



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di Scienze Matematiche

Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in Biologia

Molecolare e Applicata

**Analisi massiva dell'organizzazione genica dei sistemi di efflusso
in *Burkholderia***

**Massive analysis of the gene organization of *Burkholderia* efflux
systems**

Relatore

Dott. Marco Fondi

Correlatore

Dott.ssa Elena Perrin

Candidato

Federico Scolari

INDICE

1 INTRODUZIONE	<u>1</u>
1.1 Il Genere <i>Burkholderia</i>	<u>1</u>
1.2 <i>Burkholderia</i> e Patogenesi	<u>2</u>
1.3 Trattamento Farmacologico	<u>3</u>
1.4 Antibiotico-resistenza	<u>4</u>
1.4.1 Esclusione o Ridotto Ingresso nella Cellula dell'Antibiotico	<u>5</u>
1.4.2 Efflusso Attivo dalla Cellula	<u>6</u>
1.4.3 Inattivazione o Degradazione Enzimatica dell'Antibiotico	<u>7</u>
1.4.4 Alterazione del Bersaglio dell'Antibiotico	<u>7</u>
1.4.5 Acquisizione di Pathway Metabolici Alternativi	<u>7</u>
1.4.6 Overproduzione del Bersaglio dell'Antibiotico	<u>7</u>
1.4.7 Sequestro dell'Antibiotico	<u>8</u>
1.4.8 Formazione di Biofilm	<u>8</u>
1.5 Trasportatori RND	<u>8</u>
2 SCOPO DELLO STUDIO	<u>10</u>
3 MATERIALI E METODI	<u>11</u>
3.1 Whole Genome Phylogeny	<u>11</u>
3.2 Generazione Cluster	<u>12</u>
3.3 Analisi di Espressione	<u>13</u>
4 RISULTATI	<u>15</u>
4.1 Generazione Cluster	<u>15</u>
4.2 Analisi di Espressione	<u>16</u>
4.2.1 Operone RND3	<u>16</u>
4.2.2 Operone RND4	<u>19</u>
5 DISCUSSIONE	<u>23</u>
6 BIBLIOGRAFIA	

1 INTRODUZIONE

1.1 Il Genere *Burkholderia*

Burkholderia è un importante genere della classe dei β -proteobatteri, è di interesse in ambito ecologico, biotecnologico e patogenico e contiene più di 100 specie (Estrada-de los Santos *et al.*, 2016). Queste specie occupano svariate nicchie ambientali, la maggioranza come *free-living* o come simbionti di altri organismi, alcune come patogeni di piante o animali (Payne *et al.*, 2005). L'ampia variabilità ecologica di questi organismi è coerente con la loro ampia variabilità genetica, in quanto il *core-genome* di questo clade comprende solo alcune centinaia di geni conservati in tutti gli organismi (Ussery *et al.*, 2009) e i genomi stessi, per la maggioranza compresi nell'intervallo 6-9 Mb, presentano molteplici isole genomiche e sequenze di inserzione che ne promuovono la plasticità (O'Sullivan and Mahenthiralingam, 2005).

Le applicazioni delle specie di *Burkholderia* sono molteplici: negli ultimi anni sono stati proposti impieghi in agricoltura come biofertilizzanti e biopesticidi, data la possibilità di sviluppare interazioni mutualistiche con le piante (Paganin *et al.*, 2011), impieghi nel *biomining*, per cui è necessario l'utilizzo di organismi acidofili (Gumulya *et al.*, 2018), oppure sintesi di enzimi litici (Dandavate *et al.*, 2009).

Il genere *Burkholderia* è stato introdotto nel 1992 per incorporare sette specie di *Pseudomonas* (Yabuuchi *et al.*, 1992) e da allora ha subito molte modifiche. Una delle più significative è stata la suddivisione in due gruppi monofiletici A e B (Estrada-de los Santos *et al.*, 2016), il primo contenente la maggioranza delle specie PBE (*Plant-Beneficial and Environmental*), il secondo contenente le specie patogene per piante, animali e uomo, in cui è compreso il Bcc: *Burkholderia cepacia* complex (Figura 1). Le specie patogene si sono dimostrate particolarmente utili in ambito agricolo, ad esempio nel controllo della crescita di funghi patogeni delle piante, tuttavia il loro utilizzo è fortemente limitato dal rischio sanitario che comportano (Chiarini *et al.*, 2006; Paganin *et al.*, 2011).

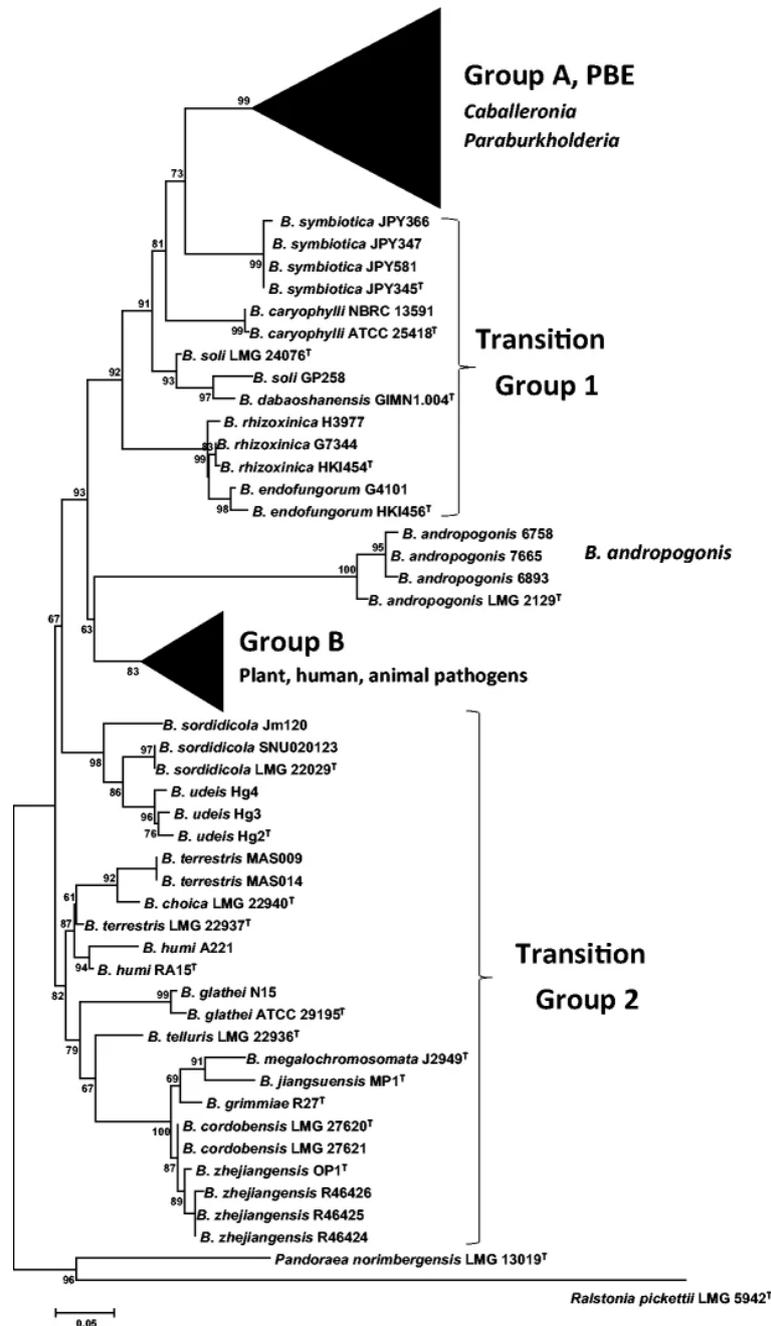


Figura 1 - Filogenesi del genere *Burkholderia* e suddivisione in gruppi (Estrada-de los Santos et al., 2016).

