-WT	1332	32⊏
PAE_0016	Typ B-WT	1326	2	PAE_0051	Typ B-WT	1326	1	PACF_541	Typ B-WT	1326	1
PAE_0017	Typ B-WT	1326	1	PAE_0053	Typ B-WT	1326	1_	PACF_57	Typ B-WT	1326	0,25
PAE_0018	Typ B-WT	1326	1	PAE_0054	Typ B-WT	1326	0,5⁻	PACF_570	D	-	32⊏
PAE_0019	Typ B-WT	1326	2	PAE_0055	Typ B-WT	1326	2	PACF_6	Typ B-WT	1326	0,25
PAE_0020	Typ A-WT	1332	2	PAE_0056	Typ B-WT	1326	1	PACF_657	Typ A-V	1251	32⊏
PAE_0021	Typ A-WT	1332	1	PAE_0057	Typ B-WT	1326	2	PACF_662	Typ B-WT	1326	1
PAE_0022	Typ A-WT	1332	1	PAE_0058	Typ B-WT	1326	2	PACF_672	Typ B-WT	1326	8
PAE_0023	Typ A-WT	1332	2	PAE_0059	Typ A-WT	1332	2	PACF_73	Typ B-WT	1326	1 _
PAE_0025	Typ B-V	1284	k. A.	PACF_106	Typ B-WT	1326	0,25	PACF_74	Typ B-WT	1326	0,125
PAE_0026	Typ A-WT	1332	0,5	PACF_115	D	-	16	PACF_76	Typ B-WT	1326	0,25 ^E
PAE_0027	Typ B-WT	1326	2	PACF_116	Typ A-WT	1332	2	PACF_813	Typ B-WT	1326	1
PAE_0028	Typ B-WT	1326	2	PACF_129	Typ B-V	1200	16	PACF_85	D	-	16
PAE_0029	Typ A-WT	1332	1	PACF_13	Typ A-WT	1332	2	PACF_87	Typ B-WT	1326	0,25
				PACF 137	Typ B-WT	1326	2	PACF 94	Typ A-WT	1332	0,5

4.6.3 Nachweis von Efflux-vermittelter Antibiotikaresistenz

Die RND-, MFP- und OMF-Gene wurden mit *dem* Protein-Homologie-Modell erfasst und mittels *Protein Overexpression Model* wurden die Datenbank-Übereinstimmungen der (hemmenden sowie aktivierenden) Transkriptionsregulator-Gene bestimmt. Äquivalent zu 4.6 wird aufgrund der RGI-Analyse (Jia et al., 2017, BLASTp) in diesem Abschnitt das Vorkommen von Proteinen beschrieben (Protein-Nomenklatur).



Abbildung 24: *Presence/Absence*-Matrix der mittels RGI (Jia et al., 2017) und ABRicate (BLASTx, https://github.com/tseemann/abricate) identifizierten Effluxpumpen- oder Regulationsgene. Die farbigen Pfeile sind äquivalent zur Abbildung 4. Die Identitätswerte (in %) sind farblich dargestellt: Grün: Perfekter Treffer (100 % Identität über mind. 85 % der Länge), Gelb: Ähnlicher Treffer (> 85 % Identität über mind. 85 % der Länge), Rot: Kein Treffer oder weniger als 85 % Identität, bzw. weniger als 85 % Längenabdeckung.

Während der Analyse der RGI-Ergebnisse fiel auf, dass die Gene *mexB* und *mexX* vom Software-*Tool* RGI (Jia et al., 2017) in keinem Stamm gefunden wurden, obwohl diese Gene in nahezu allen Stämmen annotiert worden sind. Um einen umfassenden Überblick der vier Effluxpumpen-Operons zu erlangen, wurde das Vorkommen von *mexB* und *mexX* durch ABRicate (BLASTx) überprüft. Die Aminosäuresequenzen wurden von der "Pseudomonas Genome DB" (*mexB* auf http://www.pseudomonas.com/feature/show/?id=103589&view=sequence und *mexX* auf http://www.pseudomonas.com/

Zur Übersicht der vier wichtigsten Effluxpumpen-Operons wurden die Effluxgene aus dem RGI-*Output* und der ABRicate-Analyse in der zusammenfassenden Abbildung 24 dargestellt. Die Effluxpumpen-Operons werden durch komplexe Regulationsmechanismen beeinflusst (Abbildung 4). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Gene für CpxR und NaID hochkonserviert sind und selten Veränderungen auf Aminosäureebene zeigen.

Die häufig mit Antibiotikaresistenz in Verbindung stehenden Repressoren MexR und MexZ sollen nun genauer analysiert werden. Insgesamt kommen Aminosäureaustausche in MexR bzw. MexZ entsprechend in 37 % (n= 34) bzw. 34 % (n= 31) aller Stämme vor und die Repressoren fehlen in 2 % (n= 2) bzw. 13 % (n= 12) der Stämme. Die CF-Stämme zeigen in MexR unwesentlich mehr und in MexZ (Chi², p < 0,001) deutlich mehr Austausche von Aminosäuren bzw. mehr fehlende Proteine durch defekte oder fehlende Gene als die CAP-Stämme. Veränderungen bei MexR sind in 32 % (n= 17) der CAP- sowie in 44 % (n= 17) der CF-Stämme und bei MexZ in 23 % (n= 12) der CAP- sowie in 49 % (n= 19) der CF-Stämme vorhanden. Acht der 12 Stämme mit einem fehlenden MexZ-Enzym sind CF-Stämme. Von den insgesamt 18 MDR und XDR Stämmen enthalten acht Stämme ein verändertes MexR (WT: n= 9, fehlt: n= 1) und acht Stämme ein verändertes MexZ (WT: n= 4, fehlt: n= 6). Kombinierte Veränderungen von MexR und MexZ konnten in insgesamt fünf CAP- und acht CF-Stämmen nachgewiesen werden. Vier der 13 (31 %) Stämme mit kombinierten Veränderungen waren MDR oder XDR Stämme.

5 Diskussion

Das ubiquitäre, opportunistische Bakterium Pseudomonas aeruginosa kann bei Menschen akute und chronische Lungeninfektionen auslösen. Als Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie (CAP) wird P. aeruginosa selten identifiziert (0,4 %, Von Baum et al., 2010 bis 4,2 %, Restrepo et al., 2018), wohingegen es bei der Mukoviszidose (CF) im Erwachsenenalter der häufigste Besiedler ist (60 %, Hauser et al., 2011). Bei beiden Erkrankungen gilt P. aeruginosa jedoch als Risikofaktor und korreliert mit einer erhöhten Mortalität, Eine Vielzahl der Antibiotikaresistenz-Mechanismen und Virulenzfaktoren des Bakteriums tragen zu schwerwiegenden Infektionen bei, deren Therapieergebnisse durch eine frühzeitige und korrekte Therapie verbessert werden können. In dieser Arbeit werden phänotypische Daten und Genomsequenzen von 92 P. aeruginosa-Stämme von CAP- und CF-Patienten direkt miteinander auf Genomebene verglichen. Dabei wurden die Themenschwerpunkte bei der Morphologie, Antibiotikaresistenz, Virulenz, Populations- und Genomstruktur sowie bei den durch horizontalen Gentransfer erworbenen Genen gesetzt. Die verschiedenen ökologischen Nischen, die CAP und CF dem Bakterium P. aeruginosa bieten. führen zu unterschiedlichen Anpassungsmechanismen, die durch diese komparative Phänotypenund Genomanalyse verdeutlicht werden sollen, um in Zukunft verbesserte Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

5.1 Genom-Sequenzierung

<u>Die Etablierung eines automatisierten Genomsequenzierungs-Workflows für</u> <u>P. aeruginosa ermöglicht eine schnelle und hochqualitative Isolat-Prozessierung</u>

In der vorliegenden Arbeit wurden 92 *P. aeruginosa*-Isolate von CAP- (ambulant erworbene Lungenentzündung, Stammbezeichnung: *"PAE_---"*) und CF-Patienten (Mukoviszidose, Stammbezeichnung: *"PACF_----"*) auf phänotypische und genotypische Unterschiede analysiert.

Für die automatisierte Herstellung hochqualitativer *Libraries* für die Genom-Sequenzierung mussten die *P. aeruginosa*-Isolate manuell in ein einheitliches 96-er Format überführt werden. Die DNA-Extraktion, DNA-Quantifizierung, *Library-Preparation* und die *Library*-Quantifizierung wurden mittels eines Pipettierroboters automatisiert durchgeführt. Im Zuge der Kultivierung und Prozessierung wurden qualitätssichernde Schwellenwerte bei der optischen Dichtemessung (Differenz OD₆₀₀ zur Negativkontrolle > 0,008), der DNA-Konzentration (> 0,2 ng/µl) und der *Library-*Molarität (> 5 nmol/l) festgelegt. Bei diesen Kriterien und der MALDI-TOF-Identifizierung wurden bei den CAP-Isolaten deutlich mehr Ausfälle verzeichnet, die auf eine ältere

90

Stammsammlung (angelegt zwischen 2002 und 2016) zurückzuführen sind. Die CF-Isolate hingegen wurden über vier Jahre (2014-2018) gesammelt, kurz vor dem Transport an die Justus-Liebig-Universität Gießen (JLU) ausgestrichen und auf Reinkulturen und Wachstum überprüft.

Auch nach erfolgreicher Genom-Sequenzierung mittels NGS-Technologie (Sequenziergerät: Illumina NextSeq 500) wurden Schwellenwerte (Anzahl von *Contigs* vor dem *Scaffolding*: < 300 nach *Scaffolding*: < 100, Mindest-*Coverage*: 30-fach) festgelegt, um eine hohe Genomsequenzqualität und erfolgreiche Genomannotationen zu gewährleisten.

Insgesamt zeigte die Verarbeitung der Isolate äußerst zufriedenstellende Ergebnisse und es stellte sich heraus, dass ältere, bzw. über einen langen Zeitraum gesammelte Stammsammlungen fehleranfälliger sind. Aufgrund des hohen Zeitaufwandes des manuellen Übertragens der Isolate auf ein einheitliches, mit einem Pipettierroboter prozessierbares Format sollten Stammsammlungen möglichst auf einheitliche Formate genormt werden. So lassen sich große Genomsequenzierungs-Projekte im Hochdurchsatz zügig, reproduzierbar und hochqualitativ durchführen.

5.2 Morphologie

Unter den CF-Stämmen von *P. aeruginosa* befinden sich deutlich häufiger *small colony* variants als unter den CAP-Stämmen

Die von CAP- und CF-Patienten isolierten P. aeruginosa-Isolate wurden aus der natürlichen Umwelt erworben. Die größten Unterschiede zwischen CAP- (akute Infektion) und CF-Stämmen (chronische Infektion) beruhen auf der Zeit, die die Bakterien in der Lungenumgebung verbringen. Die pseudomonale CAP verläuft in der Regel zügig und hochvirulent und ist dementsprechend mit schweren Verläufen und einer hohen 30-Tage-Mortalität verbunden (Cillóniz et al., 2016b). Allerdings sind die CAP-Erreger, bei frühzeitiger und wirksamer Antibiotika-Therapie, häufig erfolgreich zu eliminieren. Verglichen mit Isolaten von CF-Patienten haben die CAP-Isolate weniger Zeit, sich an die Umgebung anzupassen, bis antibiotisch therapiert wird. Im hochviskösen Mukus der Lungen von CF-Patienten können die Bakterien hingegen chronisch persistieren und haben die Möglichkeit, sich durch unterschiedliche Mechanismen (z. B. eine verstärkte Biofilmproduktion oder ein verlangsamtes Wachstum) anzupassen, bis eine vollständige Eradikation mit Antibiotika kaum noch möglich ist. In chronischen Infektionen von CF-Lungen können anfänglich mehrere Stämme beteiligt sein. Weil das Durchsetzen eines dominanten Stammes häufig mit einem Wechsel zum mukoiden Phänotypen gekennzeichnet ist (Govan und Deretic, 1996; LiPuma, 2010), war ein hoher Anteil mukoider Phänotypen unter den CF-Isolaten zu erwarten. Mit 9 % (n= 5) unter den CAP- und 15 % (n= 6) unter den CF-Stämmen zeigt sich bei den Stämmen dieser Arbeit ein geringer Trend hinsichtlich dieser Erwartung. Clark et al. zeigten, dass CF-spezifische P. aeruginosa-Populationen eine enorme phänotypische Heterogenität aufweisen und bei Änderungen des Selektionsdrucks sehr dynamisch variieren (Clark et al., 2015). Deshalb ist nicht ausgeschlossen, dass die Bakterienisolate nach der Entnahme aus der Lunge des CF-Patienten einen differenziellen Phänotypen bilden. Die komparative Genomanalyse dieser Arbeit zeigt, dass alle CAP-Stämme mit mucA-Mutationen einen mukoiden Phänotyp ausbilden, wohingegen es unter den CF-Stämmen nur ca. 33 % sind. Dies deutet darauf hin, dass die mucA-mutierten, nicht-mukoiden Stämme durch andere Regulationsmechanismen die Induzierung der Alginat-Überproduktion durch den Anti-Sigma-Faktor MucA kompensieren. Es ist naheliegend, dass diese Stämme zu einem früheren Zeitpunkt einen mukoiden Phänotyp ausbildeten, weshalb sie auch als Revertanten bezeichnet werden. Das Vorkommen dieser Revertanten unter CF-Isolaten wurde bereits von Ciofu et al. beschrieben, bei denen 69 % der nicht-mukoiden Isolate langfristiger P. aeruginosa-Besiedlungen Mutationen im mucA-Gen enthielten. Bei CF-Isolaten mit kurzen Besiedlungszeiten wurden von Ciofu et al. keine mucA-Mutationen bei nicht-mukoiden Stämmen identifiziert (Ciofu et al., 2008). Dies ist übereinstimmend mit den CAP-Stämmen dieser Arbeit, die sich ebenfalls durch kurze Infektionszeiten auszeichnen. Obwohl in dieser Arbeit nur etwa 36 % der nicht-mukoiden CF-Isolate mucA-Mutationen beinhalteten, lassen sich die Ergebnisse mit der Publikation von Ciofu et al. in Einklang bringen. Aufgrund der höheren Mutationsrate von Isolaten mit längeren Besiedlungszeiten bei Ciofu et al. liegt die Vermutung nahe, dass sich unter den CF-Stämmen dieser Arbeit möglicherweise CF-Isolate mit kürzeren Besiedlungszeiten befinden und dass nach längerer Besiedlungszeit mehr Stämme mit mucA-Mutationen zu erwarten sind.

Die Unterschiede der phänotypischen Koloniemorphologien zwischen CAP- und CF-Isolaten zeigen sich geringfügig anhand der mukoiden Phänotypen und deutlich anhand der Koloniegröße, deren Verteilung bei den CF-Stämmen, verglichen mit den CAP-Stämmen, in Richtung kleinerer Kolonien verschoben ist. Die vermehrt auftretenden *small colony variants* wachsen deutlich langsamer und sind als Folge der Anpassungsmechanismen der CF-Stämme an die antibiotisch behandelte CF-Lunge mit der Literatur zu vereinbaren (Clark et al., 2015; Hauser et al., 2011; Sousa Mesquita et al., 2013; Tümmler und Kiewitz, 1999).

5.3 Antibiotikaresistenz

Die *P. aeruginosa*-Isolate von CF-Patienten zeigen deutlich mehr Antibiotikaresistenzen als von CAP-Patienten

Der Umgang mit steigenden Antibiotikaresistenzen stellt eine der größten medizinischen Aufgaben in den nächsten Jahrzehnten dar. Bis 2050 könnten Infektionserkrankungen durch antibiotikaresistente Bakterien den Tod von 10 Millionen Menschen bedeuten (O'Neill, 2014). Bei weiter sinkender Anzahl wirksamer Antibiotika droht eine Zeit ohne Antibiotika, die häufig als "postantibiotische Ära" bezeichnet wird. Das Thema erreicht in den letzten Jahren zwar immer mehr öffentliche Aufmerksamkeit, es ist jedoch umso wichtiger, dass durch internationale Zusammenarbeit verschiedener Berufsgruppen und der Politik alternative Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden. Dafür ist jedoch ein umfassendes Verständnis der Antibiotikaresistenz-Mechanismen unerlässlich.

Die in dieser Arbeit analysierten *P. aeruginosa*-Stämme zeigen im Bereich der Antibiotikaresistenzen große Unterschiede (Abbildung 25). Mit sieben MDR (*multidrug-resistant*) und neun XDR Stämmen (*extensively drug-resistant*) sind unter den CF-Stämmen deutlich mehr phänotypisch hochresistente Stämme vertreten als unter den CAP-Stämmen (zwei MDR Stämme). In Abbildung 25 sind jedoch Ähnlichkeiten in der Verteilung der phänotypischen Antibiotikaresistenzen zu erkennen.



Abbildung 25: Vergleich der resistenten Stämme (intermediäre Stämme gelten auch als resistent) unter den CAP- und CF-Stämmen. Bei der Empfindlichkeitsprüfung ausgefallene Stämme wurden für das jeweilige Antibiotikum nicht berücksichtigt. Die Sterne stehen für die p-Werte (siehe 3.4, ETF).

Wie Abbildung 3 zeigt, wurden nach dem ECDC-Überwachungsbericht 2017 die wenigsten Resistenzen bei *P. aeruginosa* gegen Aminoglykoside verzeichnet (EU: 13,2 % und Deutschland: 4,8 % resistente Stämme, ECDC, 2018).

Dies deckt sich nicht mit den Daten aus dieser Arbeit, weil unter den CAP- und den CF-Stämmen die meisten Antibiotikaresistenzen bei den Aminoglykosiden Amikacin und Gentamicin sowie dem Fluorchinolon Ciprofloxacin gefunden wurden. Mindestens 10 % der CAP- und etwa die Hälfte (mindestens 47 %) der CF-Stämme sind resistent gegen diese Antibiotika.

In den Daten dieser Arbeit konnte unter den Penicillinen keine verbesserte Wirksamkeit von Piperacillin durch die zusätzliche Verabreichung des β-Laktamase-Inhibitors Tazobactam festgestellt werden. Dies sollte mit einem größeren Probenumfang überprüft werden und eventuell die Vor- und Nachteile der Kombination von Piperacillin und Tazobactam bei *Pseudomonas*-Infektionen evaluiert werden.

Bei der MDR-, XDR- und PDR-Einteilung ist anzumerken, dass die Autoren eine Fosfomycin-Testung voraussetzen (Magiorakos et al., 2012). Es werden allerdings hohe Resistenzlagen von *P. aeruginosa* gegenüber Fosfomycin beschrieben (Yayan et al., 2015). Von der EUCAST ist Fosfomycin zwar noch nicht als intrinsische Resistenz bei P. aeruginosa gelistet, jedoch soll die Liste im Laufe von 2019 aktualisiert werden (EUCAST, 2016), wobei seit 2012 in den EUCAST-Richtlinien keine MHKs mehr zur Interpretation vorgegeben werden. Die meisten P. aeruginosa-Isolate (> 70 %) haben laut EUCAST MHKs zwischen 32 mg/l und 128 mg/l, die MHKs haben allerdings ein breites Spektrum. Aufgrund der maximalen Fosfomycin-Blutserum-Konzentration von 132 mg/l wird eine Monotherapie nicht empfohlen und die Fosfomycin-Resistenz in dieser Arbeit nicht berücksichtigt (EUCAST, Version 1.0, 2013). Die aufgrund des zu geringen Wachstums ausgefallenen VITEK-2-Testungen wurden durch den E-Test ersetzt. Weil die MHKs des E-Tests in wesentlich genaueren Konzentrations-Stufen abzulesen sind, sind die Ergebnisse selten absolut übereinstimmend. Die zwei Testsysteme gelten jedoch als Goldstandard und ergaben in Vergleichen hohe Übereinstimmungen, sodass die Interpretationen miteinander vergleichbar sind (Saegeman et al., 2005). Außerdem wird bei P. aeruginosa die Colistin-Resistenz-Testung durch den E-Test und das VITEK-2 System als unzureichend betrachtet und sollte in weiteren Analysen mit dem Bouillon-Mikrodilutionsverfahren durchgeführt werden (Girardello et al., 2018).

Hochresistente CF-Stämme entwickeln sich in Lungen von CF-Patienten aufgrund des Persistierens mit vielen und langen antibiotischen Behandlungsphasen. Resistente Stämme überleben bei erhöhtem Selektionsdruck, also unter Antibiose, und können sich vermehren (Hauser et al., 2011). Ein großer Persistenz-Faktor ist die Bildung von Biofilmen, in denen die Bakterien häufig von Antibiotika geschützt sind. Es zeigte sich, dass die Eradikation von *P. aeruginosa* aus der CF-Lunge in späteren Zeitpunkten der Infektion immer problematischer wird. Darum sollte zu einem frühen Zeitpunkt während

94

der Infektion behandelt werden, wenn viele Bakterien noch in einem planktonischen Zustand sind und die Behandlung erfolgsversprechender ist (Cohen-Cymberknoh et al., 2016). Es ist anzunehmen, dass die resistenten CAP-Stämme bereits Kontakt mit Antibiotika hatten. Dies kann zum einen während einer Besiedelung geschehen sein, zum anderen können resistente Bakterien z. B. durch eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung erworben worden sein. Die Aufnahme resistenter Erreger aus der Umwelt ist ebenfalls möglich, denn z. B. Abwässer aus Gemeinden, Krankenhäusern und Tierzucht bilden eine Eintrittspforte von Antibiotika in die Umwelt und erhöhen den Selektionsdruck. Insbesondere Kläranlagen stellen einen Hotspot von horizontalem Gentransfer und genetischer Selektion zugunsten der Resistenzentwicklung gegenüber antibiotischen Mitteln dar (Roca et al., 2015).

Vorhersage von phänotypischen Antibiotikaresistenzen aus Genomdaten

Als grundlegender Baustein einer erfolgreichen Antibiotikatherapie wird häufig ein im Vorhinein erstelltes Antibiogramm vorausgesetzt. Für die Wahl des richtigen Antibiotikums sollten daraufhin Patienten-Faktoren, wie die bisher verabreichten Antibiotika, mit einbezogen werden, denn der größte Risikofaktor einer Entwicklung von MDR Isolaten ist eine vorausgegangene Antibiotika-Therapie (Stefani et al., 2017). Insbesondere bei der CAP zeigen sich signifikant erhöhte unzureichende antibiotische Behandlungen bei Infektionen mit P. aeruginosa, die durch ein Antibiogramm oder ein verstärktes Augenmerk der Ärzte auf vorherige Therapien und mögliche Resistenzen verringert werden können (Cillóniz et al., 2016b). Bei CF hat sich jedoch gezeigt, dass Behandlungen nach Ergebnissen der Resistenztestung die klinischen Therapieergebnisse nicht positiv beeinflusst haben (Hurley et al., 2012). Außerdem zeigten CF-Patienten mit resistenten Stämmen eine schnellere Progression der Erkrankung, die schlechtere Lungenfunktionen und häufigere Lungentransplantationen beinhalten (Lechtzin et al., 2006). Daher muss immer zwischen den Vorteilen des Antibiotikaeinsatzes und der Resistenzentwicklung abgewogen werden und für die Behandlung von resistenten P. aeruginosa-Isolaten sollten in Zukunft neue Strategien entwickelt werden (Hauser et al., 2011; Stefani et al., 2017).

Die Vorhersage phänotypischer Antibiotikaresistenzen aus Genomdaten ist als Forschungsgegenstand weit verbreitet (Jaillard et al., 2017; J. Jeukens et al., 2017; Julie Jeukens et al., 2017; Su et al., 2019), weil klinisch ein großes Potential zur Therapieverbesserung geboten wird. Kommt es zu weiteren Verkürzungen der zeitlichen Isolations- und Sequenzierungsschritte kann die Zeit der Kultivierung und phänotypischen Empfindlichkeitstestungen weit unterschritten werden. Somit könnte das Resistom (Gesamtheit aller Antibiotikaresistenzgene) eines Stammes, zumindest

95

teilweise, die Wahl des initialen Antibiotikums bzw. der Antibiotika-Kombination beeinflussen, um eine höhere Erfolgsquote antibiotischer Behandlungen zu erreichen und die Entstehung von Resistenzen zu verringern.

Obwohl zwischen der Anzahl der SNPs (ermittelt von ASA³P zur Referenz PAO1, Oliver Schwengers et al., 2019) der CAP- und der CF-Stämmen keine bedeutsamen Unterschiede festgestellt werden konnten, wurden unter den CF-Stämmen häufiger SNPs in Genen gefunden, die durch Mutationen in bestimmten Regionen Antibiotikaresistenzen zur Folge haben: Verglichen mit den CAP-Stämmen waren resistenzvermittelnde Mutationen in gyrA geringfügig erhöht (Chi², p = 0.2171), in oprD jedoch deutlich erhöht (Chi², p = 0,0008). Die vermehrten Mutationen in CF-Stämmen sind auf einen Selektionsvorteil der mutierten Stämme bei antibiotischer Behandlung zurückzuführen. CF-Stämme zeigen in der Literatur bei Antibiotikatherapie eine schnelle Resistenzentwicklung (Tueffers et al., 2019). Außerdem konnten unter den untersuchten CF-Stämmen eine höhere Variabilität erworbener Resistenzgene gefunden werden. In Bezug auf die Ciprofloxacin-Resistenz wurde gezeigt, dass die meisten der Ciprofloxacin-resistenten CF-Stämme keine der publizierten gyrA-Mutation enthalten. Ein Zusammenhang mit dem Vorkommen von Resistenzgenen, wie dem Fluorchinolon-Resistenzgens crpP oder von Aminoglykosid-modifizierenden Enzymen (AMEs), die auch eine Wirkung auf Fluorchinolone haben können (1.4.3), konnte nicht hergestellt werden.

Die Vielzahl von Effluxpumpen ist ein wichtiger Faktor der Antibiotikaresistenz bei *P. aeruginosa*. In dieser Arbeit wurde sich auf die vier der am prominentesten geltenden Effluxsysteme und deren Regulation beschränkt, das Expressionsverhalten kann jedoch nicht sicher von der Genomebene auf die Transkriptomebene vorausgesagt werden. Die Expression wird durch viele verschiedene Gene beeinflusst, die wiederum mit Umweltbedingungen und weiteren komplexen Regulationsnetzwerken zusammenhängen (Fernández und Hancock, 2012; J. Jeukens et al., 2017).

Es wurden jedoch auch bei den Transkriptionsregulatoren der Effluxpumpen mehr Mutationen unter den CF-Stämmen gefunden, deren Auftreten jedoch nicht direkt mit einer phänotypischen Resistenz in Zusammenhang gebracht werden konnte. Verglichen mit einer Studie von Kiser et al. zeigten wesentlich weniger Stämme dieser Arbeit mit kombinierten Mutationen in *mexR* und *mexZ* oder fehlenden Genen eine Multiresistenz (Kiser: 92 %, diese Arbeit: 47 %, ETF, p = 0,0086). Hingegen konnten Kiser et al. die Mutationen in *mexR* und *mexZ* ebenfalls nicht mit einer *oprM*-Überexpression oder mit dem Auftreten von multiresistenten *P. aeruginosa*-Stämmen korrelieren (Kiser et al., 2010). Die Vorhersage Efflux-vermittelter Resistenz lässt sich besser durch die EffluxGen-Expression als durch das Vorkommen von Efflux-Genen bestimmen (Li und Nikaido, 2009). Die Überexpression von Effluxpumpen-Genen kann nicht nur durch Mutationen lokaler Repressoren, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, sondern auch durch Mutationen globaler Transkriptionsregulatoren, Mutationen in Promotor-Regionen der Efflux-Gene und durch Insertionselemente stromaufwärts des Efflux-Gens vermittelt werden (Julie Jeukens et al., 2017; Piddock, 2006). Diese Faktoren führen zu einem hochkomplexen Regulationsnetzwerk, deren Zusammenhänge durch Transkriptionsanalysen erfasst werden sollten.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass phänotypische Antibiotikaresistenzen nur zum Teil aus Genomdaten vorausgesagt werden können. Sollte anhand einer Genomanalyse die antibiotische Therapie ermittelt werden, haben bestimmte SNPs in *oprD* und *gyrA* sowie erworbene AMEs oder β-Laktamasen das größte Potenzial zur genetischen Resistenzvorhersage. Als diagnostischer Test zum Erkennen von phänotypischen Antibiotikaresistenzen zeigt das Auftreten publizierter SNPs in *gyrA* und *oprD* eine hohe Spezifität (*gyrA*: 0,97, *oprD*: 1,0), jedoch eine geringe Sensitivität (*gyrA*: 0,52, *oprD*: 0,72). Somit haben SNPs in diesen Genen zu hoher Wahrscheinlichkeit eine Resistenz zur Folge, bei Wildtyp-Genen kann jedoch nicht direkt von einer Sensibilität ausgegangen werden.

Insbesondere das Protein-Varianten-Modell AME-Gene liegen häufig auf mobilen genetischen Elementen wie Transposons, Integrons oder Plasmiden (Khaledi et al., 2019), wie auch in Abbildung 22 gezeigt wurde. Zwei der sechs Stämme (PACF 34 und PACF_657) sind XDR Stämme. Die nicht automatisch annotierten Gene zeigen Überschneidungen mit intl (aac(6') und ant(2")), bzw. sul1 (gacE), durch die vermutlich die Annotation von Prokka fehlgeschlagen ist. Das erhöhte Vorkommen erworbener Resistenzgene in dieser Genkassette in Zusammenhang mit sul1 findet hohe Übereinstimmungen mit der Literatur (Hall et al., 1994; Jaillard et al., 2017; Kouda et al., 2009; Ozer et al., 2014) und das Vorkommen der AMEs lässt sich sehr genau mit den phänotypischen Resistenzen in Zusammenhang bringen. Somit ist das Gen sul1 aufgrund des häufigen Vorkommens in Resistenzgen-tragenden Integrons ein Marker für mögliche durch horizontalen Gentransfer erworbene Gene und phänotypisch hochresistente Stämme. Die erworbenen aac(6')-Varianten in den Hochrisikoklonen PAE 0028 und PAE 0033 sind einzigartig unter den CAP-Stämmen und sind die Auslöser der Gentamicin- und Tobramycin-Resistenz. Unter den CF-Stämmen sind einige Stämme resistent gegen Aminoglykoside, die keine erworbenen AMEs besitzen. Diese Stämme müssen differenzielle Resistenzmechanismen, wie z. B. eine verringerte Zellmembranpermeabilität, einen erhöhten Efflux oder Modifikationen ribosomaler Proteine nutzen (Ramirez und Tolmasky, 2010).

Jedoch stellt momentan insbesondere die differenzielle Expression von Effluxpumpen und β -Laktamasen die größte Herausforderung in Bezug auf die Resistenzvorhersage dar. Zur Verbesserung der Vorhersage von Antibiotikaresistenzen aus Genomdaten werden weitere Genom- und Transkriptomanalysen benötigt, um das Verständnis von Resistenzmechanismen auf Genomebene zu verbessern und Korrelationen zwischen genetischen Ausprägungen (SNPs) und Genexpression herzustellen. Für diese Analysen bauen bereits Algorithmen statistische Modelle auf (maschinelles Lernen), die in den nächsten Jahren durch viele weitere Studien möglicherweise die Resistenzvorhersage verbessern werden (Khaledi et al., 2019; Su et al., 2019).

5.4 Populationsstruktur

CAP- und CF-Stämme zeigen gleiche epidemische Populationsstrukturen

Die für diese Arbeit sequenzierten Stämme sollen in Zusammenhang mit der bestehenden Populationsstruktur von *P. aeruginosa* gesetzt werden, die seit der Möglichkeit der Hochdurchsatz-Sequenzierung in den letzten Jahren immer häufiger als Forschungsschwerpunkt gewählt worden ist (Freschi et al., 2018b, 2018a; Hilker et al., 2015; Ozer et al., 2019). Unterschiede der aus CAP und CF isolierten Stämme sowie Unterschiede zwischen den phylogenetischen Gruppen werden im Folgenden anhand verschiedener Kriterien, wie MLST, Serotyp, genomischen Inseln und Virulenzgenen erläutert.

Die MLST-Analyse zeigt eine große Variabilität unterschiedlicher Sequenztypen (ST) mit einzigartigen Allelprofilen in 58 % der CAP- und 56 % der CF-Stämme. Es sind einige Stämme mit gleichen Sequenztypen vorhanden, die häufigsten Sequenztypen sind ST-395 mit vier CAP- und vier CF-Stämmen sowie ST-17 mit drei CAP- und zwei CF-Stämmen. Diese nehmen allerdings keine vorherrschende Stellung ein. Um Faktoren wie geografische Zusammenhänge oder direkte Patientenübertragungen zu beachten, wurde nach Zusammenhängen zwischen Sequenztypen und Parametern, z. B. Datum und Ort der Probenentnahme sowie Patientenalter und -geschlecht gesucht. Vereinzelt lassen sich unter den CAP-Stämmen Verbindungen zwischen Stämmen herstellen, ansonsten sind jedoch keine Zusammenhänge gefunden worden. So wurden die phylogenetisch nah verwandten Stämme *PAE_0013* und *PAE_0014* (ST-17) innerhalb von drei Tagen im selben Krankenhaus isoliert. Eine gleiche Quelle der Infektion, beispielsweise im selben Altersheim, ist bei den beiden Patienten höheren Alters zu vermuten. Die nah verwandten Stämme *PAE_0026* und *PAE_0031* (ST-2644) wurden ebenfalls im selben Krankenhaus isoliert, *PAE_0031* allerdings ziemlich genau ein Jahr später. Diese mehrfach auftretenden ST könnten jedoch auf klonale Ausbreitungen in vereinzelten Kranken- oder Pflegeeinrichtungen zurückzuführen sein.

Die Multilokus-Sequenztypisierung dieser Arbeit bestätigt demnach die bekannte epidemische Populationsstruktur, die sich durch häufige Rekombinationen und einem gelegentlichen Auftreten von erfolgreichen epidemischen Klonen auszeichnet (Kidd et al., 2012; Lomholt et al., 2001; Pirnay et al., 2002).

Das ebenfalls zur Ordnung der *Pseudomonadales* gehörige, multiresistente Bakterium, *Acinetobacter baumannii*, wurde wie *P. aeruginosa* von der WHO als kritisch (Priorität 1) eingestuft (Tacconelli et al., 2017). In Bezug auf die Populationsstruktur zeigen sich jedoch große Unterschiede, denn *A. baumannii* verbreitet sich weltweit klonal in wenigen klonalen Komplexen und die Phylogenie wird als sternförmig beschrieben. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich die Population von *A. baumannii* aufgrund eingeschränkter ökologischer Nischen in der Vergangenheit stark verkleinert hat. Heutzutage ist die Verbreitung von *A. baumannii* aufgrund der hochresistenten Klone, insbesondere in klinischen Umgebungen, wieder möglich (Diancourt et al., 2010).