1.2 *Burkholderia* e Patogenesi

Tra le specie di *Burkholderia* sono di particolare interesse quelle all'origine di patologie. Un esempio è *B. pseudomallei*, agente eziologico della melioidosi, un'infezione opportunistica caratterizzata da polmonite con un tasso di mortalità del 40%. È un'infezione endemica del sudest asiatico e dell'Australia, ma la sua distribuzione globale è in espansione e attualmente non esistono misure preventive per la protezione degli individui a rischio (Wiersinga et al., 2012).

Altre specie di *Burkholderia* con potenziale infettivo sono quelle appartenenti al *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), un gruppo composto da più di 20 specie che si trovano naturalmente in

acqua, suolo e rizosfera, ma si comportano come patogeni opportunisti negli individui affetti da fibrosi cistica (FC) (Govan and Deretic, 1996) e malattia granulomatosa cronica (Speert et al., 1994). I genomi dei batteri Bcc sono organizzati in tre cromosomi circolari ed un numero variabile tra uno e cinque megaplasmidi per una dimensione totale di 7.5 – 8.5 Mb con una composizione in GC del 67%. La grandezza dei genomi e la loro ripartizione in più repliconi rende questi batteri difficili da classificare in gruppi ben delineati (Vandamme and Dawyndt, 2011). Molte delle specie all'interno del Bcc sono indistinguibili a livello fenotipico, quindi la caratterizzazione a livello genotipico è spesso l'unica opzione possibile (Vandamme and Dawyndt, 2011).

Anche la capacità dei batteri Bcc di sopravvivere in un ampio range di condizioni ambientali, compreso il corpo umano, è attribuibile a grandezza e ripartizione dei loro genomi, che genera un'enorme adattabilità (Baldwin et al., 2007). Vari studi suggeriscono che i geni presenti nei cromosomi secondari siano soggetti a tassi di mutazione più frequenti, rendendoli così particolarmente variabili (Cooper et al., 2010). Nel contesto dell'infezione giocano un ruolo fondamentale anche le isole genomiche, ad esempio l'isola genomica di 31.7kb *cci*: questa è stata osservata in tutti i ceppi virulenti di *B. cenocepacia* e contiene 35 CDS codificanti geni con un ruolo fondamentale nell'instaurazione e nella persistenza della malattia (Baldwin et al., 2004).

1.3 Trattamento Farmacologico

Le infezioni polmonari da *Burkholderia* sono particolarmente pericolose, in quanto spesso generano condizioni invasive di batteriemia a rapida progressione, definite "*cepacia syndrome*", che risultano fatali in percentuale maggiore rispetto ad infezioni di patogeni opportunisti simili come *Pseudomonas aeruginosa* (Speert et al., 2002). Questo tipo di infezione è inoltre trasmissibile per contatto, rendendo necessaria la separazione tra pazienti affetti da FC che hanno o meno subito l'infezione da parte dei batteri Bcc (Govan et al., 1993).

Oltre alla riduzione dell'aspettativa di vita dei pazienti con FC di 2.5 volte (Saiman et al., 2014), le infezioni da *B. cenocepacia* riducono anche le percentuali di sopravvivenza dopo 1 e 5 anni dal trapianto di polmone, la strategia più utilizzata negli stadi finali della FC (Snell et al., 2017). Nonostante ciò, il basso numero di persone colpite da questa infezione si traduce in uno scarso interesse da parte dell'industria farmaceutica verso lo sviluppo di un trattamento volto all'eradicazione del patogeno (Scoffone et al., 2020).

L'attuale assenza di vaccini per la prevenzione di questa infezione (Scoffone et al., 2020) e la capacità dei batteri Bcc di sopravvivere anche in contatto con prodotti disinfettanti e antimicrobici (Geftic et

al., 1979) rendono la terapia antibiotica uno strumento indispensabile per ridurre i sintomi o, in rari casi, guarire dall'infezione. Il Bcc pone forti limitazioni a questo trattamento a causa del suo elevato livello di antibiotico-resistenza (Scoffone et al., 2020), infatti negli ultimi anni sono stati osservati solo alcuni casi di eradicazione completa del patogeno attraverso somministrazioni intensive di combinazioni di antibiotici per via intravenosa, orale e nebulizzati (Garcia et al., 2018; Kitt et al., 2016; Sputael et al., 2020).

1.4 Antibiotico-resistenza

L'antibiotico-resistenza nei patogeni è una problematica diffusa a livello mondiale che comporta un aumento della mortalità a causa di infezioni (Akova, 2016). La comparsa di batteri *multidrug resistant* (MDR) ha causato un aumento delle infezioni difficili o impossibili da curare con gli antibiotici convenzionali, portando l'Organizzazione Mondiale della Sanità a definirla una delle 10 maggiori minacce alla salute globale (WHO - *Antimicrobial resistance*); uno studio del 2019 ha stimato che il numero annuale di decessi in Europa correlati a infezioni di batteri MDR è pari a 33.000 (Cassini et al., 2019) .

Tra le cause della comparsa di organismi MDR una delle più importanti è l'abuso di antibiotici: la prescrizione eccessiva di antibiotici ad ampio spettro, che vari studi hanno dimostrato essere inappropriata nel 30% - 50% dei casi (Read and Woods, 2014; Ventola, 2015) porta all'eliminazione della maggioranza dei microrganismi sensibili, ma contemporaneamente permette ai rimanenti di sviluppare una resistenza che li rende selettivamente avvantaggiati. Il mercato online di antibiotici, inoltre, ha fornito un mezzo per ottenere tali farmaci con poche restrizioni, aumentandone l'utilizzo improprio (Bartlett et al., 2013). Un'altra fonte principale di questo problema è l'utilizzo di antibiotici negli allevamenti come alternativa al controllo delle infezioni, una procedura che causa la comparsa di batteri resistenti, che possono essere trasmessi all'uomo attraverso l'ambiente (Graham et al., 2009), i prodotti alimentari (Price et al., 2005) e il contatto diretto (Smith et al., 2013).

La resistenza agli antibiotici può verificarsi a causa di meccanismi intrinseci o acquisiti. Nel primo caso si tratta di meccanismi universalmente distribuiti all'interno dei genomi di molte specie batteriche, indipendenti dalla pressione selettiva. L'esempio più significativo di questo tipo di resistenza è la membrana esterna dei batteri Gram-negativi, che svolge il ruolo di una barriera impermeabile a varie molecole (Cox and Wright, 2013). La resistenza acquisita, invece, si verifica quando un organismo inizialmente suscettibile ad una molecola sviluppa dei meccanismi che lo rendono parzialmente o completamente immune dalla stessa. Questo processo può avvenire

attraverso mutazioni (Martinez and Baquero, 2000) o trasferimento genico orizzontale (HGT) (Boto and Martínez, 2011). Le mutazioni che portano ad un fenotipo resistente possono avvenire sui bersagli degli antibiotici, sui trasportatori o su regolatori che controllano l'espressione di trasportatori o elementi decontaminanti (Martinez, 2014); nel caso del HGT sono invece acquisiti geni per la resistenza e ci sono forti evidenze che il trasferimento avvenga da specie ambientali piuttosto che commensali (Davies and Davies, 2010).