Unter klinisch erworbenen nosokomialen Infektionen werden Hochrisikoklone als vorherrschend beschrieben (Cabot et al., 2012; Oliver et al., 2015). Die drei unter den CAP-Stämmen identifizierten Hochrisikoklone zeigen jedoch unterschiedliche Übereinstimmungen mit der Literatur. Der Stamm PAE_0037 (ST-235 und O11) befindet sich phylogenetisch nah am multiresistenten Referenzstamm NCGM2.S1. Im Gegensatz zur beschriebenen Multiresistenz global verbreiteter Isolate mit ST-235 (Treepong et al., 2018) ist PAE 0037 jedoch sensibel gegen alle getesteten Antibiotika. Die Hochrisikoklone PAE_0028 und PAE_0033 besitzen neben dem gleichen ST (ST-111) und dem gleichen Serotypen (O12), der als vorherrschend unter multiresistenten klinischen Isolaten gilt, auch das gleiche phänotypische Resistenzmuster und mit über 7 Mbp überdurchschnittlich große Genome. Eine ähnliche Konstellation wurde von Thrane et al. beschrieben, die eine "Serotyp-Insel" im Referenzstamm PA7 annotierten (Thrane et al., 2015). Zum Nachweis dieser genomischen Insel wurde im Anhang (Abbildung E-23) ein vergrößerter CCT-Ausschnitt dieser "Serotyp-Insel" durch Nutzung des Gruppe 3-Stamms PA7 (Serotyp O12) als Referenz dargestellt. Es zeigt sich deutlich, dass die genomische Insel vollständig in PAE_0028 und PAE_0033 vorhanden ist. Demnach stammt die Insel von einem PA7-ähnlichen Stamm. Neben dem OSA-Gencluster befindet sich auch gyrA mit dem SNP "C248T" auf dieser Insel. Dieser SNP wurde auch in PAE_0028 und PAE_0033 als Auslöser der phänotypischen Ciprofloxacin-Resistenz identifiziert.

5.5 Serotypen

Die Verteilung der Serotypen zeigt große Übereinstimmungen zwischen CAP- und CF-Stämmen, ist jedoch abhängig von der phylogenetischen Gruppenzuordnung

Die Klassifizierung von P. aeruginosa-Stämmen anhand ihres Serotyps ist in der Literatur weit verbreitet. Die Verteilung von Serotypen wird zum Teil mit dem Auftreten von Antibiotikaresistenzgenen, Virulenzgenen und der phänotypischen Virulenz sowie den klinischen Folgen in Zusammenhang gesetzt. In früheren Studien wurde der Serotyp durch serologisch-basierende Methoden (in vitro) überprüft, heutzutage wird allerdings immer häufiger die in silico-Analyse genutzt. Studien, die den Serotypen durch serologische Methoden bestimmten, zeigten zwischen 8 % (Lu et al., 2014) und 37,5 % (Le Berre et al., 2011) nicht-serotypisierbarer Stämme, die häufig von Patienten mit chronischen Infektionen isoliert wurden (Faure et al., 2003). In dieser Arbeit konnten nur zwei Stämme nicht typisiert werden, einer jeweils unter den CAP- und CF-Stämmen. Die Aussage, dass nicht-serotypisierbare Stämme unter den CF-Isolaten erhöht vorkommen, lässt sich mit den Daten dieser Arbeit nicht bestätigen. Das verringerte Auftreten nicht-serotypisierbarer Stämme bei in silico-Analysen ist einer der größten Vorteile im Gegensatz zur in vitro-Analyse (Thrane et al., 2016). Die Gen-Region des O-Antigen-Cluster, die als Replacement Island nur durch homologe Rekombination ersetzt wird, ist in fast allen Stämmen vorhanden, jedoch zeigen die kodierenden Gene, die den Serotypen definieren, innerhalb dieser Replacement Island eine hohe Divergenz.

Studien identifizierten O6 (17 %), O11 (15 %) und O5 (12 %) als häufigste Serotypen bei Isolaten aus Brandwundinfektionen (Estahbanati et al., 2002) und O6 (37 %) und O11 (17,8 %) bei Isolaten aus beatmungsassoziierten Pneumonien (Le Berre et al., 2011). O6 (14,1 %), O1 (9,1%) und O11 (8,1 %) wurden bei klinischen Isolaten (Faure et al., 2003) und O6 (29 %), O11 (23 %), O10 (10 %), O2 (9 %) und O1 (8%) bei Isolaten nosokomialer Pneumonien (Lu et al., 2014) am häufigsten gefunden. Die Serotypen O6 und O11, die in dieser Arbeit am häufigsten identifiziert wurden, sind demnach übereinstimmend mit diesen Studien. Der in dieser Arbeit als dritthäufigstes identifizierte Serotyp O1 wurde in der Studien von Faure et al. häufiger bei Isolaten akuter Infektionen gefunden als bei chronischen Infektionen (17,6 % vs. 3,2 %) (Faure et al., 2003). In dieser Arbeit zeigt sich kein Zusammenhang in der Verteilung des Serotyps O1 zwischen Isolaten akuter und chronischer Infektionen (CAP: 11 %, n= 6; CF: 15 %, n= 6; Chi², p = 0,5674), allerdings werden hier aufgrund der geringen Datenanzahl weitere Feldstudien benötigt.

In einer Studie, durchgeführt von den Entwicklern der Serotypisierungs-Software PAst (Thrane et al., 2016), wurde die Verteilung der Serotypen von 1120 *P. aeruginosa*-

Isolaten verschiedener Quellen (nicht-CF) mit 529 CF-Isolaten verglichen. Der Serotyp O3 kam in ca. 26 % der nicht-CF-Isolate vor, jedoch in nur ca. 7 % der CF-Isolate. Ähnlich ist es mit dem Serotypen O11, der bei 14 % der nicht-CF-Isolate und bei nur 1,5 % der CF-Isolate nachgewiesen wurde (Thrane et al., 2016). Dies bestätigt sich in dieser Arbeit nicht, denn O3 und O11 zeigen keinen Zusammenhang in der Verteilung zwischen CAP- und CF-Stämmen (Chi², p = 0,9559). Die Serotypen O7, O10 und O11 sind deutlich häufiger in Stämmen der phylogenetischen Gruppe 2 zu beobachten (ETF, p < 0,0001), die Stämme aus der Gruppe 1 zeigen hingegen eine größere Variabilität.

5.6 Virulenzfaktoren

Isolate aus den verschiedenen phylogenetischen Gruppen, die mit dem Vorkommen von *exoS* und *exoU* zusammenhängen, stammen aus unterschiedlichen ökologischen Nischen

Wie in Tabelle 21 ersichtlich wird, kann aus den Daten dieser Arbeit eine Populationsstruktur aus zwei Hauptgruppen (Gruppe 1 und 2, etwa 97 % der Stämme), der phylogenetisch weit entfernten Gruppe 3 und einer neuen Gruppe 4, bestätigt werden. Vertreter der Gruppe 5 wurden nicht gefunden, die Definition der Gruppen 4 und 5 als eigenständige Gruppen muss demnach in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Tabelle 21: Verteilung der in dieser Arbeit verglichenen Bakterienstämme (CAP- und CF-Stämme) und der Stämme aus der Studie von Freschi et al. auf die phylogenetischen Gruppen (Freschi et al., 2018b).

	C	AP-Sta	ämme	e (n=	53)	С	F-Stä	mme	(n= 3	9)	Freschi et al. (n= 1315)				
Phylogenetische Gruppen	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Anzahl Stämme [n]	38	14	0	1	0	27	11	1	0	0	986	297	14	11	7
Verteilung [%]	71,7	26,4	0,0	1,9	0,0	69,2	28,2	2,6	0,0	0,0	75,0	22,6	1,1	0,8	0,5

In bisherigen Studien wurde beschrieben, dass CF-Isolate vermehrt der phylogenetischen Gruppe 1 zuzuordnen sind (Feltman et al., 2001; Ozer et al., 2019). Im phylogenetischen Vergleich der Bakterienstämme von CAP- und CF-Patienten dieser Arbeit zeigen sich jedoch keine Unterschiede. Die Gruppenverteilung unter den CAPund CF-Stämmen ist mit etwa 70 % der Stämme in Gruppe 1 und etwa 27 % in Gruppe 2 vergleichbar groß und entspricht dem Verhältnis der groß angelegten Studie von Freschi et al. (Tabelle 21, Chi², p = 0,3164), die jedoch einen geringfügig größeren Anteil von Stämmen aus Gruppe 1 enthält. Freschi et al. nutzten für die Analysen alle bei NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/187) und **IPCD** (International Pseudomonas Consortium Database) verfügbaren Genom-Assemblies. Für Abbildung 11, Abbildung 12-D und die phylogenetischen Bäume dieser Arbeit wurden nur die
geschlossenen Genome der RefSeq-Datenbank von NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/187, (O'Leary et al., 2016) (Liste in Datei E-4) verwendet. Jedoch bilden diese Stämme keine durchschnittliche Populationsstruktur, weil sich zum Teil mehrere *Assemblies* desselben Stammes bzw. Varianten eines Stammes, z. B. die Alginat-überproduzierenden PAO1 Varianten "PAO1-VE2" und "PAO1-VE13" in den Datenbanken befinden. Diese Varianten können die Verteilung der Populationsstruktur in die phylogenetischen Gruppen verzerren (Freschi et al., 2018b).

In früheren Studien wurden *P. aeruginosa*-Isolate als invasiv oder zytotoxisch klassifiziert (Fleiszig et al., 1996). Diese Eigenschaften wurden später auf das Vorkommen der Exoenzyme ExoS oder ExoU zurückgeführt. Das Auftreten des einen Gens schließt in fast allen Fällen das andere aus (Feltman et al., 2001) und bestimmt die Zugehörigkeit zur phylogenetischen Gruppe (Freschi et al., 2018b; Ozer et al., 2019; Wiehlmann et al., 2007). So enthalten annähernd alle Stämme der Gruppe 1 *exoS*, der Gruppe 2 *exoU* und der Gruppe 3 keines der Gene. Unterschiedliche Studien ermittelten ein erhöhtes Vorkommen von Stämmen der Gruppe 1, also *exoS*-positive Stämme, in CF-Populationen (Faraji et al., 2016; Feltman et al., 2001; Ozer et al., 2019). In den Daten dieser Arbeit lassen sich keine Unterschiede zwischen der phylogenetischen Gruppenverteilung der CAP- und CF-Stämme erkennen. Dies lässt vermuten, dass beide Stamm-Gruppen aus der natürlichen Umwelt entstammen und dass die Etablierung von akuten und chronischen Infektionen von Stämmen beider phylogenetischer Gruppen möglich ist.

Zwischen Stämmen der phylogenetischen Gruppen werden "genetische Barrieren" beschrieben, wobei nachgewiesen wurde, dass innerhalb der Gruppen ein stärkerer Gentransfer von *Core-* und *Accessory-*Genen stattfindet als zwischen den Gruppen (Ozer et al., 2019). Dies ist vermutlich auf Anpassungen an unterschiedliche ökologische Nischen zurückzuführen. Vertreter beider Gruppen werden weltweit identifiziert, die genauen ökologischen Nischen sind jedoch nicht bekannt (Ozer et al., 2019).

Bei Infektionen wird *exoU* eine stärkere Virulenz und *exoS* eine größere Rolle in der Kolonisierung und Infektionsausbreitung zugeschrieben (Schulert et al., 2003; Selezska et al., 2012; Shaver und Hauser, 2004), wobei *exoU*-positive Isolate mit schwerwiegenderen Infektionen sowie mit einer erhöhten Mortalität in Verbindung gebracht werden (Pea et al., 2015; Schulert et al., 2003; Shaver und Hauser, 2004). Die Virulenz von *P. aeruginosa*-Isolaten ist jedoch nicht von einzelnen Genen abhängig, sondern wird als multifaktoriell und kombinatorisch beschrieben (Lee et al., 2006). So

wurden beispielsweise beiden Pathogenitätsinseln PAPI-1 (Pseudomonas aeruginosa pathogenicity island-1) und PAPI-2 (enthält exoU) entscheidende Rollen in der Pathogenität des hochvirulenten Stamms UCBPP-PA14 zugeschrieben, dies konnte jedoch nicht auf einzelne Gene zurückgeführt werden (Harrison et al., 2010). Das Auftreten von PAPI-1 und PAPI-2 in den Stämmen dieser Arbeit differenziert stärker zwischen den phylogenetischen Hauptgruppen als zwischen den CAP- und CF-Stämmen. Die größere Konservierung der Inseln in Gruppe 2 bestätigt den eingeschränkten Gentransfer zwischen den Gruppen. Allerdings können auch die phylogenetische Gruppe und die Herkunft des Stammes nicht direkt mit der Virulenz in Zusammenhang gebracht werden. In einer Studie von Hilker et al. wurde in unterschiedlichen Infektionsmodellen ein starker interklonaler Gradient der Virulenz festgestellt. Es wurden sowohl in klinischen als auch in Isolaten aus der Umwelt komplett avirulente, aber auch hochvirulente Stämme gefunden. Dies legt nahe, dass es durch Stammes das kombinatorische Virulenzgen-Repertoire jedes einen lebensraumunabhängigen Virulenz-Gradienten gibt (Hilker et al., 2015). Die erhöhte Virulenz exoU-positiver Stämme ist also nicht auf das Vorkommen bestimmter Gene oder genomischer Inseln zurückzuführen, sondern ergibt sich aus Kombinationen vieler Virulenzgene, deren Gentransfer innerhalb einer phylogenetischen Gruppe verstärkt sein kann, sowie deren Expression (Howell et al., 2013; Lee et al., 2006). Zur Vertiefung des Verständnisses der Genom-basierenden Virulenz können die Daten dieser Arbeit durch phänotypische Virulenzuntersuchungen, wie in vitro-Biofilm-Assays oder in vivo im Maus- oder Galleria mellonella-Infektionsmodell, erweitert werden.

Es bestätigt sich auch hier erneut, dass sich die CAP- und CF-Stämme nicht aufgrund der Herkunft der Stämme aus unterschiedlichen ökologischen Nischen unterscheiden, sondern dass die Anpassungsmechanismen der CF-Stämme in der CF-Lunge die treibende Kraft für Unterschiede auf Genomebene sind. Ein Anpassungsmechanismus ist die Abschwächung der Virulenz durch Verlust der Beweglichkeit mittels Flagellen. Dies ermöglicht dem Bakterium einen besseren Schutz vor dem menschlichen Immunsystem, weil der humane TLR5 (*Toll-like receptor* 5) *P. aeruginosa*-Isolate anhand des Flagellin-Proteins erkennen kann und an der proinflammatorischen Reaktion beteiligt ist (Hauser et al., 2011; Zhang et al., 2005). Die CF-Stämme dieser Arbeit zeigen ein geringfügig selteneres Vorkommen des Flagellin-Glykosylierungs-Genclusters, das sich auf einer *Replacement Island* befindet (RGP-17, Abbildung 17). Dieser Effekt könnte eine Auswirkung der Anpassungsmechanismen an die Lunge von CF-Patienten sein, indem die Bakterien durch die Immunevasion einen Selektionsvorteil ausnutzen um in der Lunge zu persistieren.

Die in *UCBPP-PA14* enthaltene CRISPR-Cas Insel vom Typ I-f (RGP-11) wurde vermehrt in Stämmen der Guppe 1 entdeckt, zwischen CAP und CF-Stämmen gab es eine sehr ähnliche Verteilung. Das CRISPR-System gilt als das adaptive Immunsystem von Prokaryoten, das die Größe des *Accessory*-Genoms mitbeeinflusst. Bei Stämmen ohne CRISPR-Systeme wird aufgrund der verringerten Selektion der aufgenommenen Genelemente ein größeres *Accessory*-Genom erwartet (Belkum et al., 2015; Subedi et al., 2019).

Bei einem Vergleich der genomischen Inseln unter CAP und CF-Stämmen lässt sich zusammenfassen, dass die analysierten RGP-Abschnitte unter CF-Stämmen durchschnittlich etwas häufiger als in den CAP-Stämmen vorkommen (in 2,3 % mehr CF-Stämmen). Eine begründete Aussage, die auf einem höheren Selektionsdruck, bzw. einem verstärkten horizontalen Gentransfer der CAP- oder CF-Stämme beruht, kann angesichts dieser sehr ähnlichen Daten jedoch nicht getroffen werden.

Größere Unterschiede waren jedoch zwischen den phylogenetischen Gruppen zu beobachten. Weil der Referenzstamm UCBPP-PA14 zur Gruppe 2 gehört, sind die Daten entsprechend zum höheren Vorkommen der genomischen Inseln in Gruppe 2 beeinflusst. Die absolute Konservierung von exoU (RGP-18-1) in Isolaten der Gruppe 2 ist bei den anderen Regionen der RGP-18, die eine größere Variabilität zwischen und innerhalb der Regionen zeigen, jedoch nicht mehr vorhanden. Die RGP-22-2, die das Pyocin S5-Gen enthält, ist in jedem vierten Gruppe 1-Isolat, jedoch nie in einem Gruppe 2-Isolat gefunden worden. Pyocine sind Bakteriocine, die gegen nahverwandte P. aeruginosa-Stämme gerichtet sind, um dem jeweiligen Stamm einen Vorteil zu verschaffen, die in der Regel resistent gegen ihr eigenes Pyocin sind (Elfarash et al., 2014). Obwohl mehrere unterschiedliche Typen von Pyocinen (R-, F- und S-Typ) in jedem Bakterium vorkommen, könnte das erhöhte Vorkommen von Pyocin S5 in Gruppe 1-Stämmen eine erhöhte Konkurrenz in der ökologischen Nische der Gruppe 1-Stämme bedeuten (Michel-Briand und Baysse, 2002). Der therapeutische Einsatz von Pyocinen zeigte in pulmonalen Infektionsmodellen eine hochspezifische und effiziente Reduzierung der P. aeruginosa-Bakterienlast. Der Schutz der letalen Infektion wurde verglichen mit Tobramycin in etwa einer 100-fach geringeren Konzentration geboten und die Pyocine zeigten eine verbesserte Wirksamkeit bei langsam wachsenden small colony variants und in Biofilmen. Des Weiteren führt der therapeutische Einsatz zur geringeren Resistenzentwicklung und eine Dysbiose wird verhindert (Brown et al., 2012; McCaughey et al., 2016). Der Einsatz von Pyocinen könnte in Zukunft insbesondere bei chronischen Infektionen, wie CF, eine Erweiterung oder Alternative der Antibiotikatherapie werden.

5.7 Komparative Genomanalyse

Die CAP- und CF-Stämme zeigen vergleichbare offene Pangenome

Abbildung 11 veranschaulicht, dass das Pangenom bei zunehmender analysierter Stammanzahl stetig anwächst. Es handelt sich bei *P. aeruginosa* also um ein Bakterium mit einem offenen Pangenom. Dies ist typisch für ubiquitäre Bakterien, die verschiedenste Habitate besiedeln und für unterschiedliche Erkrankungen verantwortlich sein können. Erhöht sich die Anzahl der Stämme, wird die genetische Variabilität erhöht und durch horizontalen Gentransfer erworbene Gene erweitern das Pangenom. Im Gegensatz dazu stehen Bakterien mit einem geschlossenen Pangenom, deren *Core*und Pangenom bei zunehmender Anzahl analysierter Stämme konstant bleibt. Diese Bakterien sind häufig an ein spezielles Habitat angepasst, wie beispielsweise das obligat symbiotisch lebende Bakterium *Buchnera aphidicola*, das ebenfalls zur Klasse der *Gammaproteobacteria* gehört und nur in Symbiose mit der Erbsenlaus (*Acyrthosiphon pisum*) überleben kann (Wilson et al., 2010).

Das Core-Genom hingegen nähert sich nach Analyse von CAP- und CF-Stämmen ca. 4000 Genen an, was bei durchschnittlich 6253 Genen etwa 64 % der Genomgröße entspricht. Bei der Pangenom-Analyse wurde mittels EDGAR (Blom et al., 2019) ein geringeres Accessory-Genom (Chi², p = 0,0006) und mehr Singletons (Chi², p = 0,0033) für die 39 CF-Stämme, verglichen mit den 53 CAP-Stämmen, berechnet. Jedoch beeinflusst der Stamm PACF 281 aus der phylogenetischen Gruppe 3 die Berechnungen der Pangenom-Analyse. Der phylogenetisch weit entfernte Stamm lässt sich in Abbildung 11 anhand der Stufe in der Core-Genom-Kurve erkennen (an 67. Stelle). Die ANI- (average nucleotide identity) Matrix im Anhang (Datei E-3) verdeutlicht zusätzlich die phylogenetische Entfernung. Die ANI von PACF 281 beträgt durchschnittlich 92,57 % zu Stämmen der Gruppe 1 und 92,60 % zu Stämmen der Gruppe 2. Weil PACF 281 viele exklusive Gene besitzt, wurde mittels EDGAR (Blom et al., 2019) eine weitere Pangenom-Analyse ohne PACF_281 vorgenommen. Das berechnete Core-Genom war mit 4594 Genen um 311 Gene größer als mit PACF_281. Das Accessory-Genom wurde um 407 und die Anzahl der Singletons wurde um 357 Gene geringer. Die Gene, die ohne PACF 281 zum Core-Genom gehören, aber nicht in PACF_281 vorhanden sind, werden mit Analyse von PACF_281 dem Accessory-Genom zugeordnet. Die Singletons von PACF 281 erhöhen entsprechend die Singleton-Anzahl. Ohne Analyse des Stammes PACF 281 ist also das Core-Genom der CF-Stämme (n= 38 und PAO1) mit 4594 Genen noch um 104 Gene größer als das der CAP-Stämme (n= 53 und PAO1) mit 4490 Genen. Auch bei einem Vergleich der Mittelwerte der Singletons der Stämme im Gesamtprojekt (Abbildung 12-C) zeigen sich keine bedeutende Unterschiede (CAP: n= 51,7, CF: n= 64,3, t-Test, p = 0,2613). Jedoch

weisen sie, in Anbetracht der analysierten Genomanzahl, eine geringe Tendenz in Richtung einer höheren Variabilität (kleineres *Core*-Genom, mehr *Singletons*) der CF-Stämme auf.

Die funktionale Einteilung des Core- und Accessory-Genoms auf die COG-Kategorien ist zwischen den CAP- und CF-Stämmen übereinstimmend

Die funktionale Analyse wurde von der BPGA-*Pipeline* (Chaudhari et al., 2016) durchgeführt, indem die Gensets (*Core-* und *Accessory-*Gene sowie die *Singletons*) mit BLASTp mit der COG-Datenbank verglichen wurden. Die BPGA-*Pipeline* wurde in dieser Arbeit für die Aufteilung der *Core-* und *Accessory-*Gene sowie der *Singletons* auf die COG-Kategorien genutzt. Für diese Analyse müssen vorerst alle orthologen Gene identifiziert werden. Obwohl die Identifizierung orthologer Gene bei EDGAR durch "Bidirectional Best BLAST Hits" und bei BPGA durch ein Clustering auf 50 % Sequenzidentität stattfindet, sind die Größen der Gensets vergleichbar groß. Das berechnete *Core-*Genom liegt mit 3960 Genen (EDGAR, mit *PAO1*) und 3982 Genen (BPGA) sehr nah zusammen. Bei EDGAR wurden jedoch ca. 30 % mehr *Accessory-*Gene und die doppelte Anzahl *Singletons* gefunden. Dies deutet darauf hin, dass durch das Clustering von BPGA mehr Gene als ortholog markiert werden, die durch die paarweise orthologe Zuordnung von EDGAR als unterschiedliche Genfamilien identifiziert werden.

Die meisten Gene (22 – 25 %) der jeweiligen Gensets haben unbekannte Funktionen (COG-Klassifikation: [S]) oder die generelle Funktion kann nur vorhergesagt werden [R]. Im *Core*-Genom zeigt sich eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen CAP- und CF-Stämmen. Die häufigste Zuordnung des hochkonservierten *Core*-Genoms zu dem Transport und Metabolismus von Aminosäuren [E] sowie der Transkription [K] zeigt sowohl bei den CAP- als auch bei den CF-Stämmen Übereinstimmungen mit der Literatur (Ozer et al., 2014; Valot et al., 2015).

Die größten Unterschiede sind allerdings bei den *Singletons* zu erkennen. Die differenzielle Einteilung der *Singletons* auf die COG-Kategorien zwischen CAP- und CF-Stämmen lässt Vermutungen über die Vielseitigkeit der Stoffwechselwege zu.

Der kleinere Anteil von Replikations-, Rekombinations- und Reparaturgenen [L] unter den CF-*Singletons* könnte ursächlich für eine geringe Replikations- bzw. Reparaturgenauigkeit der DNA sein, die eine höhere Anzahl Mutationen zur Folge hätte. Obwohl in Genen, wie *mucA* und *oprD*, vermehrt SNPs in CF-Stämmen entdeckt wurden, konnten keine Unterschiede in der durchschnittlichen, von ASA³P (Oliver Schwengers et al., 2019) bestimmten, Gesamt-SNP-Anzahl zwischen CAP-(n= 33.169 SNPs) und CF-Stämmen (n= 34.530 SNPs) festgestellt werden (Differenz: < 5%, MWUT, p = 0,9283). Damit bestätigt sich die Hypothese der geringeren Reparaturgenauigkeit nicht. Die statistische SNP-Analyse zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen der phylogenetischen Gruppe und SNP-Anzahl. Weil *PAO1* der phylogenetischen Gruppe 1 (Mittelwert: n= 25.875 SNPs) zugeordnet ist, ist die SNP-Anzahl in Gruppe 2 (Mittelwert: n= 50.909 SNPs) entsprechend höher. Innerhalb der Gruppen zeigen CAP- und CF-Stämme ebenfalls keine Unterschiede in Bezug auf die SNP-Anzahl (4.3), somit ist bestätigt, dass keine grundlegenden genetischen Differenzen vorliegen.

Die größere Anzahl von *Singletons* bei der Biosynthese, dem Transport und dem Katabolismus von Sekundärmetaboliten [Q] unter den CAP-Stämmen könnte durch eine verringerte Produktion einer der wichtigsten Sekundärmetabolite, der eisenbindenden Siderophore, Pyoverdin und Pyochelin, erklärt werden. Die verringerte Produktion der Siderophore aufgrund der erhöhten Verfügbarkeit dieser Stoffe in CF-Lungen ist mit der Literatur vereinbar (Nguyen et al., 2014).

Durch eine größere Anzahl *Singletons* kann jedoch nicht auf eine verstärkte Expression von Stoffwechselwegen geschlossen werden. Für die Bestätigung dieser Vermutungen benötigt es weiterer Transkriptomanalysen, um putative Korrelationen zwischen der *Singleton*-Anzahl und der Expression von Genen der COG-Kategorien herzustellen. Des Weiteren wurde bei den genomischen Inseln gezeigt, dass es zwischen den CAP- und CF-Stämmen eine deutlich geringere genetische Vielfalt als zwischen den Stämmen unterschiedlicher phylogenetischen Gruppen gibt.

5.8 Plasmide

Extrachromosomale Plasmide sind selten bei P. aeruginosa zu finden

Die annotierten Genomsequenzen wurden in dieser Arbeit mittels ABRicate (https://github.com/tseemann/abricate) und die assemblierten *Contigs* mittels Platon (Schwengers et al., 2019, zum gegenwärtigen Zeitpunkt unpubliziert, entwickelt von Oliver Schwengers aus der Professur für Bioinformatik und Systembiologie, Leiter: Prof. Dr. Alexander Goesmann) mit der NCBI-Plasmid-Datenbank verglichen (BLASTn). In beiden Analysen konnten nur Bestandteile von Plasmiden in den CAP- und CF-Stämmen nachgewiesen werden. Keines der *Tools* konnte jedoch sicher Plasmide identifizieren. Das von Platon identifizierte putative Plasmid-*Contig* "NODE_13_length_159568 _cov_26.1423" aus *PACF_94* (4.4.4) zeigt jedoch genomische Bestandteile. In etwa einem Drittel der Länge des *Contigs* ist die RGP-5 (Tabelle 15) zum *P. aeruginosa*-Referenzstamm *UCBPP-PA14* konserviert. Der Nachweis von Bestandteilen des Plasmids *pKLC102* ist damit zu erklären, dass die ICE (*integrative and conjugative*)

element) als Plasmid publiziert ist, jedoch durch Insertion in das Genom aufgenommen wurde (1.5.4.1), und häufig u. a. als Pathogenitätsinsel PAPI-1 oder PAPI-2 konserviert ist. Aufgrund der innerhalb der genomischen Inseln sehr variablen Genregionen ist eine Plasmid-Vorhersage auf diese Weise, nur mit kurzen *Reads*, kaum möglich und bedarf einer zusätzlichen Sequenzierung mit langen *Reads* mittels "Nanopore sequencing" (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Vereinigtes Königreich) oder "*Single-molecule real-time sequencing*" (Pacific Bioscience, Menlo Park, USA). Diese Methoden der DNA-Sequenzierung werden als Sequenzierung der dritten Generation (*"third-generation sequencing*") bezeichnet.

Die Identifizierung von kompletten Plasmiden aus NGS-Daten stellt insbesondere bei variablen Genomen hohe Anforderungen an die Bioinformatik. Es sind verschiedene bioinformatische *Tools* vorhanden, die durch unterschiedliche Herangehensweisen Plasmide identifizieren und komplett darstellen sollen, die gängigsten *Tools* sind "PlasmidSPAdes", "Recycler", "cBar" und "PlasmidFinder". "PlasmidSPAdes" identifiziert *Contigs*, deren *Coverage* von der durchschnittlichen, durch SPAdes bestimmten, chromosomalen *Coverage* abweichen. In dieser Arbeit griff das Tool Platon auf die in der ASA³P-*Pipeline* mittels SPAdes assemblierten *Contigs* zurück. Vergleichende Studien zeigten, dass die Ergebnisse der *Tools* sowohl inter- als auch intrataxonomisch variieren. Das Erkennen von kleinen Plasmiden hat jedoch eine höhere Erfolgsrate als von großen Plasmiden (> 50.000 bp) mit langen repetitiven Bereichen. In der Studie von Laczny et al. wurden alle 95 Stämme des Genus *Pseudomonas* in der Referenzmethode als plasmidfrei gekennzeichnet (Arredondo-Alonso et al., 2017; Laczny et al., 2017). Deshalb sollten in Zukunft durch Ansätze der Sequenzierung der dritten Generation genauere Methoden zur Identifizierung von Plasmiden entwickelt werden.

Die Seltenheit von Plasmiden bei *P. aeruginosa* wird bei einem Vergleich der Anzahlen der geschlossenen publizierten Plasmide des "*Plasmid Annotation Reports*" verschiedener Bakterienspezies von NCBI verdeutlicht, nach denen auch die "Pseuplas"-Datenbank erstellt wurde. *P. aeruginosa* besitzt mit 37 veröffentlichten Plasmiden (Zeitpunkt: 01.10.2018, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/plasmids/187) eine deutlich kleinere Datenbank, verglichen mit z. B. *Escherichia coli* (ca. 1800 Plasmide), *Klebsiella pneumoniae* (ca. 1300 Plasmide) und *Acinetobacter baumanii* (ca. 360 Plasmide). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Auftreten extrachromosomaler Plasmide bei *P. aeruginosa* äußerst selten ist.

5.9 Bakteriophagen

Die von CAP-Patienten isolierten Stämme enthalten mehr filamentöse Bakteriophagen Es wurde eine Vielzahl von Bakteriophagen mittels des Phagen-Identifizierungs-Tools PHASTER (Arndt et al., 2016) in den Pseudomonas-Stämmen gefunden. Insbesondere die filamentösen (Pf) Phagen stehen im Fokus aktueller Forschung. Sie werden u. a. mit schweren CF-Verläufen sowie erhöhter Antibiotikaresistenz und Biofilmproduktion in Verbindung gebracht (Burgener et al., 2019). Insbesondere in chronischen Infektionen wie CF wird das Auftreten von Pf-Phagen mit einer verstärkten Mukus-Adhäsion und einer gehemmten Lungenepithelzell-Invasion beobachtet, was die Infektionsausbreitung verhindert. Durch eine verringerte Makrophagen-Phagozytose wird die Entzündungsreaktion verringert und die Etablierung einer chronischen Infektion gefördert (Secor et al., 2017).

Das Mantelprotein CoaB ist wichtig für die weitere Phagenproduktion sowie für die Bildung von Flüssigkristallformationen, welche Faktoren, wie Biofilmbildung, verstärken (Burgener et al., 2019). Aufgrund dessen wurden nur Stämme, in denen *coaB* gefunden wurde, als Pf-positiv markiert. In dieser Arbeit sind in knapp der Hälfte der CAP- und in etwa einem Drittel der CF-Stämme Pf-Phagen gefunden worden. Dies stimmt mit der Studie von Burgener et al. überein, die in den CF-Kohorten ebenfalls weniger Pf-Phagen fanden als in der *Pseudomonas*-Genom-Datenbank (Burgener et al., 2019). Es zeigte sich allerdings kein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Pf-Phagen und erhöhter Antibiotikaresistenz.

Anders als die temperenten Phagen führt die Expression des Genoms der virulenten Phagen zu einer Lyse der bakteriellen Zelle. Der Einsatz dieser lytischen Phagen kann bei Infektionen mit antibiotikaresistenten Stämmen eine Therapiealternative bzw. eine Therapieerweiterung zu den Antibiotika sein. Es wurden bereits erfolgreich Phagen in der Therapie eingesetzt, wie bei einer CF-Patientin, die eine Pneumonie durch einen MDR P. aeruginosa-Stamm erlitt und bei der die Therapie durch zusätzliche Komorbiditäten erschwert wurde. Die Kombination unterschiedlicher Phagen und Antibiotika führte innerhalb 100 Tage weder zu einem Wiederauftreten der Pseudomonas-Pneumonie noch zu einer Verschlechterung der CF. Der Einsatz unterschiedlicher intravenös-verabreichter Phagen ist aufgrund der möglichen genetischen und phänotypischen Heterogenität der P. aeruginosa-Population in der CF-Lunge nötig (Law et al., 2019). Doch trotz dieser erfolgreichen Therapiemaßnahmen werden nach der EMA (Europäische Arzneimittel-Agentur) zur Zulassung in Westeuropa weitere präklinische und klinische Studien zur Sicherstellung der Wirksamkeit und Sicherheit benötigt, das Verfahren soll aufgrund des Potentials jedoch beschleunigt werden (Wienhold et al., 2019). Doch insbesondere bei Infektionen mit multiresistenten Erregern, die in Biofilmen meist unerreichbar für Antibiotika sind (Abedon, 2015), kann die Phagentherapie eine Möglichkeit bzw. eine Ergänzung zum Ausweg aus der antibiotischen Krise sein.