Per uccidere o inibire la crescita delle cellule batteriche un antibiotico deve prima entrare all'interno del microrganismo, in alcuni casi essere attivato e infine raggiungere il suo bersaglio in una concentrazione abbastanza alta da esercitare un effetto. Da un punto di vista biochimico i meccanismi di resistenza agiscono a livello di questi passaggi. In Figura 2 sono riportati i principali meccanismi di resistenza, che includono: (1) esclusione o ridotto ingresso nella cellula dell'antibiotico; (2) Efflusso attivo dalla cellula; (3) Inattivazione o degradazione enzimatica dell'antibiotico; (4) Alterazione del bersaglio dell'antibiotico; (5) Acquisizione di pathway metabolici alternativi (*metabolic bypass*); (6) Overproduzione del bersaglio dell'antibiotico; (7) Sequestro dell'antibiotico (Rhodes and Schweizer, 2016).

Un ulteriore meccanismo di resistenza agli antibiotici è l'incapsulamento dei batteri in matrici polisaccaridiche e proteiche, dette *biofilm* (Gilbert et al., 1997).

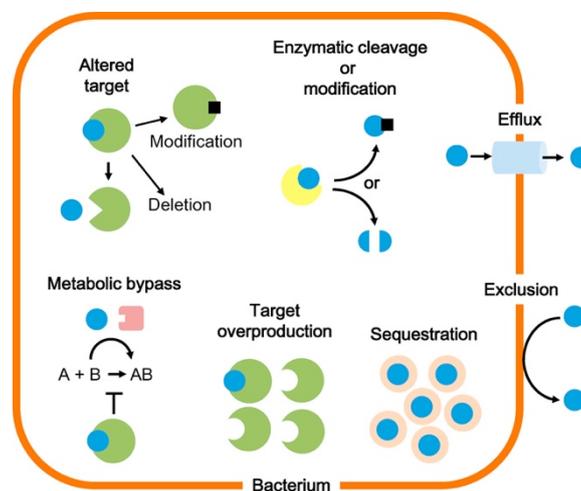


Figura 2 - Meccanismi di resistenza (Schweizer, 2012).

1.4.1 Esclusione o Ridotto Ingresso nella Cellula dell'Antibiotico

La membrana esterna dei batteri Gram-negativi è formata principalmente da lipopolisaccaride (LPS), costituito da lipide A, ovvero la porzione glicolipidica, un core oligosaccaridico (OS) e in alcune specie un antigene O. Il core OS e il lipide A sono fondamentali per l'integrità strutturale della membrana esterna, mentre l'antigene O agisce come protezione contro la disidratazione e la fagocitosi (Caroff

and Karibian, 2003; Raetz and Whitfield, 2002). In molti batteri lo zucchero 4-amino-4-deossi-L-arabinosio (Ara4N) è sintetizzato e aggiunto al lipide A, impedendo l'ingresso di antibiotici polipeptidici come la polimixina (Ernst et al., 1999), tuttavia la sintesi di Ara4N è limitata o inibita nella maggioranza delle condizioni di crescita. Un'eccezione a questa limitazione è il genere *Burkholderia*, che sintetizza Ara4N costitutivamente, in alcuni casi legandolo sia al lipide A che al core OS, raggiungendo così elevati livelli di resistenza ai peptidi antimicrobici (Loutet and Valvano, 2011; Nummila et al., 1995).

1.4.2 Efflusso Attivo dalla Cellula

Le pompe di efflusso hanno il compito di trasportare soluti all'esterno della cellula; possono essere specifiche per un substrato o trasportare un ampio *range* di molecole, tra cui gli antibiotici: in questo caso sono associate alla MDR (Piddock, 2006). Evidenze confermano che nei batteri con genomi più grandi è presente un numero maggiore di pompe di efflusso (Ren et al., 2004).

Nei genomi batterici sono presenti almeno sei famiglie di pompe di efflusso (Figura 3, Temgoua and Wu, 2019): (1) la *major facilitator superfamily* (MFS); (2) la *resistance nodulation cell division* (RND); (3) la *small multidrug resistance* (SMR); (4) la *multi-drug and toxic compound extrusion* (MATE); (5) la *ATP-binding cassette* (ABC); (6) la *proteobacterial antimicrobial compound efflux* (PACE).

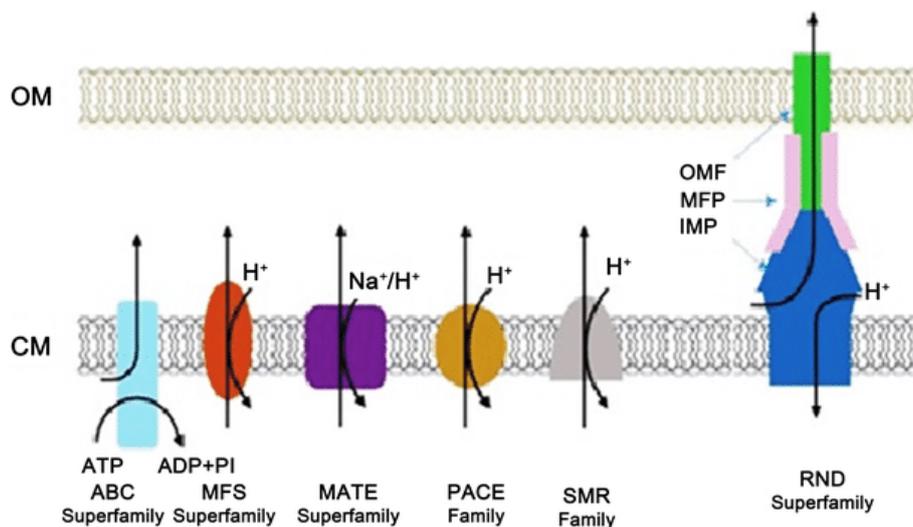


Figura 3 - Struttura delle famiglie di pompe di efflusso (Temgoua and Wu, 2019).

Nei batteri Gram-negativi la famiglia RND è la più significativa nell'antibiotico-resistenza, data la sua struttura che si estende lungo tutto l'involucro cellulare, permettendo il rilascio del farmaco nello spazio extracellulare e non in quello periplasmatico (Rhodes and Schweizer, 2016).

1.4.3 Inattivazione o Degradazione Enzimatica dell'Antibiotico

Molti batteri sono in grado di esprimere enzimi che rendono inefficaci alcune molecole antibiotiche; l'esempio maggiormente studiato di questo meccanismo è la resistenza agli antibiotici β -lattamici, come penicillina, cefalosporina e carbapenemi. I β -lattamici causano la morte cellulare attraverso l'inibizione della sintesi della parete, ma il loro utilizzo è fortemente compromesso dalla sempre maggiore presenza nelle specie batteriche di β -lattamasi, che rompendo l'anello β -lattamico inibiscono l'azione dell'antibiotico (Everaert and Coenye, 2016). Dalla prima osservazione di β -lattamasi in *E.coli* nel 1940, questo enzima è stato identificato in un'ampia gamma di batteri, tra cui specie del Bcc (Drawz and Bonomo, 2010; Hwang and Kim, 2015).