5.10 Ausblick

Das Thema der vermehrten Entwicklung von antibiotikaresistenten Bakterien gewinnt heutzutage stetig an öffentlicher Aufmerksamkeit. Insbesondere in Krankenhäusern werden multi- bis panresistente Bakterien immer problematischer. Zur Problemlösung ist ein Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Fachbereiche nötig. Die mangelnde Entwicklung neuer Antibiotika oder alternativen Behandlungsmethoden, das Krankenhaus- und Abwassermanagement sowie die Kontrolle des Antibiotikaeinsatzes bei Menschen und Tieren sind nur ein Teil des Gesamtproblems.

Die Entwicklung neuer Technologien in der Genomsequenzierung und Bioinformatik bietet der Wissenschaft neue Erkenntnisse, die von großem medizinischen Nutzen sein können. Die in dieser Arbeit genutzte NGS- (Next-generation-sequencing-) Technologie bietet, insbesondere bei der Komplett-Genom-Sequenzierung, einen hohen Standard zur Identifizierung von Hochrisikoklonen und Antibiotikaresistenzgenen. Bei isolierten Erregern könnte in der Klinik, durch eine zügige Sequenzierung und Genomanalyse, Verbesserungen des Patientenmanagements möglich sein. Allerdinas sind hochkomplex-regulierte Mechanismen, wie z. B. die Effluxpumpen-Regulation bei P. aeruginosa, noch nicht endgültig verstanden. In Zukunft könnten in der Bioinformatik auch die komplexesten Regulationsmechanismen mithilfe des maschinellen Lernens zu analysieren sein. In Kliniken können neue, alternative Behandlungsmethoden, wie beispielsweise Phagenoder Bakteriocin-Therapien, in Kombination mit computerbasierenden "bedside"-Resistenzvorhersagen eine Möglichkeit sein, die antibiotische Krise zu überwinden.

6 Zusammenfassung

Pseudomonas aeruginosa ist ein vielseitiges opportunistisches Bakterium, das eine Vielzahl unterschiedlicher Infektionen auslösen kann. Als Erreger chronischer Lungeninfektionen bei Mukoviszidose (CF) wird *P. aeruginosa* häufig identifiziert, es kann chronisch in der CF-Lunge persistieren, dem Immunsystem entgehen und eine Eradikation nahezu unmöglich machen. Als Auslöser der ambulant erworbenen Lungenentzündung (CAP) wird *P. aeruginosa* weniger häufig identifiziert, die Infektion wird jedoch mit einer erhöhten Mortalität und häufigeren schweren Verläufen in Verbindung gebracht.

Bei der phänotypischen Analyse wurden große Unterschiede zwischen CAP- und CF-Stämmen festgestellt. Die CF-Stämme bilden häufiger kleine Koloniegrößen und weisen deutlich mehr Antibiotikaresistenzen auf, die mit einem erhöhten Antibiotikaeinsatz bei Mukoviszidose-Patienten zu erklären sind.

komparative Genomanalyse zeigt anhand der Zuordnungen Die den zu phylogenetischen Gruppen (Gruppe 1: exoS-positiv, Gruppe 2: exoU-positiv) große Übereinstimmungen der epidemischen Populationsstrukturen von CAP- und CF-Stämmen. Es konnte in keiner der phylogenetischen Gruppen ein erhöhtes Vorkommen von CAP- oder CF-Stämmen nachgewiesen werden. Durch Analysen der SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismen) konnten keine grundsätzlichen genetische Unterschiede zwischen CAPund CF-Stämmen. sondern zwischen den phylogenetischen Gruppen festgestellt werden. Dies bestätigte sich auch in der Analyse der Serotypen. Auch das Vorkommen einiger genomischer Inseln wurde deutlich mit der Zuordnung zur phylogenetischen Gruppe in Zusammenhang gebracht. Es lässt sich zusammenfassen, dass genetische Unterschiede zwischen den Stämmen abhängig von der phylogenetischen Gruppe sind und keine der verglichenen Erkrankungen durch Stämme einer Gruppe bevorzugt werden.

Unter CAP- und CF-Stämmen wurden Stämme mit resistenzgentragenden, durch horizontalen Gentransfer erworbenen DNA-Fragmenten (genomische Insel und Integron), identifiziert. Unter diesen Stämmen befinden sich auch zwei CAP-Stämme, die in der Literatur als Hochrisikoklone (ST-111) beschrieben werden.

In CF-Stämmen konnten häufiger Mutationen in Phänotyp- und Antibiotikaresistenzassoziierten Genen gefunden werden. Dies ist mit einem erhöhten Selektionsdruck während der chronischen Persistenz in der CF-Lunge zu erklären. Ein weiterer Fokus dieser Arbeit ist die potenzielle Vorhersage phänotypischer Antibiotikaresistenzen durch die Genomsequenzen. Es lässt sich schlussfolgern, dass Gene, die durch horizontalen Gentransfer erworben wurden und für Antibiotika-inaktivierende Enzyme (z. B. AMEs) kodieren, die beste Voraussagbarkeit zeigen. Mutationen in Genen, die zu veränderten Antibiotika-Zielstrukturen (z. B. *gyrA*) und zu einer veränderten Permeabilität führen (z. B. *oprD*), zeigen ebenfalls eine nachvollziehbare Genotyp-Phänotyp-Beziehung. Allerdings können, insbesondere durch einen langanhaltenden Selektionsdruck, unterschiedlichste Mechanismen zur Resistenzentwicklung beitragen, die die Voraussagegenauigkeit durch Genmutationen beeinträchtigen.

Es lässt sich also zusammenfassen, dass *P. aeruginosa*-Stämme der phylogenetischen Gruppen 1 und 2 sowie akute als auch chronische Infektionserkrankungen auslösen können. Die genetischen und phänotypischen Differenzen der CF-Stämme sind somit die Folge der chronischen Persistenz unter hohem antibiotischen Selektionsdruck.

7 Conclusion

Pseudomonas aeruginosa is a versatile opportunistic bacterium that can cause a variety of different infections. *P. aeruginosa* is frequently identified as the pathogen of chronic lung infections in cystic fibrosis (CF). It can persist chronically in the CF lung, can evade immune responses and make eradication almost impossible. *P. aeruginosa* is less frequently identified as the cause of community acquired pneumonia (CAP), but the infection is associated with increased mortality and more frequent severe courses.

Phenotypic analysis revealed large differences between CAP and CF strains. The CF strains more frequently form small colony sizes and show significantly more antibiotic resistance, which can be explained by an increased use of antibiotics in cystic fibrosis patients.

The comparative genomic analysis shows large similarities between the epidemic population structures of CAP and CF strains on the basis of the allocations to the phylogenetic groups (group 1: *exoS*-positive, group 2: *exoU*-positive). No increased incidence of CAP or CF strains could be detected in any of the phylogenetic groups. Analyses of SNPs (single nucleotide polymorphisms) revealed no fundamental genetic differences between CAP and CF strains, but between the phylogenetic groups. This was also confirmed in the analysis of serotypes. The presence of some genomic islands was also clearly associated with the assignment to the phylogenetic group. It can be summarized that genetic differences between strains depend on the phylogenetic group and that none of the compared diseases are preferred by strains of a group.

Among CAP and CF strains, strains with resistance-bearing DNA fragments acquired by horizontal gene transfer (genomic island and integron) were identified. Among these strains two CAP strains are also described in the literature as high-risk clones (ST-111). In CF strains mutations in phenotype and antibiotic resistance associated genes could be found more frequently. This can be explained by an increased selection pressure during chronic persistence in the CF lung. Another focus of this work is the potential prediction of phenotypic antibiotic resistance by genome sequences. It can be concluded that genes acquired by horizontal gene transfer and coding for antibiotic-inactivating enzymes (e.g. AMEs) show the best predictability. Mutations in genes leading to altered antibiotic target structures (e.g. *gyrA*) and to altered permeability (e.g. *oprD*) also show a traceable genotype-phenotype relationship. However, especially due to prolonged selection pressure, various mechanisms can contribute to the development of resistance that impair the predictive accuracy of gene mutations.

It can therefore be summarized that *P. aeruginosa* strains of phylogenetic groups 1 and 2 can trigger acute as well as chronic infectious diseases. The genetic and phenotypic differences of the CF strains are thus the result of chronic persistence under high antibiotic selection pressure.

8 Abkürzungsverzeichnis

Alle in dieser Arbeit genutzten Abkürzungen sind in der folgenden Liste ausgeschrieben. Fach-spezifische Abkürzungen werden beim ersten Vorkommen im Text erläutert, Abkürzungen aus dem allgemeinen Sprachgebrauch werden hingegen nicht im Text erläutert.

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ-	mikro
A. baumannii	Acinetobacter baumannii
AAC	Aminoglykosid-N-Acetyltransferasen
ABC	ATP-binding-cassette
ADPRT	ADP Ribosyltransferase
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AME	Aminoglykosid-modifizierendes Enzym
ANT	Aminoglykosid-O-Nucleotidyltransferasen
APH	Aminoglykosid-O-Phosphotransferasen
AST	Antimicrobial susceptibility testing
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAP	Community acquired pneumonia (ambulant erworbene
	Lungenentzündung)
CDS	Coding sequence (kodierende Sequenz)
CF	Cystic fibrosis (Mukoviszidose)
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
Chi²	Chi-Quadrat-Test
COG	Clusters of Orthologous Groups
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease (chronisch obstructive
	Lungenerkrankung)
CPA	Common polysaccharide antigen
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
d. h.	das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
	(Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle
	von Krankheiten)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF2	Elongationsfaktor 2
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittel
	Agentur)
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen

et al.	und andere
E-Test	Epsilometertest
ETF	Exakter Test nach Fisher
evtl.	eventuell
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GC	Guanin und Cytosin
GUI	Graphical user interface
HAP	Hospital acquired pneumonia (nosokomial erworbene
	Pneumonie)
HTML	Hypertext Markup Language
ICE	Integrative and conjugative element
IPCD	International Pseudomonas Consortium Database
IS-Element	Insertionssequenz-Element
.][[]	Justus-Liebig-Universität Gießen
k-	kilo
	Liter
IR	Lysogeny broth
	Lipopolysaccharid
LF J M	Maga
	mega
	Matrix appiated Lagar Departmention/lagization Time of
MALDI-TOP	
	Flight
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MB	Binding buffer
MBL	Metallo-p-Laktamasen
MDR	Multidrug-resistant
MFP	Membrane fusion protein
MFS	Major facilitator superfamily
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
mind.	mindestens
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i> (Multilokus-Sequenztypisierung)
-mol	Mol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MWUT	Mann-Whitney-U-Test
n-	nano
n=	Anzahl
NGS	Next-generation-sequencing
OD	Optical density (optische Dichte)
OMF	Outer membrane factor
ORF	Open reading frame (offener Leserahmen)
OSA	O-specific antigen
р-	pico
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PAGI	Pseudomonas aeruginosa genomic island
PAPI	Pseudomonas aeruginosa pathogenicity island
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PDC	Pseudomonas-derived cephalosporinase
PDR	Pandrug-resistant
PEG	Perkutane endoskopische Gastrostomie
Pf	Filamentous bacteriophages (filamentöse Phage)
QS	Quorum sensing
RGP	Regions of genomic plasticity
RNA	Ribonukleinsäure
RND	Resistance-nodulation-cell division
RPM	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomale-Ribonukleinsäure
SCV	Small colony variant
SDS	Sodium lauryl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SMR	Small multidrug resistance
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-
	Polymorphismus)
ST	Sequence Type (Sequenztyp)
T1	Lysis Puffer
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TE-Puffer	Puffer aus TRIS und EDTA
TLR5	Toll-like Rezeptor 5
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TSB	Tryptic soy broth
u. a.	unter anderem
WB	Wash buffer
WHO	World Health Organization(Weltgesundheitsorganisation)
XDR	Extensively drug-resistant
z. B.	zum Beispiel
λ	Lambda

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer phylogenetischer Baum	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Antibiotikaresistenzmechanismen	12
Abbildung 3: Vergleich resistenter P. aeruginosa-Isolate	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Effluxpumpen-Regulation	19
Abbildung 5: Beispiele für die Ausprägungen der morphologischen Kategorien	48
Abbildung 6: Phänotypische Einteilung der Stämme	49
Abbildung 7: Gesamter phylogenetischer Baum	61
Abbildung 8: Komprimierter phylogenetischer Baum mit CAP-Stämmen	62
Abbildung 9: Komprimierter phylogenetischer Baum mit CF-Stämmen	63
Abbildung 10: Phylogenetischer Baum mit Serotypenverteilung	64
Abbildung 11: Core-/Pangenom-development-plot.	65
Abbildung 12: Prozentuale Pangenom-Aufteilung	66
Abbildung 13: Core-, Accessory-Genom und Singletons der Stämme	67
Abbildung 14: COG-Klassifizierung der CAP-Stämme	68
Abbildung 15: Differenzmengen CAP/CF COG-Klassifizierung	69
Abbildung 16: Zirkuläre Genomdarstellung gegen Referenz UCBPP-PA14	70
Abbildung 17: Vorkommen der genomischen Inseln in CAP- und CF-Stämmen	72
Abbildung 18: Vorkommen der genomischen Inseln in phylogenetischen Gruppen	73
Abbildung 19: Presence/Absence-Matrix der Virulenzgene	78
Abbildung 20: Presence/Absence-Matrix der Antibiotikaresistenzgene (CAP)	80
Abbildung 21: Presence/Absence-Matrix der Antibiotikaresistenzgene (CF)	81
Abbildung 22: Darstellung des Resistenz-Gen trangenden Integrons	86
Abbildung 23: Vergleich der oprD-Varianten	88
Abbildung 24: Presence/Absence-Matrix Effluxpumpen-assoziierter Gene	93
Abbildung 25: Vergleich der resistenten CAP- und CF-Stämme	83

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Effluxpumpen-Operons mit transportierten Antibiotika	18
Tabelle 2: Verwendete Geräte	27
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 4: Verwendetes Flüssigmedium	29
Tabelle 5: Verwendete feste N\u00e4hrmedien (Agarplatten)	30
Tabelle 6: Verwendete Kits	30
Tabelle 7: Liste der genutzten Referenzstämme	29
Tabelle 8: Antibiotikakonzentrationsbereiche der phänotypischen Testsyteme	33
Tabelle 9: Genutzte Softwareprogramme	37
Tabelle 10: Übersicht aller prozessierten Bakterienisolate	47
Tabelle 11: Phänotypischen Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung (CAP-Stämme)	52
Tabelle 12: Phänotypischen Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung (CF-Stämme)	53
Tabelle 13: Sequenzier- und Genomstrukturdaten der sequenzierten Stämme	55
Tabelle 14: MLST, Serotyp und phylogenetische Gruppen	59
Tabelle 15: Genomische Inseln zum Referenzgenom UCBPP-PA14	71
Tabelle 16: Plasmid-Analyse mittels ABRicate (BLASTn)	74
Tabelle 17: Bakteriophagen-Analyse mittels PHASTER.	76
Tabelle 18: Ausprägung von mucA und phänotypische Oberflächenstruktur	79
Tabelle 19: gyrA- und parE-Varianten und Ciprofloxacin-MHKs	85
Tabelle 20: oprD-Typen und Imipenem-MHKs	87
Tabelle 21: Verteilung der CAP-, CF-Stämme und Referenzen auf Gruppen	101

11 Literaturverzeichnis

- Abedon, S.T., 2015. Ecology of Anti-Biofilm Agents I: Antibiotics versus Bacteriophages. Pharmaceuticals 8, 525–558. https://doi.org/10.3390/ph8030525
- Aldred, K.J., Kerns, R.J., Osheroff, N., 2014. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. Biochemistry 53, 1565–1574. https://doi.org/10.1021/bi5000564
- Ambler, R.P., 1980. The structure of β -lactamases. Philos. Trans. R. Soc. London. B, Biol. Sci. 289, 321–331
- Arai, H., 2011. Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. Front. Microbiol. 2, 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00103
- Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., Wishart, D.S., 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Res. 44, W16–W21. https://doi.org/10.1093/nar/gkw387
- Arredondo-Alonso, S., Willems, R.J., van Schaik, W., Schürch, A.C., 2017. On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. Microb. Genomics 3. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000128
- Balasubramanian, D., Kumari, H., Mathee, K., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR: An acute-chronic switch regulator. Pathog. Dis. 73, 1–14. https://doi.org/10.1111/2049-632X.12208
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin,
 V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A. V, Sirotkin, A. V,
 Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: a new
 genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J.
 Comput. Biol. 19, 455–477. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., Guery, B., 2018. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs Context 7, 1–18. https://doi.org/10.7573/dic.212527
- Belkum, A. Van, Soriaga, L.B., Lafave, M.C., Akella, S., Veyrieras, J., Barbu, E.M.,
 Brami, D., Schicklin, S., Felderman, M., Schwartz, A.S., Richardson, T.H.,
 Peterson, T.C., Hubby, B., 2015. Phylogenetic Distribution of CRISPR-Cas
 Systems in Antibiotic- Resistant *Pseudomonas aeruginosa* 6, 1–13.
 https://doi.org/10.1128/mBio.01796-15.Editor