1.4.4 Alterazione del Bersaglio dell'Antibiotico

Questo meccanismo prevede la modifica del gene codificante il bersaglio dell'antibiotico mediante mutazioni puntiformi o, in casi più rari, delezioni, oppure la modifica enzimatica del bersaglio stesso. Nei batteri Bcc questo meccanismo è principalmente associato con la resistenza ai fluoroquinoloni, antibiotici che inibiscono l'azione della DNA girasi e della topoisomerasi IV, impedendo la sintesi del DNA (Rhodes and Schweizer, 2016). Vari studi su *Burkholderia* hanno identificato mutazioni puntiformi nel gene *gyrA*, responsabili di un aumento della concentrazione minima inibitoria (MIC) del farmaco fino a 64 volte (Pope et al., 2008; Tseng et al., 2014).

1.4.5 Acquisizione di Pathway Metabolici Alternativi

Alcuni antibiotici agiscono inibendo enzimi fondamentali per la sopravvivenza del batterio, causandone così la morte. È il caso del Trimethoprim, un antibiotico sintetico introdotto nella pratica clinica a partire dal 1962, che legandosi all'enzima diidrofolato-reduttasi (DHFR) ne impedisce l'attività essenziale per la vita della cellula (Roth et al., 1962). Il meccanismo di resistenza maggiormente osservato verso questo antibiotico è l'acquisizione di una variante plasmidica del gene *folA* che codifica una DHFR non sensibile al farmaco; questo è stato osservato soprattutto in batteri Gram-negativi a partire da un decennio dopo l'introduzione clinica del farmaco (Fleming, Datta and Grüneberg, 1972; Amyes and Towner, 1990; van Hoek *et al.*, 2011).

1.4.6 Overproduzione del Bersaglio dell'Antibiotico

Nei casi in cui un antibiotico agisce su un singolo bersaglio proteico la resistenza può essere ottenuta attraverso l'overespressione del gene codificante tale bersaglio, così che la concentrazione di

farmaco necessaria a produrre un effetto osservabile aumenti. Questo tipo di resistenza si presenta verso farmaci come Trimethoprim, Sulfamethoxazolo e Ciprofloxacina, che bersagliano rispettivamente la diidrofolato riduttasi, la diidrofolato sintasi e la DNA girasi (Palmer and Kishony, 2014).

1.4.7 Sequestro dell'Antibiotico

Molti batteri sono in grado di produrre proteine con struttura β -barrel, le lipocaline, che svolgono svariate funzioni tra cui il sequestro di antibiotici (Lee et al., 2020). La presenza di lipocaline è stata osservata in *Burkholderia cenocepacia* a seguito dell'esposizione a concentrazioni sub-letali di antibiotico (El-Halfawy et al., 2017).

1.4.8 Formazione di Biofilm

I batteri che aderiscono a tessuto danneggiato possono produrre una matrice glicosaccaridica che li isola dall'ambiente, portando a infezioni persistenti che resistono agli attacchi del sistema immunitario dell'ospite e ai trattamenti antibiotici. La protezione che la matrice offre alle cellule batteriche permette anche la ricorrenza delle infezioni nei casi in cui l'antibiotico sia efficace contro i batteri non incorporati nella matrice stessa (Stewart and William Costerton, 2001). All'interno della matrice la riduzione dei nutrienti comporta cambiamenti metabolici, che riducono la sensibilità agli antibiotici delle cellule batteriche; le modificazioni fenotipiche portano alla comparsa di cellule persistenti, ovvero cellule che non esprimono un preciso meccanismo di resistenza e la cui tolleranza ai farmaci non deriva da alterazioni a livello genetico (Scoffone et al., 2017).

1.5 Trasportatori RND

I trasportatori RND svolgono, nei batteri Gram-negativi, varie funzioni, sia fisiologiche che associate alla virulenza (Podnecky et al., 2015).

La classificazione filogenetica attualmente li distingue in nove classi diverse (Saier *et al.*, 2014), ma sulla base dei substrati trasportati si possono suddividere in due sottofamiglie: *hydrophobe/amphiphile efflux* (HAE) e *heavy metal efflux* (HME); la sottofamiglia HAE è quella con un ruolo maggiore nell'estruzione dei farmaci (Klenotic et al., 2020).

Nella maggioranza dei casi sono codificati da un operone e si presentano come un complesso proteico costituito da un trasportatore antiporto attivo protone/substrato localizzato sulla membrana interna (IMP), un canale ad accesso regolato sulla membrana esterna (OMP) che ha la

funzione di dotto di efflusso e un adattatore ancorato alla membrana interna (MFP) che accoppia le prime due componenti (Ruggerone et al., 2013) (Figura 4). Solitamente IMP, MFP e OMP sono in stechiometria 3:6:3, tuttavia sono stati osservati casi con stechiometria diversa (Symmons et al., 2009), oltre a trasportatori RND con struttura dimerica o monomerica (Klenotic et al., 2020).

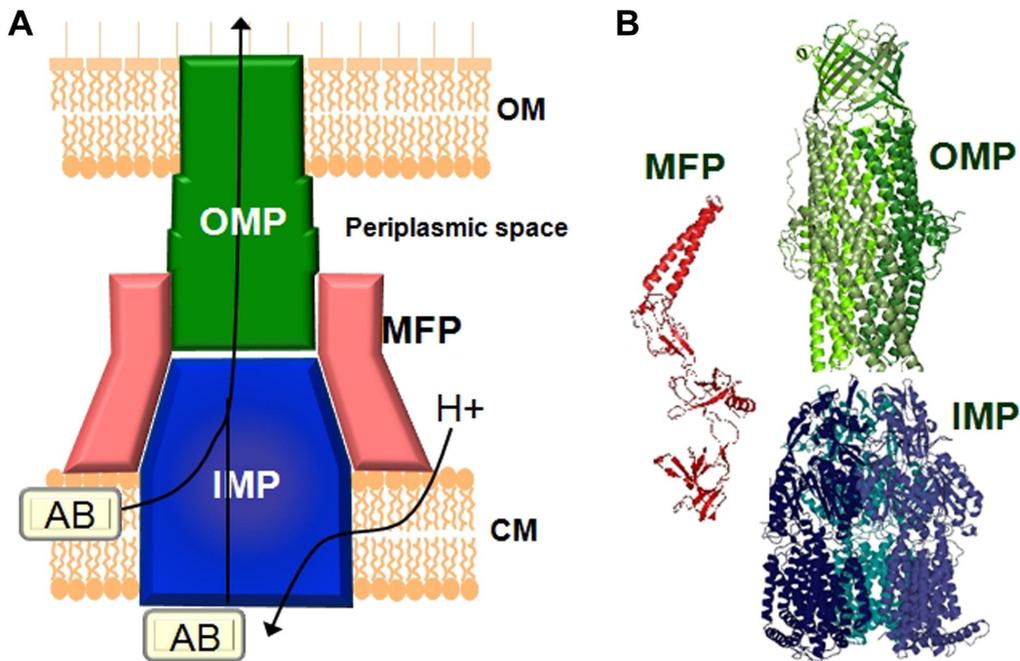


Figura 4 - Schema delle componenti di un trasportatore RND (Venter et al., 2015).