- Berrazeg, M., Jeannot, K., Ntsogo Enguéné, V.Y., Broutin, I., Loeffert, S., Fournier, D.,
 Plésiat, P., 2015. Mutations in β-Lactamase AmpC Increase Resistance of
 Pseudomonas aeruginosa Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins.
 Antimicrob. Agents Chemother. 59, 6248–6255. https://doi.org/10.1128/aac.00825-15
- Bi, D., Xie, Y., Tai, C., Jiang, X., Zhang, J., Harrison, E.M., Jia, S., Deng, Z., Rajakumar,
 K., Ou, H.Y., 2016. A site-specific Integrative Plasmid Found in *Pseudomonas* aeruginosa Clinical Isolate *HS87* along with A Plasmid Carrying an Aminoglycoside-Resistant Gene. PLoS One 11, 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148367
- Blom, J., Glaeser, S.P., Juhre, T., Kreis, J., Hanel, P.H.G., Schrader, J.G., Kämpfer, P., Goesmann, A., 2019. EDGAR : A Versatile Tool for Phylogenomics. Bergey's Man. Syst. Archaea Bact. (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund S. Dedysh) 1–15. https://doi.org/10.1002/9781118960608.bm00038
- Blondeau, J.M., 2004. Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. Surv. Ophthalmol. 49, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2004.01.005
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30, 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170
- Bosi, E., Fondi, M., Fani, R., Donati, B., Sagot, M.-F., Crescenzi, P., Galardini, M., Brunetti, S., Lió, P., 2015. MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. Bioinformatics 31, 2443–2451. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv171
- Brown, C.L., Smith, K., McCaughey, L., Walker, D., 2012. Colicin-like bacteriocins as novel therapeutic agents for the treatment of chronic biofilm-mediated infection. Biochem. Soc. Trans. 40, 1549–1552. https://doi.org/10.1042/BST20120241
- Bruchmann, S., Dötsch, A., Nouri, B., Chaberny, I.F., Häussler, S., 2013. Quantitative contributions of target alteration and decreased drug accumulation to *Pseudomonas aeruginosa* fluoroquinolone resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 1361–8. https://doi.org/10.1128/AAC.01581-12
- Burgener, E.B., Sweere, J.M., Bach, M.S., Secor, P.R., Haddock, N., Jennings, L.K., Marvig, R.L., Johansen, H.K., Rossi, E., Cao, X., Tian, L., Nedelec, L., Molin, S., Bollyky, P.L., Milla, C.E., 2019. Filamentous bacteriophages are associated with chronic *Pseudomonas* lung infections and antibiotic resistance in cystic fibrosis. Sci. Transl. Med. 11, eaau9748. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau9748
- Cabot, G., Ocampo-Sosa, A.A., Domínguez, M.A., Gago, J.F., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., 2012. Genetic

markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* highrisk clones. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 6349–6357. https://doi.org/10.1128/AAC.01388-12

- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., Hasman, H., 2014. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 3895 LP – 3903. https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14
- Chaudhari, N.M., Gupta, V.K., Dutta, C., 2016. BPGA-an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. Sci. Rep. 6, 1–10. https://doi.org/10.1038/srep24373
- Cillóniz, C., Gabarrús, A., Ferrer, M., Puig de la Bellacasa, J., Rinaudo, M., Mensa, J., Niederman, M.S., Torres, A., 2016a. Community-Acquired Pneumonia Due to Multidrug- and Non–Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Chest Online Suppl. e-Table 1. https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.03.042
- Cillóniz, C., Gabarrús, A., Ferrer, M., Puig de la Bellacasa, J., Rinaudo, M., Mensa, J., Niederman, M.S., Torres, A., 2016b. Community-Acquired Pneumonia Due to Multidrug- and Non–Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 150, 415–425. https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.03.042
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L.L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S.J., Lu, X., Ruden, D.M., 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. Fly (Austin). 6, 80–92. https://doi.org/10.4161/fly.19695
- Ciofu, O., Lee, B., Johannesson, M., Hermansen, N.O., Meyer, P., Høiby, N., 2008. Investigation of the *algT* operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. Microbiology 154, 103–113. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010421-0
- Clark, S.T., Caballero, J.D., Cheang, M., Coburn, B., Wang, P.W., Donaldson, S.L.,
 Zhang, Y., Liu, M., Keshavjee, S., Yau, Y.C.W., Waters, V.J., Tullis, D.E., Guttman,
 D.S., Hwang, D.M., 2015. Phenotypic diversity within a *Pseudomonas aeruginosa*population infecting an adult with cystic fibrosis. Sci. Rep. 5, 1–10.
 https://doi.org/10.1038/srep10932
- Cohen-Cymberknoh, M., Gilead, N., Gartner, S., Rovira, S., Blau, H., Mussaffi, H., Rivlin, J., Gur, M., Shteinberg, M., Bentur, L., Livnat, G., Aviram, M., Picard, E., Tenenbaum, A., Armoni, S., Breuer, O., Shoseyov, D., Kerem, E., 2016. Eradication failure of newly acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates in cystic fibrosis. J. Cyst. Fibros. 15, 776–782. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2016.04.006

- Courvalin, P., 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1447–1451.
- Croft, L., Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Huang, B., Blakeley, R.L., Mattick, J.S., 2000. An interactive web-based *Pseudomonas aeruginosa* genome database: discovery of new genes, pathways and structures. Microbiol 146, 2351–2364.
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., Dowson, C.G., 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. 42, 5644–5649. https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004
- Damron, F.H., Goldberg, J.B., 2013. Proteolytic regulation of alginate overproduction in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol. 84, 595–607. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08049.x.Proteolytic
- Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., Brisse, S., 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS One 5. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010034
- Doi, Y., Arakawa, Y., 2007. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. Clin. Infect. Dis. 45, 88–94. https://doi.org/10.1086/518605
- Domingues, S., da Silva, G.J., Nielsen, K.M., 2012. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. Mob. Genet. Elements 2, 211–223. https://doi.org/10.4161/mge.22967
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26, 2460–2461. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32, 1792–1797. https://doi.org/10.1093/nar/gkh340
- Elfarash, A., Dingemans, J., Ye, L., Hassan, A.A., Craggs, M., Reimmann, C., Thomas, M.S., Cornelis, P., 2014. Pore-forming pyocin S5 utilizes the FptA ferripyochelin receptor to kill *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. (United Kingdom) 160, 261– 269. https://doi.org/10.1099/mic.0.070672-0
- Engel, J., Balachandran, P., 2009. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in
disease.disease.Curr.Opin.Microbiol.https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.007
- Estahbanati, H.K., Kashani, P.P., Ghanaatpisheh, F., 2002. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. Burns 28, 340–348. https://doi.org/10.1016/S0305-4179(02)00024-4

- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2018. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm. https://doi.org/10.2900/296939
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Fosfomycin: Rationale for the clinical breakpoints, version 1.0 http://www.eucast.org/, 2013.
- Ewig, S., Höffken, G., Kern, W. V., Rohde, G., Flick, H., Krause, R., Ott, S., Bauer, T., Dalhoff, K., Gatermann, S., Kolditz, M., Krüger, S., Lorenz, J., Pletz, M., De Roux, A., Schaaf, B., Schaberg, T., Schütte, H., Welte, T., 2016. S3-Leitlinie: Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention Update 2016. Pneumologie 70, 151–200. https://doi.org/10.1055/s-0042-101873
- Faraji, F., Mahzounieh, M., Ebrahimi, A., Fallah, F., Teymournejad, O., Lajevardi, B., 2016. Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with Cystic Fibrosis and burn wounds in Iran. Microb. Pathog. 99, 1–4. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.013
- Faure, K., Shimabukuro, D., Ajayi, T., Allmond, L.R., Sawa, T., Wiener-Kronish, J.P., 2003. O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. 41, 2158–2160. https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2158-2160.2003
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., Hauser, A.R., 2001.
 Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 147, 2659–2669. https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2659
- Fernández, L., Hancock, R.E.W., 2012. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. Clin. Microbiol. Rev. 25, 661–681. https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12
- Fleiszig, S.M.J., Zaidi, T.S., Preston, M.J., Grout, M., Evans, D.J., Pier, G.B., 1996. Relationship between Cytotoxicity and Corneal Epithelial Cell Invasion by Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 64, 2288–2294.
- Freschi, L., Bertelli, C., Jeukens, J., Moore, M.P., Kukavica-Ibrulj, I., Emond-Rheault, J.G., Hamel, J., Fothergill, J.L., Tucker, N.P., McClean, S., Klockgether, J., De Soyza, A., Brinkman, F.S.L., Levesque, R.C., Winstanley, C., 2018a. Genomic characterisation of an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel indicates that the two major groups draw upon distinct mobile gene pools. FEMS Microbiol. Lett. 365, 1–11. https://doi.org/10.1080/02705060.2014.979377
- Freschi, L., Vincent, A.T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J.-G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M.-J., Charette, S.J., Boyle, B., Levesque, R.C., 2018b. The *Pseudomonas*

aeruginosa pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer and pathogenicity.

- Fricks-Lima, J., Hendrickson, C.M., Allgaier, M., Zhuo, H., Wiener-Kronish, J.P., Lynch, S.V., Yang, K., 2015. Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients 25, 713–724. https://doi.org/10.1097/MCA.00000000000178.Endothelial
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T., 2015. Gammaproteobacteria class. nov., in: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. American Cancer Society, p. 1. https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00045
- Girardello, R., Cury, A., Renata Gomes Franco, M., Di Gioia, T., Júnior, J., Araújo, M., Duarte, A., Rossi, F., 2018. Colistin susceptibility testing and Vitek-2[™]: is it really useless? Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 91. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.03.019
- Girlich, D., Naas, T., Nordmann, P., 2004. Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 2043–2048. https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2043-2048.2004
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., Lalucat, J., 2017. Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. Front. Microbiol. 8, 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02422
- Govan, J.R., Deretic, V., 1996. Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol. Rev. 60, 539–74.
- Grant, J.R., Arantes, A.S., Stothard, P., 2012. Comparing thousands of circular genomes using the CGView Comparison Tool. BMC Genomics 13. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-202
- Hall, R.M., Brown, H.J., Brookes, D.E., Stokes, H.W., 1994. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. J. Bacteriol. 176, 6286–6294. https://doi.org/10.1128/jb.176.20.6286-6294.1994
- Harrison, E.M., Carter, M.E.K., Luck, S., Ou, H.Y., He, X., Deng, Z., O'Callaghan, C., Kadioglu, A., Rajakumar, K., 2010. Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain *PA14*. Infect. Immun. 78, 1437–1446. https://doi.org/10.1128/IAI.00621-09
- Hauser, A.R., 2009. The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. Nat Rev Microbiol 7, 654–665. https://doi.org/10.1038/nrmicro2199.The

- Hauser, A.R., Jain, M., Bar-Meir, M., McColley, S.A., 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev. 24, 29–70. https://doi.org/10.1128/CMR.00036-10
- Hilker, R., Munder, A., Klockgether, J., Losada, P.M., Chouvarine, P., Cramer, N., Davenport, C.F., Dethlefsen, S., Fischer, S., Peng, H., Schönfelder, T., Türk, O., Wiehlmann, L., Wölbeling, F., Gulbins, E., Goesmann, A., Tümmler, B., 2015. Interclonal gradient of virulence in the *Pseudomonas aeruginosa* pangenome from disease and environment. Environ. Microbiol. 17, 29–46. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12606
- Hoge, R., Pelzer, A., Rosenau, F., Wilhelm, S., 2010. Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol. 45, 383–395.
- Hornischer, K., Khaledi, A., Pohl, S., Schniederjans, M., Pezoldt, L., Casilag, F., Muthukumarasamy, U., Bruchmann, S., Th, J., Kordes, A., Susanne, H., 2019.
 BACTOME—a reference database to explore the sequence- and gene expressionvariation landscape of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates 47, 716–720. https://doi.org/10.1093/nar/gky895
- Housseini B Issa, K., Phan, G., Broutin, I., 2018. Functional Mechanism of the Efflux Pumps Transcription Regulators From Pseudomonas aeruginosa Based on 3D Structures. Front. Mol. Biosci. 5, 1–20. https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00057
- Howell, H.A., Logan, L.K., Hauser, A.R., 2013. Type III Secretion of ExoU Is Critical during Early *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. MBio 4, 1–9. https://doi.org/10.1128/mBio.00032-13.Invited
- Hurley, M.N., Ariff, A.H.A., Bertenshaw, C., Bhatt, J., Smyth, A.R., 2012. Results of antibiotic susceptibility testing do not influence clinical outcome in children with cystic fibrosis. J. Cyst. Fibros. 11, 288–292. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.02.006
- IHME, 2016. GBD Compare [WWW Document]. Inst. Heal. Metrics Eval. (IHME), Seattle,WA IHME, Univ. Washingt. URL http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare (accessed 24.7.18).
- Jaillard, M., van Belkum, A., Cady, K.C., Creely, D., Shortridge, D., Blanc, B., Barbu, E.M., Dunne, W.M., Zambardi, G., Enright, M., Mugnier, N., Le Priol, C., Schicklin, S., Guigon, G., Veyrieras, J.B., 2017. Correlation between phenotypic antibiotic susceptibility and the resistome in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Antimicrob. Agents 50, 210–218. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.02.026
- Jeukens, Julie, Freschi, L., Kukavica-Ibrulj, I., Emond-Rheault, J.G., Tucker, N.P., Levesque, R.C., 2017. Genomics of antibiotic-resistance prediction in

Pseudomonas aeruginosa. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1–13. https://doi.org/10.1111/nyas.13358

- Jeukens, J., Kukavica-Ibrulj, I., Emond-Rheault, J.G., Freschi, L., Levesque, R.C., 2017. Comparative genomics of a drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* panel and the challenges of antimicrobial resistance prediction from genomes. FEMS Microbiol. Lett. 364, 1–9. https://doi.org/10.1093/femsle/fnx161
- Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., Dave, B.M., Pereira, S., Sharma, A.N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L.E., Frye, J.G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E.L., Pawlowski, A.C., Johnson, T.A., Brinkman, F.S.L., Wright, G.D., McArthur, A.G., 2017. CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. Nucleic Acids Res. 45, D566–D573. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004
- Johnson, C.M., Grossman, A.D., 2016. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work 577–601. https://doi.org/10.1146/annurevgenet-112414-055018.Integrative
- Jolley, K.A., Bray, J.E., Maiden, M.C.J., 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome open Res. 3, 124. https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1
- Juhas, M., Van Der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., Crook, D.W.,
 2009. Genomic islands: Tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution.
 FEMS Microbiol. Rev. 33, 376–393. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x
- Kahlon, R.S., 2016. *Pseudomonas*: Molecular and Applied Biology, Pseudomonas: Molecular and Applied Biology. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-311982
- Khaledi, A., Weimann, A., Schniederjans, M., Asgari, E., Kuo, T.-H., Oliver, A., Cabot, G., Kola, A., Gastmeier, P., Hogardt, M., Jonas, D., Mofrad, M., Bremges, A., McHardy, A.C., Haeussler, S., 2019. Fighting antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* with machine learning-enabled molecular diagnostics. bioRxiv 643676. https://doi.org/10.1101/643676
- Kidd, T.J., Ritchie, S.R., Ramsay, K.A., Grimwood, K., Bell, S.C., Rainey, P.B., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Frequent Recombination, but Only a Limited Association between Genotype and Ecological Setting. PLoS One 7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044199
- Kielhofner, M., Atmar, R.L., Hamill, R.J., Musher, D.M., 1992. Life-Threatening *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. Clin. Infect. Dis. 14, 403–411.

- Kiser, T.H., Obritsch, M.D., Jung, R., MacLaren, R., Fish, D.N., 2010. Efflux Pump Contribution to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Pharmacotherapy 30, 632–638. https://doi.org/10.1592/phco.30.7.632
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C.F., Tümmler, B., 2011. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. Front. Microbiol. 2, 1– 18. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00150
- Klockgether, J., Reva, O., Larbig, K., Tümmler, B., 2004. Sequence Analysis of the Mobile Genome Island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa C*. J. Bacteriol. 186, 518–534. https://doi.org/10.1128/JB.186.2.518-534.2004
- Klockgether, J., Tümmler, B., 2017. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. F1000Research 6, 1261. https://doi.org/10.12688/f1000research.10506.1
- Knezevic, P., Voet, M., Lavigne, R., 2015. Prevalence of Pf1-like (pro)phage genetic elements among *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Virology 483, 64–71. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.04.008
- Kouda, S., Ohara, M., Onodera, M., Fujiue, Y., Sasaki, M., Kohara, T., Kashiyama, S., Hayashida, S., Harino, T., Tsuji, T., Itaha, H., Gotoh, N., Matsubara, A., Usui, T., Sugai, M., 2009. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* with the bla IMP-1 gene cassette in Hiroshima. J. Antimicrob. Chemother. 64, 46–51. https://doi.org/10.1093/jac/dkp142
- Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., Connolly, L.E., 2016. Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 43, 1–18. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029
- Kuenne, C.T., Ghai, R., Chakraborty, T., Hain, T., 2007. GECO Linear visualization for comparative genomics. Bioinformatics 23, 125–126. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl556
- Kukavica-Ibrulj, I., Bragonzi, A., Paroni, M., Winstanley, C., Sanschagrin, F., O'Toole, G.A., Levesque, R.C., 2008. In vivo growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains *PAO1* and *PA14* and the hypervirulent strain *LESB58* in a rat model of chronic lung infection. J. Bacteriol. 190, 2804–13. https://doi.org/10.1128/JB.01572-07
- Kung, V.L., Ozer, E.A., Hauser, A.R., 2010. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 621–641. https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-10
- Laczny, C.C., Galata, V., Plum, A., Posch, A.E., Keller, A., 2017. Assessing the heterogeneity of in silico plasmid predictions based on whole-genome-sequenced clinical isolates. Brief. Bioinform. 1–9. https://doi.org/10.1093/bib/bbx162

Lambert, P.A., 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.