Le informazioni strutturali su questa famiglia di trasportatori sono principalmente dovute a studi sul complesso AcrAB-TolC di *E.coli*, che è stato sottoposto anche ad analisi di cristallizzazione (Murakami et al., 2002).

Nel genere *Burkholderia* sono stati descritti membri della superfamiglia di trasportatori RND solo per due specie: *B.cenocepacia* e *B.pseudomallei*. Il sequenziamento completo di *Burkholderia cenocepacia* J2315 ha portato all'identificazione di 16 ORF relativi a RND (Perrin et al., 2010). Attraverso analisi mutazionali su RND1, RND3 e RND4 è stato osservato che RND3 e RND4, ma non RND1, contribuiscono alla resistenza intrinseca del patogeno agli antibiotici (Buroni et al., 2009); un successivo studio con doppi mutanti RND4 e RND9 ha ulteriormente confermato il ruolo di RND4 in questo processo, mostrando che RND9 ha un contributo marginale (Bazzini et al., 2011). Questi studi hanno mostrato anche il ruolo svolto da RND3, RND8 e RND9 nella resistenza alla tobramicina delle cellule all'interno del biofilm e quello di RND3 e RND4, ma non RND8 e RND9, nella resistenza alla ciprofloxacina e alla tobramicina nelle popolazioni planctoniche (Bazzini et al., 2011; Buroni et al., 2014, 2009).

2 SCOPO DELLO STUDIO

Questo studio prevede, attraverso tecniche computazionali, la ricostruzione dell'organizzazione dei geni codificanti i sistemi di efflusso (RND 1-16) nel genere *Burkholderia* e la comparazione dei profili di espressione di tali geni per quegli organismi del genere *Burkholderia* di cui sono disponibili dati provenienti da esperimenti di trascrittomici, allo scopo di identificare eventuali pattern di co- o anti-espressione. L'obiettivo di queste analisi è l'acquisizione di informazioni utili a studi futuri volti allo sviluppo di terapie antibiotiche più efficaci contro le infezioni da *Burkholderia*.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Whole Genome Phylogeny

Software e tool utilizzati:

- **EMBOSS**

È un pacchetto di software *open source* disponibile sia con interfaccia grafica (GUI) che su linea di comando e contiene un'ampia varietà di applicazioni che permettono la gestione e l'analisi di sequenze nucleotidiche e amminoacidiche (Rice et al., 2000).

- **FetchMG**

È un programma sviluppato per sistemi UNIX, disponibile sia come pacchetto *stand-alone* che come parte della *pipeline* MOCAT (Kultima et al., 2012; Sunagawa et al., 2013). A partire da un set di genomi in formato FASTA permette, utilizzando modelli di Markov nascosti (*Hidden Markov Models*, HMM), di estrarre 40 geni marker (MG) universali, presenti in singola copia nella maggioranza degli organismi (Ciccarelli et al., 2006).

- **ClustalOmega**

È un pacchetto ampiamente utilizzato per effettuare allineamenti multipli di sequenze (MSA) su linea di comando (Sievers *et al.*, 2011; Sievers and Higgins, 2018, 2020).

- **BioPython**

È una serie di strumenti scritti in linguaggio Python finalizzati allo sviluppo di *libraries* e *applications* per l'analisi di dati in ambito bioinformatico (Cock et al., 2009). Contiene un'ampia gamma di *utilities*, tra cui AlignIO: un modulo specifico per la gestione di file contenenti allineamenti singoli o multipli di sequenze.

- **TrimAl**

È uno strumento disponibile su linea di comando che consente il *trimming*, ovvero la rimozione delle regioni meno affidabili di un MSA. È specifico per analisi di tipo filogenetico su larga scala e prende in considerazione vari parametri, come la proporzione di sequenze presentanti *gap* e il livello di similarità degli aminoacidi (Capella-Gutiérrez et al., 2009).

- **FastTree**

È uno strumento disponibile su riga di comando in grado di inferire l'albero filogenetico di massima verosimiglianza (*maximum likelihood*) a partire da allineamenti di sequenze nucleotidiche o proteiche (Price et al., 2010).

Dai database GenBank e RefSeq di NCBI (NCBI Resource Coordinators, 2018) sono stati scaricati i genomi completi, in formato FASTA, di 93 organismi appartenenti al genere *Burkholderia*. Allo scopo di fornire alle analisi successive delle informazioni filogenetiche non ricavate unicamente da una sequenza conservata, come l'RNA 16S, è stato adottato il protocollo di *Whole Genome Phylogeny* descritto in Vandamme et al., 2017.

Inizialmente le sequenze nucleotidiche presenti nei genomi sono state tradotte utilizzando l'applicazione Transeq del pacchetto EMBOSS. Dai file FASTA nucleotidici e amminoacidici, attraverso il *tool* FetchMG, sono stati ricavati 38 geni marker condivisi da tutti i 93 organismi; in questo step è stato usato il *flag -v*, che consente di ottenere solo le *best hit*, ovvero i geni di ogni genoma con più alta similarità ai 38 geni marker considerati. Per ognuno dei 38 MG le *best hit* di ogni organismo sono state allineate utilizzando ClustalOmega. I 38 file di MSA sono stati concatenati utilizzando la *utility* AlignIO di BioPython, così da ottenere un singolo multiallineamento in cui fossero presenti, sempre nello stesso ordine, tutti i 38 geni marker. Il multiallineamento è stato sottoposto a *trimming* con TrimAl, in modo da rimuovere le regioni ricche di *gap* (*cutoff* 10%) e quelle non correttamente allineate, quindi con il file ottenuto è stato costruito un albero filogenetico attraverso FastTree, utilizzando il modello GTR CAT.

3.2 Generazione Cluster

Software e tool utilizzati

- **GCluster**

È una *stand-alone application* scritta in linguaggio Perl che consente di visualizzare e comparare i contesti genomici di vari organismi. Richiede come input una lista di genomi in formato *genbank* (file .gbff) e una lista di *locus tag* di geni di interesse, uno per genoma. Questa lista può essere ottenuta a partire dalla sequenza di interesse, in formato FASTA, presente in un singolo organismo attraverso il sottoprogramma *interested_gene_generation*; quest'ultimo effettua un BLAST su tutti i genomi forniti al programma e produce la lista delle *best hit* relative a quella sequenza in ogni genoma. GCluster consente anche di associare al risultato delle informazioni filogenetiche, ad esempio sotto forma di file Newick, oltre che impostare la quantità di geni a monte e a valle che devono essere visualizzati (Li et al., 2020).

Dai database di NCBI sono stati scaricati i genomi dei 93 organismi in formato GenBank (file .gbff), che contiene una quantità maggiore di informazioni rispetto al formato FASTA dei genomi precedentemente scaricati. La sequenza in formato FASTA di una pompa RND presente in *Burkholderia cenocepacia* J2315 è stata fornita come input al sottoprogramma *interested_gene_generation* così da ottenere la lista dei *locus tag* dei geni codificanti la stessa pompa RND in ogni organismo, se presenti. Tale lista, insieme ai genomi in formato GenBank, è stata processata da GCluster per generare una figura rappresentante l'intorno genomico compreso tra il quinto gene a monte e il quinto gene a valle del gene RND in ogni organismo. In questo passaggio è stato utilizzato il *flag*-tree, così da aggiungere all'immagine risultante le informazioni filogenetiche ricavate dall'esperimento di *whole genome phylogeny*.

Lo stesso processo è stato effettuato 16 volte, una per ogni pompa RND osservata in *Burkholderia cenocepacia* J2315.

3.3 Analisi di Espressione

Software e tool utilizzati

- **R e RStudio**

R è un linguaggio di programmazione utilizzato principalmente per analisi statistiche e costruzione di grafici (R core team, 2020). Il software RStudio offre un ambiente di sviluppo che implementa tale linguaggio di programmazione (RStudio team, 2020).

Per le analisi successive lo studio si è focalizzato su un numero minore di genomi, in quanto sono stati utilizzati dei dati di espressione, precedentemente raccolti in laboratorio da studi pubblicati e disponibili in banche dati pubbliche, relativi a sette organismi del genere *Burkholderia*: *B.cenocepacia* J2315, *B.cenocepacia* H111, *B.cenocepacia* K56-2, *B.gladioli* BSR3, *B.glumae* BGR1, *B.pseudomallei* K96243, *B.thailandensis* E264. In questi dati, per ogni organismo erano riportati valori di espressione dell'intero genoma ottenuti in diversi esperimenti, ognuno presentante varie condizioni sperimentali o replicati biologici. L'espressione di ogni gene era fornita in TPM (*Transcript Per Million*), una misura di abbondanza relativa ottenuta normalizzando la conta di ogni *read* sia sulla lunghezza del trascritto che sul milione di *reads* mappate.

Inoltre, le analisi finali si sono focalizzate in modo particolare su due pompe RND, ovvero RND3 e RND4, in quanto hanno un'alta rilevanza nella resistenza intrinseca agli antibiotici (Buroni et al., 2009).

Dai dati ottenuti con GCluster relativi ai sette genomi considerati, sono stati identificati i *locus tag* dei geni appartenenti all'intorno genomico di RND3 e RND4; sono state così ottenute 12 liste: cinque relative ad ogni organismo presentante il gene RND3 e sette a quelli presentanti il gene RND4. In ogni lista sono stati elencati 11 *locus tag*: quello del gene RND preso in considerazione, quelli dei 5 geni a monte e quelli dei 5 geni a valle. Tali *locus tag* sono stati ricercati all'interno dei file di espressione di ogni organismo e sono state costruite delle tabelle riportanti, per ogni gene, le misure di TPM nelle diverse condizioni analizzate. Questi dati sono stati normalizzati su RStudio, quindi sono state costruite delle *heatmap* per valutare la correlazione dell'espressione genica in ogni organismo.

4 RISULTATI

4.1 Generazione Cluster

L'applicazione del protocollo di *whole genome phylogeny* ha portato alla costruzione di un albero filogenetico contenente i 93 organismi inizialmente analizzati. Attraverso GCluster a tale albero filogenetico sono stati aggiunti, per ogni organismo, gli intornoi genomici di ogni gene RND (Figura 5). Nei 93 genomi iniziali è stata riscontrata una presenza variabile dei 16 geni RND. Gli unici due tipi di trasportatori presenti nella totalità dei genomi analizzati sono RND4 e RND13.

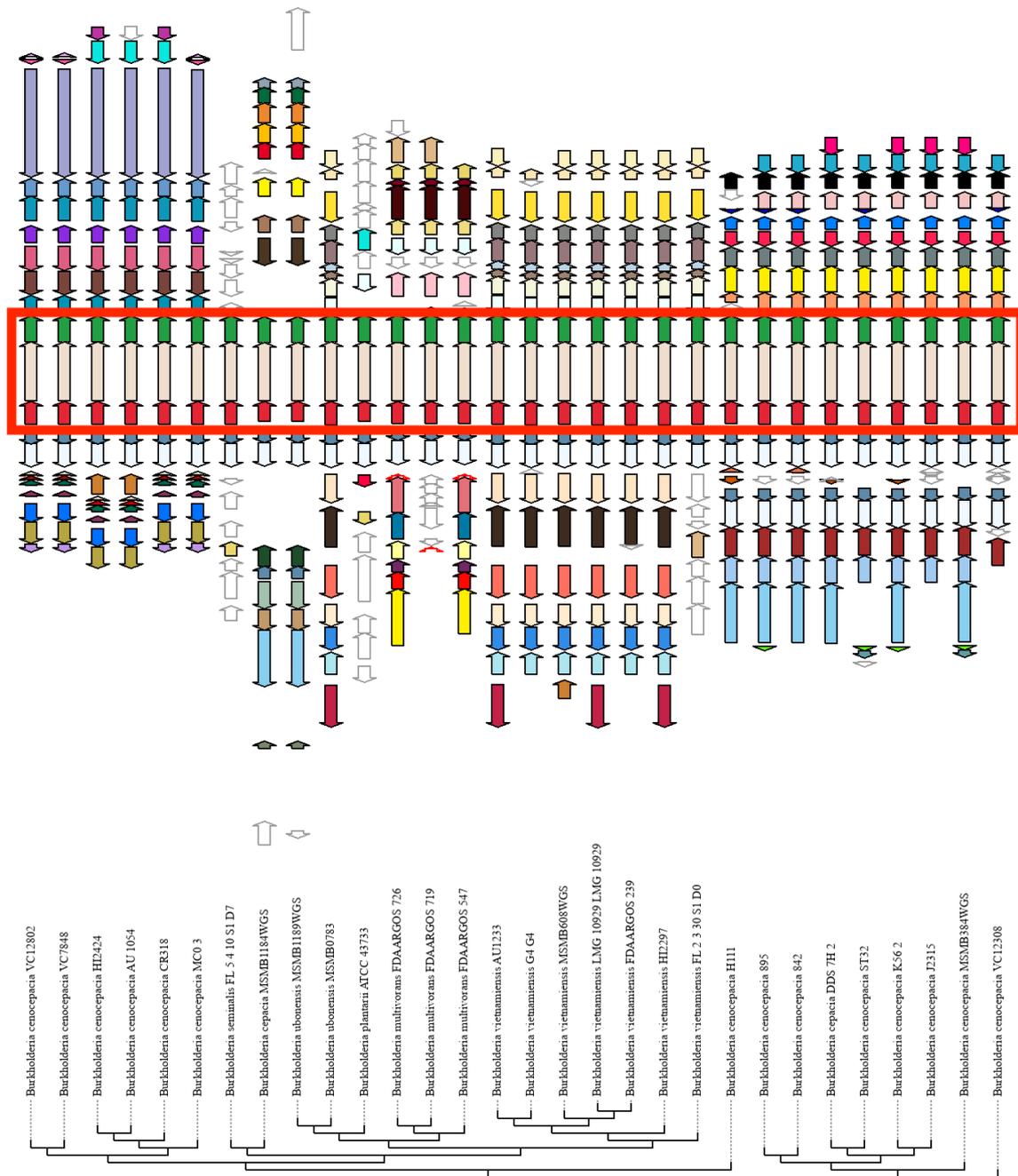


Figura 5 - Intorno genomico del gene RND1 nei 30 organismi analizzati che lo presentano. In rosso è evidenziato l'operone RND di ogni organismo. I geni rappresentati con lo stesso colore sono omologhi, mentre quelli rappresentati in bianco non hanno omologia con nessuno degli altri geni in figura.