J. R. Soc. Med. 95, S22-26.

- Law, N., Logan, C., Yung, G., Furr, C.L.L., Lehman, S.M., Morales, S., Rosas, F., Gaidamaka, A., Bilinsky, I., Grint, P., Schooley, R.T., Aslam, S., 2019. Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient. Infection 1–4. https://doi.org/10.1007/s15010-019-01319-0
- Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Quenee, L., Ader, F., Lancel, S., Courcol, R., Guery, B.P., Faure, K., 2011. Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Crit. Care Med. 39, 2113–2120. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31821e899f
- Lechtzin, N., John, M., Irizarry, R., Merlo, C., Diette, G.B., Boyle, M.P., 2006. Outcomes of adults with cystic fibrosis infected with antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Respiration 73, 27–33. https://doi.org/10.1159/000087686
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L.G., Ausubel, F.M., 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. Genome Biol. 7. https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r90
- Lee, J., Zhang, L., 2014. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein Cell 6, 26–41. https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis,
 G., Durbin, R., Subgroup, 1000 Genome Project Data Processing, 2009. The
 Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 25, 2078–2079.
 https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352
- Li, X.-Z.Z., Li, X.-Z.Z., Nikaido, H., Nikaido, H., 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria, Drugs. https://doi.org/10.2165/11317030-0000000000000.Efflux-Mediated
- Li, X.Z., Nikaido, H., 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: An update, Drugs. https://doi.org/10.2165/11317030-00000000-00000
- LiPuma, J.J., 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev. 23, 299–323. https://doi.org/10.1128/CMR.00068-09
- Lister, P.D., Wolter, D.J., Hanson, N.D., 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin. Microbiol. Rev. 22, 582–610. https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., Yang, J., 2018. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. Nucleic Acids Res. 47,

D687–D692. https://doi.org/10.1093/nar/gky1080

- Livermore, D.M., 2003. Bacterial Resistance : Origins, Epidemiology, and Impact. Clin. Infect. Dis. 36, 11–23. https://doi.org/10.1086/344654
- Lodge, J.M., Minchin, S.D., Piddock, L.J., Busby, J.W., 1990. Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal ampC beta-lactamase. Biochem. J. 272, 627–631.
- Lomholt, J.A., Poulsen, K., Kilian, M., 2001. Epidemic Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for a Clone That Is Pathogenic to the Eye and That Has a Distinct Combination of Virulence Factors 69, 6284–6295. https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6284
- Lu, Q., Eggimann, P., Luyt, C.E., Wolff, M., Tamm, M., François, B., Mercier, E., Garbino, J., Laterre, P.F., Koch, H., Gafner, V., Rudolf, M.P., Mus, E., Perez, A., Lazar, H., Chastre, J., Rouby, J.J., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: Prevalence and clinical outcomes. Crit. Care 18, 1–9. https://doi.org/10.1186/cc13697
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 18, 268–281. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Malone, J.G., 2015. Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. Infect. Drug Resist. 8, 237. https://doi.org/10.2147/IDR.S68214
- Masuda, N., Gotoh, N., Ohya, S., Nishino, T., 1996. Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 909–913.
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J.M., Koehrsen, M., Rokas,
 A., Yandava, C.N., Engels, R., Zeng, E., Olavarietta, R., Doud, M., Smith, R.S.,
 Montgomery, P., White, J.R., Godfrey, P.A., Kodira, C., Birren, B., Galagan, J.E.,
 Lory, S., 2008. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. Proc.
 Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 3100–3105. https://doi.org/Doi
 10.1073/Pnas.0711982105
- McCaughey, L.C., Ritchie, N.D., Douce, G.R., Evans, T.J., Walker, D., 2016. Efficacy of species-specific protein antibiotics in a murine model of acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. Sci. Rep. 6, 1–8. https://doi.org/10.1038/srep30201

- Michel-Briand, Y., Baysse, C., 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie 84, 499–510. https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01422-0
- Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M., 1999. Aminoglycosides: Activity and Resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 727–737.
- Miyoshi-Akiyama, T., Kuwahara, T., Tada, T., Kitao, T., Kirikae, T., 2011. Complete genome sequence of highly multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa NCGM2.S1*, a representative strain of a cluster endemic to Japan. J. Bacteriol. 193, 7010. https://doi.org/10.1128/JB.06312-11
- Moore, E.R.B., Tindall, B.J., Martins Dos Santos, V.A.P., Pieper, D.H., Ramos, J.-L., Palleroni, N.J., 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*, in: The Prokaryotes. Springer, New York, pp. 646–703. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_21
- Newman, J.W., Floyd, R. V., Fothergill, J.L., 2017. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. FEMS Microbiol. Lett. 364, 1–11. https://doi.org/10.1093/femsle/fnx124
- Nguyen, A.T., O'Neill, M.J., Watts, A.M., Robson, C.L., Lamont, I.L., Wilks, A., Oglesby-Sherrouse, A.G., 2014. Adaptation of iron homeostasis pathways by a *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine mutant in the cystic fibrosis lung. J. Bacteriol. 196, 2265–2276. https://doi.org/10.1128/JB.01491-14
- Nikaido, H., Yoshimura, F., 1982. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane to Hydrophilic Solutes. J. Bacteriol. 152, 636–642.
- O'Leary, N.A., Wright, M.W., Brister, J.R., Ciufo, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Farrell, C.M., Goldfarb, T., Gupta, T., Haft, D., Hatcher, E., Hlavina, W., Joardar, V.S., Kodali, V.K., Li, W., Maglott, D., Masterson, P., McGarvey, K.M., Murphy, M.R., O'Neill, K., Pujar, S., Rangwala, S.H., Rausch, D., Riddick, L.D., Schoch, C., Shkeda, A., Storz, S.S., Sun, H., Thibaud-Nissen, F., Tolstoy, I., Tully, R.E., Vatsan, A.R., Wallin, C., Webb, D., Wu, W., Landrum, M.J., Kimchi, A., Tatusova, T., DiCuccio, M., Kitts, P., Murphy, T.D., Pruitt, K.D., 2016. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. Nucleic Acids Res. 44, D733-D745. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189
- O'Neill, J., 2014. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. Rev. Antimicrob. Resist. 4– 16. https://doi.org/10.1038/510015a
- Ochs, M.M., Bains, M., Hancock, R.E.W., 2000. Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*.

 Antimicrob.
 Agents
 Chemother.
 44,
 1983–1985.

 https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1983-1985.2000
 44,
 1983–1985.

- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., Juan, C., 2015. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist. Updat. 21–22, 41–59. https://doi.org/10.1016/j.drup.2015.08.002
- Ozer, E.A., Allen, J.P., Hauser, A.R., 2014. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. BMC Genomics 15, 1–17. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-737
- Ozer, E.A., Nnah, E., Didelot, X., Whitaker, R.J., Hauser, A.R., 2019. The Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa* is Characterized by Genetic Isolation of *exoU*+ and *exoS*+ Lineages. Genome Biol. Evol. 11, 1780–1796. https://doi.org/10.1093/gbe/evz119
- Pea, C., Cabot, G., Gómez-Zorrilla, S., Zamorano, L., Ocampo-Sosa, A., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E., Rodríguez-Bão, J., Rodríguez-López, F., Tubau, F., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., 2015. Influence of Virulence Genotype and Resistance Profile in the Mortality of *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections. Clin. Infect. Dis. 60, 539–548. https://doi.org/10.1093/cid/ciu866
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E., 2018. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. Infect. Genet. Evol. 57, 106–116. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026
- Pendleton, J.N., Gorman, S.P., Gilmore, B.F., 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 11, 297–308. https://doi.org/10.1586/eri.13.12
- Piddock, L.J.V., 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 19, 382–402. https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006
- Pirnay, J.P., De Vos, D., Cochez, C., Bilocq, F., Vanderkelen, A., Zizi, M., Ghysels, B., Cornelis, P., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. Environ. Microbiol. 4, 898–911. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00321.x
- Poole, K., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. Front. Microbiol. 2, 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065
- Poole, K., 2005. Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 49, 479–487. https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.479
- Poole, K., 2001. Multidrug Efflux Pumps and Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Related Organisms. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3, 255–264.

- Poulsen, B.E., Yang, R., Clatworthy, A.E., White, T., Osmulski, S.J., Li, L., Penaranda, C., Lander, E.S., Shoresh, N., Hung, D.T., 2019. Defining the core essential genome of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. 201900570. https://doi.org/10.1073/pnas.1900570116
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2010. FastTree 2 Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. PLoS One 5, 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490
- Pulcrano, G., Iula, D.V., Raia, V., Rossano, F., Catania, M.R., 2012. Different mutations in *mucA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strains in cystic fibrosis patients and their effect on *algU* gene expression. New Microbiol. 35, 295–305.
- Qualitätsreport 2017-IQTiG, 2017. Qualitätsreport 2017 Institut für QualitätssicherungundTransparenzimGesundheitswesen.Https://lqtig.Org/Berichte/Qualitaetsreport/.
- Rafeeq, M.M., Murad, H.A.S., 2017. Cystic fibrosis: Current therapeutic targets and future approaches. J. Transl. Med. 15, 1–9. https://doi.org/10.1186/s12967-017-1193-9
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., Ausubel, F.M., 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals.
 Science 80–268, 1899–1902. https://doi.org/10.1126/science.7604262
- Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist. Updat. 13, 151–171. https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., El Jaziri, M., 2015. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. Biomed Res. Int. 2015, 1–17. https://doi.org/10.1155/2015/759348
- Raymond, C.K., Sims, E.H., Kas, A., Spencer, D.H., Kutyavin, T. V., Ivey, R.G., Zhou,
 Y., Kaul, R., Clendenning, J.B., Olson, M. V., 2002. Genetic Variation at the OAntigen Biosynthetic Locus in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 184, 3614–
 3622. https://doi.org/10.1128/jb.184.13.3614-3622.2002
- Restrepo, M.I., Babu, B.L., Reyes, L.F., Chalmers, J.D., Soni, N.J., Sibila, O., Faverio, P., Cilloniz, C., Rodriguez-Cintron, W., Aliberti, S., 2018. Burden and Risk Factors for *Pseudomonas aeruginosa* Community-acquired Pneumonia: a Multinational Point Prevalence Study of Hospitalised Patients. Eur. Respir. J. 1701190. https://doi.org/10.1183/13993003.01190-2017
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay,D., Gyssens, I., Heure, O.E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liébana,E., López-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodríguez-Baño, J., Rolain, J.M.,

Segovia, C., Sigauque, B., Taconelli, E., Wellington, E., Vila, J., 2015. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. New Microbes New Infect. 6, 22–29. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007

- Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P.E., Raoult, D., 2015. The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. New Microbes New Infect. 7, 72–85. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.06.005
- Roy, P.H., Tetu, S.G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y., Paulsen, I.T., 2010. Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa PA7*. PLoS One 5, 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008842
- Saegeman, V., Huynen, P., Colaert, J., Melin, P., Verhaegen, J., 2005. Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa* by the VITEK 2 System: A Comparison with Etest Results. Acta Clin. Belg. 60, 3–9.
- San Millan, A., Toll-Riera, M., Qi, Q., Betts, A., Hopkinson, R.J., McCullagh, J., MacLean, R.C., 2018. Integrative analysis of fitness and metabolic effects of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa PAO1*. ISME J. 12, 3014–3024. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0224-8
- Schulert, G.S., Feltman, H., Rabin, S.D.P., Martin, C.G., Battle, S.E., Rello, J., Hauser,
 A.R., 2003. Secretion of the Toxin ExoU Is a Marker for Highly Virulent
 Pseudomonas aeruginosa Isolates Obtained from Patients with Hospital-Acquired
 Pneumonia. J. Infect. Dis. 188, 1695–1706. https://doi.org/10.1086/379372
- Schuster, M., Greenberg, E.P., 2006. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Med. Microbiol. 296, 73–81. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.036
- Schwarz, C., Düesberg, U., Bend, J., Schulte-Hubbert, B., Rietschel, S. van K.-, 2017.
 S3-Leitlinie: Lungenerkrankung bei Mukoviszidose, Modul 2: Diagnostik und Therapie bei der chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*.
- Schwengers, O., Barth, P., Falgenhauer, L., Chakraborty, T., Goesmann, A., 2019. Platon: Plasmid contig classification and characterization for short read draft assemblies.
- Schwengers, Oliver, Hoek, A., Fritzenwanker, M., Falgenhauer, L., Hain, T., Chakraborty, T., Goesmann, A., 2019. ASA³P: An automatic and scalable pipeline for the assembly, annotation and higher level analysis of closely related bacterial isolates 1.
- Secor, P.R., Michaels, L.A., Smigiel, K.S., Rohani, M.G., Jennings, L.K., Hisert, K.B., Arrigoni, A., Braun, K.R., Birkland, T.P., Lai, Y., Hallstrand, T.S., Bollyky, P.L., 2017. Filamentous Bacteriophage Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Alters the

Inflammatory Response and Promotes Noninvasive Infection In Vivo. Infect. Immun. 85, 1–11.

- Seemann, T., 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30, 2068–2069. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153
- Selezska, K., Kazmierczak, M., Müsken, M., Garbe, J., Schobert, M., Häussler, S., Wiehlmann, L., Rohde, C., Sikorski, J., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: Impact of water quality and phage pressure. Environ. Microbiol. 14, 1952–1967. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02719.x
- Shaver, C.M., Hauser, A.R., 2004. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT. Society 72, 6969–6977. https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6969
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam,
 H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable
 generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal
 Omega. Mol. Syst. Biol. 7, 539. https://doi.org/10.1038/msb.2011.75
- Sousa Mesquita, C., Soares-Castro, P., Santos, P.M., 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: phenotypic flexibility and antimicrobial resistance. Microb. Pathog. Strateg. Combat. them Sci. Technol. Educ. 650–665. https://doi.org/10.13140/2.1.3099.2167
- Stapper, A.P., Narasimhan, G., Ohman, D.E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., Kharazmi, A., Høiby, N., Mathee, K., 2004. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. J. Med. Microbiol. 53, 679–690.
- Stecher, G., Kumar, S., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol. Biol. Evol. 33, 1870–1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054
- Stefani, S., Campana, S., Cariani, L., Carnovale, V., Colombo, C., Lleo, M.M., Iula, V.D., Minicucci, L., Morelli, P., Pizzamiglio, G., Taccetti, G., 2017. Relevance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. Int. J. Med. Microbiol. 307, 353–362. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.004
- Stover, C., Pham, X., Erwin, A., Mizoguchi, S., Warrener, P., Hickey, M., Brinkman, F., Hufnagle, W., Kowalik, D., Lagrou, M., Garber, R., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan*, Y., Brody*, L., Coulter, S., Folger, K., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G., Wu, Z., Paulsen, I., Reizer, J., Saier, M., Hancock, R., Lory, S., Olson, M., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa PAO1*, an opportunistic pathogen. Nature 406, 959– 964. https://doi.org/10.1038/35023079

- Su, M., Satola, S.W., Read, T.D., 2019. Genome-Based Prediction of Bacterial Antibiotic Resistance. J. Clin. Microbiol. 57, 1–15. https://doi.org/10.1128/JCM.01405-18
- Subedi, D., Kohli, G.S., Vijay, A.K., Willcox, M., Rice, S.A., 2019. Accessory genome of the multi-drug resistant ocular isolate of *Pseudomonas aeruginosa PA34*. PLoS One 14, 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215038
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E.M., Houchens, C.R., Grayson, M.L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., 2017. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect. Dis. 18. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- The EUCAST, 2016. Expert rules, intrinsic resistance and exceptional phenotypes. 2011, Version 3.1.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0 http://www.eucast.org [WWW Document], 2019. . publ. URL http://www.eucast.org
- Thrane, S.W., Taylor, V.L., Freschi, L., Kukavica-ibrulj, I., Boyle, B., Laroche, J., Pirnay, J., Lévesque, R.C., Lam, J.S., 2015. The Widespread Multidrug-Resistant Serotype O12, 1–10. https://doi.org/10.1128/mBio.01396-15.Editor
- Thrane, S.W., Taylor, V.L., Lund, O., Lam, J.S., Jelsbak, L., 2016. Application of Whole-Genome Sequencing Data for O-Specific Antigen Analysis and *In Silico* Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. J. Clin. Microbiol. 54, JCM.00349-16. https://doi.org/10.1128/JCM.00349-16
- Tian, Z.X., Yi, X.X., Cho, A., O'Gara, F., Wang, Y.P., 2016. CpxR Activates MexAB-OprM Efflux Pump Expression and Enhances Antibiotic Resistance in Both Laboratory and Clinical *nalB*-Type Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog. 12. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005932
- Treepong, P., Kos, V.N., Guyeux, C., Blanc, D.S., Bertrand, X., Valot, B., Hocquet, D., 2018. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. Clin. Microbiol. Infect. 24, 289–294. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.018
- Tueffers, L., Barbosa, C., Bobis, I., Schubert, S., Ho, M., Ru, M., Franke, A., Rosenstiel,
 P., Friedrichs, A., Krenz-weinreich, A., Fickenscher, H., 2019. *Pseudomonas aeruginosa* populations in the cystic fibrosis lung lose susceptibility to newly applied b-lactams within 3 days. J. Antimicrob. Chemother. 1–10. https://doi.org/10.1093/jac/dkz319