Anche nei sette genomi considerati nell'analisi di espressione non si è osservata una presenza complessiva di tutti i 16 geni RND. In particolare, prendendo in considerazione i due geni analizzati, è stata osservata la presenza di RND3 in cinque genomi su sette e di RND4 in tutti e sette i genomi. Nelle figure costruite con GCluster analizzando l'intorno genomico di RND3 e RND4 (Figura 6) si evidenziano gli operoni RND e la loro generale omologia; si osserva inoltre la variabilità dei geni immediatamente a monte e a valle degli operoni, che sono omologhi solamente in alcuni sottogruppi dei genomi analizzati.

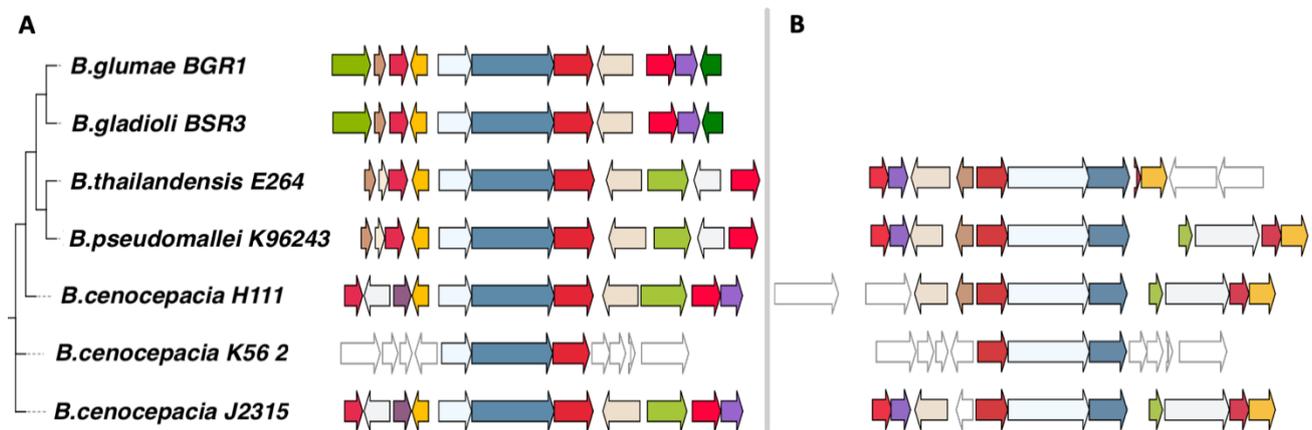


Figura 6 - A: Intorno genomico del gene RND4 nei 7 organismi analizzati; B: Intorno genomico del gene RND3 presente in 5 dei 7 organismi analizzati. In ogni figura i geni rappresentati con lo stesso colore sono omologhi, mentre quelli rappresentati in bianco non hanno omologia con nessuno degli altri geni nella stessa figura.

4.2 Analisi di Espressione

Per costruire le *heatmap* sono state calcolate le matrici di correlazione sulla base dell'indice di Pearson, che assegna ad ogni coppia di geni un valore compreso tra 1, corrispondente alla massima correlazione positiva, e -1, che indica la massima anti-correlazione; le matrici sono state quindi ordinate sulla base dei cluster di correlazione.

Dei sette organismi di cui erano disponibili dati di espressione, solo tre hanno prodotto una quantità soddisfacente di risultati: *B.cenocepacia* J2315, *B.cenocepacia* H111 e *B.thailandensis* E264.

4.2.1 Operone RND3

In *Burkholderia cenocepacia* J2315 si osserva un alto livello di correlazione nell'espressione di quasi tutti i geni compresi nell'intorno genomico dell'operone RND3, con pochi valori vicini allo zero o negativi. L'operone RND3, composto da *amrA*, *amrB* e BCAL1676, è maggiormente coespresso con i geni BCAL1669 e BCAL1670, codificanti proteine di membrana dalla funzione putativa di trasporto di aminoacidi e con il gene BCAL1671, codificante una metallo-peptidasi della sottofamiglia M23B. Il cluster di correlazione localizzato centralmente nella *heatmap* mostra i geni da *fimA*;BCAL1677 a

BCAL1680, organizzati in un operone responsabile della produzione delle fimbrie che consentono al batterio di ancorarsi a vari substrati, ad esempio le cellule dell'organismo ospite. Il gene BCAL1672, codificante il regolatore trascrizionale dell'operone RND3, presenta indici positivi con i geni dell'operone stesso e negativi con i geni dell'operone *fimA*, oltre che con BCAL1671 (Figura 7).