- Tümmler, B., Kiewitz, C., 1999. Cystic fibrosis: An inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. Mol. Med. Today 5, 351–358. https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01506-3
- Valot, B., Guyeux, C., Rolland, J.Y., Mazouzi, K., Bertrand, X., Hocquet, D., 2015. What it takes to be a *Pseudomonas aeruginosa*? The core genome of the opportunistic pathogen updated. PLoS One 10, 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126468
- Ventola, C.L., 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P T A peer-reviewed J. Formul. Manag. 40, 277–83. https://doi.org/Article
- Visca, P., Imperi, F., Lamont, I.L., 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. Trends Microbiol. 15, 22–30. https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004
- Vollmer, W., Höltje, J.-V., 2004. The Architecture of the Murein (Peptidoglycan) in Gram-Negative Bacteria: Vertical Scaffold or Horizontal Layer(s)? J. Bacteriol. 186, 5978– 5987. https://doi.org/10.1128/JB.186.18.5978
- Von Baum, H., Welte, T., Marre, R., Suttorp, N., Ewig, S., 2010. Community-acquired pneumonia through *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*: Diagnosis, incidence and predictors. Eur. Respir. J. 35, 598–605. https://doi.org/10.1183/09031936.00091809
- Welte, T., Suttorp, N., Marre, R., 2004. CAPNETZ- Community-Acquired Pneumonia Competence Network. Infection 32, 234–238. https://doi.org/10.1007/s15010-004-3107-z
- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., Köhler, T., van Delden, C., Weinel, C., Slickers, P., Tümmler, B., 2007. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 8101–6. https://doi.org/10.1073/pnas.0609213104
- Wienhold, S.-M., Lienau, J., Witzenrath, M., 2019. Towards inhaled phage therapy in Western Europe. Viruses 11, 1–13. https://doi.org/10.3390/v11030295
- Wilson, A.C.C., Ashton, P.D., Calevro, F., Charles, H., Colella, S., Febvay, G., Jander, G., Kushlan, P.F., MacDonald, S.J., Schwartz, J.F., Thomas, G.H., Douglas, A.E., 2010. Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, Acyrthosiphon pisum, with its symbiotic bacterium Buchnera aphidicola. Insect Mol. Biol. 19, 249–258. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00942.x
- Wingett, S.W., Andrews, S., 2018. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control [version 1; peer review: 3 approved, 1 approved with reservations]. F1000Research 7. https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.1

Yang, L., Jelsbak, L., Marvig, R.L., Damkiær, S., Workman, C.T., Rau, M.H., Hansen,
S.K., Folkesson, A., Johansen, H.K., Ciofu, O., Høiby, N., Sommer, M.O.A., Molin, S., 2011. Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 7481–6. https://doi.org/10.1073/pnas.1018249108

- Yayan, J., Ghebremedhin, B., Rasche, K., 2015. Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period. PLoS One 10, 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139836
- Zhang, Z., Louboutin, J., Weiner, D.J., Goldberg, J.B., Wilson, J.M., 2005. Human Airway
 Epithelial Cells Sense *Pseudomonas aeruginosa* Infection via Recognition of
 Flagellin by Toll-Like Receptor 5. Society 73, 7151–7160.
 https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7151

12 Anhang

12.1 Inhaltsverzeichnis des elektronischen (E-) Anhangs (CD)

Datei E-1: Erstellte "Pseuplas"-Nukleotid-Datenbank aller 37 geschlossenen Plasmide, die sich in der RefSeq-Datenbank befanden (NCBI, *"plasmid annotation report"* von *P. aeruginosa*, Stand: 01.10.2018, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/plasmids/187, O'Leary *et al.*, 2016). Die Plasmidliste befindet sich in Tabelle S-1.

Datei E-2: Liste aller durch ABRicate (https://github.com/tseemann/abricate) identifizierten Virulenzgene der VFDB-Datenbank (http://www.mgc.ac.cn/VFs/) mit kompletter *Presence-/Absence*-Matrix (2. Tab, Sequenzidentitätswerte).

Datei E-3: ANI- (*average nucleotide identity*) Matrix der CAP-, CF- und der Referenzstämme dieser Arbeit mit zugeordneter phylogenetischer Gruppe, erstellt mit EDGAR (Blom et al., 2019).

Datei E-4: Liste aller geschlossenen *P. aeruginosa*-Genome, die zum Zeitpunkt des 25.10.2018 in der RefSeq-Datenbank von NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/ genomes/187, (O'Leary et al., 2016)) verfügbar waren und die in dieser Arbeit als NCBI-Genome in EDGAR (Blom et al., 2019) implementiert wurden.

Datei E-5: *Output*-Liste der von Platon (O. Schwengers et al., 2019) als putative Plasmide bewerteten *Contigs*.

Abbildung E-1: Vergrößerte Darstellung der RGP-1 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 49119 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-2: Vergrößerte Darstellung der RGP-2 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 295321 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-3: Vergrößerte Darstellung der RGP-3 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 693590 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-4: Vergrößerte Darstellung der RGP-4 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 1316571 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-5: Vergrößerte Darstellung der RGP-5 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 1930696 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-6: Vergrößerte Darstellung der RGP-6 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 2035227 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-7: Vergrößerte Darstellung der RGP-7 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 2438613 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-8: Vergrößerte Darstellung der RGP-8 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 2487189 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-9: Vergrößerte Darstellung der RGP-9 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 2699181 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-10: Vergrößerte Darstellung der RGP-10 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 2861495 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-11: Vergrößerte Darstellung der RGP-11 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 2931702 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-12: Vergrößerte Darstellung der RGP-12 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 2972722 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-13: Vergrößerte Darstellung der RGP-13 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 3192028 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-14: Vergrößerte Darstellung der RGP-14 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 3835627 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-15: Vergrößerte Darstellung der RGP-15 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 4146370 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-16: Vergrößerte Darstellung der RGP-16 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 4350350 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-17: Vergrößerte Darstellung der RGP-17 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 4470548 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-18: Vergrößerte Darstellung der RGP-18 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 4585831 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012) Die Markierungen 1 bis 5 zeigen die unterteilten Abschnitte.

Abbildung E-19: Vergrößerte Darstellung der RGP-19 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 4755142 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-20: Vergrößerte Darstellung der RGP-20 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 4877405 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-21: Vergrößerte Darstellung der RGP-21 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 4924166 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

Abbildung E-22: Vergrößerte Darstellung der RGP-22 in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *UCBPP-PA14*) mit Zentrierung bei 5304697 bp und einem Zoomfaktor von 10, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012). Die Markierungen 1 bis 12 zeigen die unterteilten Abschnitte.

Abbildung E-23: Vergrößerte Darstellung der Serotyp-Insel in CAP- und CF-Stämmen (Referenz: *PA7*) mit Zentrierung bei "-c = 2009605" und einem Zoomfaktor von 25, erstellt mit CCT (Grant et al., 2012).

12.2 Inhaltsverzeichnis des gedruckten Anhangs

Abbildung S-1: Alignment des oprD-Gens in PAO1 und LESB58.						
Tabelle S-1: Liste der Plasmide der erstellten "Pseuplas"-Datenbank	143					

	Anzahl I 1 Aminosäuren
PAO1 LESB58	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYYFNRDGKSGSG MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLNLLLRNYYFNRDGKEGRG ***********************************
PAO1 LESB58	DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGLKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGLKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY ***********************************
PAO1 LESB58	L3 SRAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF SRAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF *******
PAO1 LESB58	L4 TEGKEPTTVKSRGELYATYAGETAKSADFIGGRYAITDNLSASLYGAELEDIYRQYYLNS TEGKEPTTVKSRGELYATYAGQTAKSADFAGGRYAITDNLSASLYGAELKDIYRQYYLNT ************************************
PAO1 LESB58	NYTIPLASDQSLGFDFNIYRTTDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGD 300 NYTIPLASDQSLGFDFNIYRTTDEGKSKAGDISNTTWSLAGAYTLDAHTFTLAYQVHGD ************************************
PAO1 LESB58	2PFDYIGFGRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMVR EPFDYIGFGGNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMLR :************************************
PAO1 LESB58	YINGKDIDGTKMSDNNVGYKNYGYGEDGKHHE TNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRA 420 YINGKDIDGTKVDSSSSYAGLYGEDGKHHE TNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRA 418 ************************************
PAO1 LESB58	NADQGEGDQNE FRLIVDYPLSIL 443 NADQGEGDQNE FRLIVDYPLSIL 441 *****

Abbildung S-1: Aminosäure-Alignment der Varianten des oprD-Gens in PAO1 (Typ-A-WT) und *LESB58* (Typ-B-WT). L= Loop-Struktur im Protein

	Ursprünglicher							Pseudo-	Datum	Datum
Plasmidname	Stamm	RefSeq-Nummer	INSDC	Größe (Kb)	GC%	Proteine	Gene	gene	Veröffentlichung	Modifizierung
Rms149	Ps142	NC_007100.1	AJ877225	57.121	59.4702	51	52	1	2005/06/01	2014/12/16
pBS228	ML4262	NC_008357.1	AM261760	89.147	59.0059	97	99	2	2006/09/16	2014/12/16
pMATVIM-7	07-406	NC_009739.1	AM778842	24.179	63.8116	29	29	-	2007/08/21	2014/12/16
pMM1	E1	NC_010722.1	EU410482	2.14	45.7944	1	1	-	2008/05/21	2014/12/17
pKLC102	С	NC_019202.1	AY257538	103.532	60.928	105	105	-	2012/11/04	2014/12/17
pNOR-2000	COL_1	NC_020452.1	KC189475	21.88	62.8108	23	23	-	2013/03/07	2014/12/18
pPA-2	ST1006	NC_022345.1	KC609322	7.995	55.5222	8	8	-	2013/09/12	2014/12/18
pOZ176	PA96	NC_022344.1	KC543497	500.839	57.598	556	585	29	2013/09/12	2017/03/16
pCOL-1	ST308	NC_022346.1	KC609323	31.529	60.189	26	28	2	2013/09/14	2014/12/18
pUM505	UM505	NC_016138.1	HM560971	123.322	60.5829	137	138	-	2014/10/15	2014/12/18
90	S04	NZ_CP011370.1	CP011370	159.187	57.7321	178	186	8	2015/05/08	2017/04/10
pBH6	BH6	-	CM003767	3.652	55.8598	2	3	1	2016/02/08	2016/02/08
pBM413	PA121617	NZ_CP016215.1	CP016215	423.017	56.4067	472	506	34	2016/07/07	2017/03/20
pPA3448	PA344	NZ_CM007350.1	CM007350	49.094	58.8972	60	63	3	2016/10/27	2017/03/20
pPA7790	PA7790	NZ_CP015000.1	CP015000	49.021	58.8972	61	64	3	2016/11/08	2017/03/20
unnamed1	DN1	NZ_CP018048.1	CP018048	317.349	56.9376	370	375	5	2016/12/20	2017/03/21
pJHX613	E6130952	NZ_CP020602.1	CP020602	36.454	61.3348	38	40	2	2017/04/13	2017/04/13
unnamed1	PA83	NZ_CP017294.1	CP017294	398.087	59.3712	421	438	17	2017/07/08	2017/07/21
pPB353_1	PB353	NZ_CP025052.1	CP025052	59.923	57.3386	76	85	9	2017/12/08	2017/12/08
pPB354_1	PB354	NZ CP025054.1	CP025054	59.923	57.3386	76	85	9	2017/12/08	2017/12/08
Plasmid_1	RW109	NZ_LT969519.1	LT969519	555.265	58.0933	587	622	35	2017/12/20	2017/12/27
Plasmid_2	RW109	NZ_LT969521.1	LT969521	151.612	57.2778	161	165	4	2017/12/20	2017/12/27
unnamed1	AR_0230	NZ_CP027175.1	CP027175	71.782	59.6877	82	91	9	2018/03/13	2018/11/10
unnamed2	AR_0353	NZ_CP027176.1	CP027176	1.35	48	2	2	-	2018/03/13	2018/11/10
unnamed1	AR_0353	NZ_CP027173.1	CP027173	41.559	60.7979	46	50	4	2018/03/13	2018/11/26
unnamed3	AR 0356	NZ CP027167.1	CP027167	165.365	55.7857	200	213	13	2018/03/13	2018/11/26

Tabelle S-1: Liste der Plasmide, deren Nukleotidsequenzen für Blast-Analysen dieser Arbeit in der "Pseuplas"-Datenbank gesammelt wurden.Heruntergeladen wurden die Sequenzen (fasta-Dateiformat) von der RefSeq-Datenbank (NCBI, "plasmid annotation report" von P. aeruginosa,Stand: 01.10.2018, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/plasmids/187, O'Leary et al., 2016).

Fortsetzung der Tabelle S-1

	Ursprünglicher							Pseudo-	Datum	Datum
Plasmidname	Stamm	RefSeq-Nummer	INSDC	Größe (Kb)	GC%	Proteine	Gene	gene	Veröffentlichung	Modifizierung
unnamed2	AR_0356	NZ_CP027170.1	CP027170	438.531	57.1435	509	527	18	2018/03/13	2018/11/26
pCR1	CR1	NZ_CP020561.2	CP020561	46.804	59.1894	55	62	7	2018/04/03	2018/05/23
unnamed1	AR441	NZ_CP029091.1	CP029091	165.365	55.7857	197	211	14	2018/05/02	2018/06/07
unnamed2	AR441	NZ_CP029092.1	CP029092	57.052	60.8585	66	70	4	2018/05/02	2018/06/07
unnamed3	AR441	NZ_CP029094.1	CP029094	438.529	57.1426	503	524	21	2018/05/02	2018/06/07
unnamed1	AR439	NZ_CP029095.1	CP029095	1.129	54.3844	2	2	-	2018/05/02	2018/06/07
unnamed2	AR439	NZ_CP029096.1	CP029096	437.392	56.8778	487	515	28	2018/05/02	2018/06/07
pK34-7-1	K34-7	NZ_CP029708.1	CP029708	4.44	30.0676	3	3	-	2018/06/16	2018/06/16
pY89	Y89	NZ_CP030914.1	CP030914	85.842	60.0953	93	96	3	2018/08/14	2018/08/14
unnamed	AR_0111	NZ_CP032256.1	CP032256	129.422	57.515	150	153	3	2018/09/19	2018/09/19

13 Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen sehr herzlich für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation danken:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Trinad Chakraborty für die Möglichkeit der Forschung und der Erstellung dieser Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Torsten Hain für die hervorragende Betreuung als Doktorvater, der Bereitstellung des Themas sowie der engagierten Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, insbesondere den Mitarbeitern der Diagnostik für die Unterstützung bei der Nutzung der diagnostischen Geräte. Insbesondere danke ich Herrn PD Dr. Can Imirzalioglu und Herrn Dr. Moritz Fritzenwanker für die kompetente Beratung in Bezug auf klinische Faktoren sowie für den Beitrag anregender Ideen.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Anita Windhorst für die kompetente statistische Beratung und die freundliche Unterstützung.

Ich danke der CAPNETZ Stiftung, vertreten durch die Geschäftsführerin, Frau Grit Barten, für die Bereitstellung der aus CAP-Patienten isolierten Bakterienstämme und dem Zentrum für Infektiologie der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Heidelberg, vertreten durch Prof. Dr. Alexander Dalpke, für die Bereitstellung der aus CF-Patienten isolierten Bakterienstämme. Ohne die Bereitstellung dieser Bakterienisolate hätte diese Arbeit nie entstehen können.

Ich danke M. Sc. Jan-Philipp Mengel für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Zuge der Laborarbeit von der Bakterienanzucht, der Prozessierung mittels Pipettierroboter bis zur Genomsequenzierung. Ich danke ebenfalls den anderen "Mitbewohnern" unseres Büros: Dipl. -Ing. Tilman Schultze, M. Sc. Katharina Peuckert, M. Sc. Kassandra Komma, Nele Schermeier, M. Sc. Merve Kaya und B. Sc. Filip Turujlija. Die fachlichen Diskussionen im Büro oder in den Kaffeepausen sowie die privaten, oft sehr lustigen Unterhaltungen und freizeitlichen Aktivitäten haben einen enormen Teil zu dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren danke ich B. Sc. Markus Weigel, der mich mit der Implementierung der Genomdaten in GECO unterstützt hat. Ich danke den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Professur für Bioinformatik und Systembiologie, insbesondere Herrn Prof. Dr. Alexander Goesmann, für die umfangreiche und kompetente Unterstützung bei der Nutzung bioinformatischer *Tools* sowie der Datenanalyse. Ich danke M. Sc. Andreas Hoek und M. Sc. Oliver Schwengers für die kompetente Hilfe bei der Nutzung von ASA³P und Platon. Ein besonderer Dank geht an Dr. Jochen Blom, der zahlreiche EDGAR-Analysen durchführte und mir auch bei persönlichen Fachgesprächen immer freundlich, kompetent und hilfsbereit beratend zur Seite stand.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Katharina Reiswig, die mir durch ihr Vertrauen, ihr stets offenes Ohr und die tolle gemeinsame Freizeit immer viel Kraft gegeben hat.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Beate und Klaus, und meinem Bruder Jan für ihre grenzenlose Unterstützung, ihr Vertrauen und ihre Geduld auf meinem kompletten Lebensweg. Meinen Großeltern danke ich von ganzem Herzen, die mir durch ihre Förderung diese Dissertation ermöglicht haben.