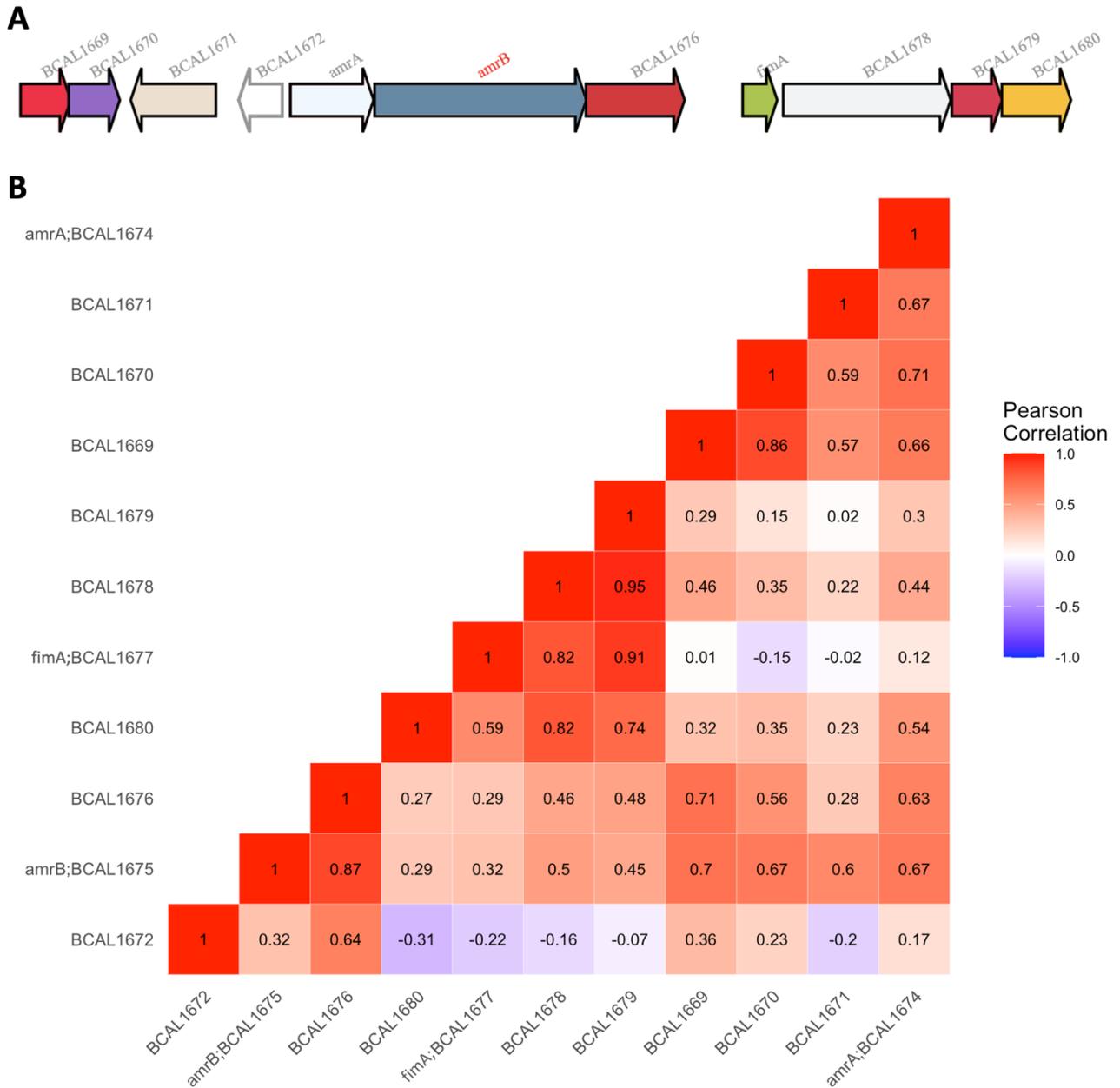


Figura 7 - A: intorno genomico del gene RND3 in *Burkholderia cenocepacia* J2315; B: heatmap di correlazione tra i geni del cluster.

In *Burkholderia cenocepacia* H111 si osservano due cluster di correlazione. Il primo comprende i geni dell'operone RND3 (*amrA*, *amrB* e I35_1587), insieme a I35_1583, una endopeptidasi della parete cellulare; il secondo comprende i geni I35_1581, I35_1582 e i geni da *fimA*;I35_1588 a I35_1591, responsabili della produzione delle fimbrie. I geni dell'operone RND3 sono moderatamente coespressi anche con il loro regolatore trascrizionale: il gene *amrR*. Tra i geni

appartenenti a cluster di correlazione diversi si osservano valori negativi dell'indice di Pearson, escluse le coppie contenenti il gene I35_1583; questo indica che nella maggioranza dei casi una coppia di geni appartenenti a cluster diversi è anti-espressa (Figura 8).

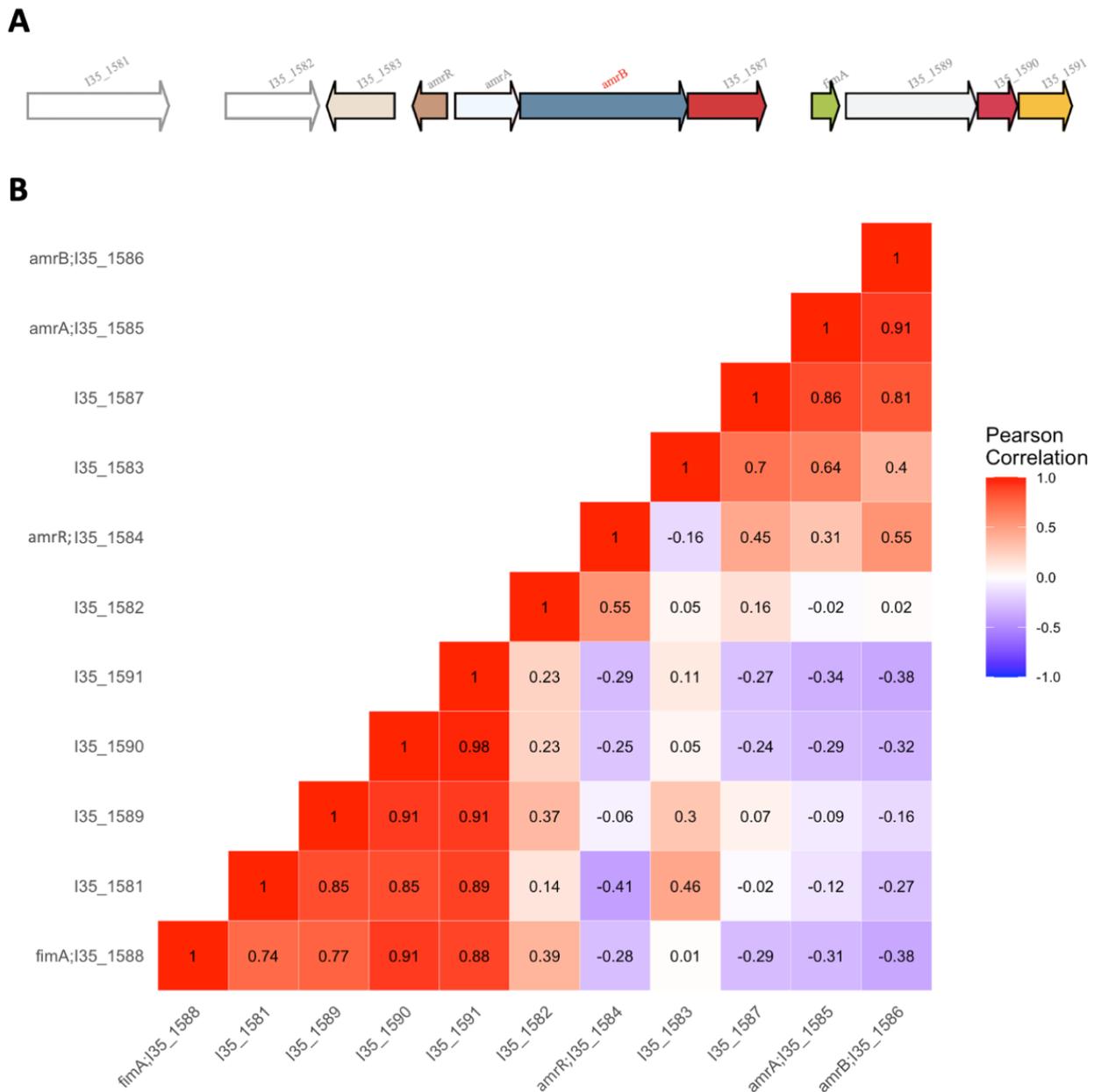


Figura 8 - A: intorno genomico del gene RND3 in *Burkholderia cenocepacia* H111; B: heatmap di correlazione tra i geni del cluster.

In *Burkholderia thailandensis* E264 si osserva prevalentemente un cluster di correlazione composto dall'operone RND3 (geni *amrA*, *amrB* e BTH_I2443) e dai geni *amrR*;BTH_I2446 e BTH_I2439. Il primo di questi codifica il regolatore trascrizionale dell'operone RND, il secondo codifica una proteina della famiglia delle asparagina-sintasi. Non si osservano condizioni di elevata anti-espressione ad eccezione della coppia di geni BTH_I2448 e BTH_I2441, che presenta un indice di

Pearson di -0,33. Si nota anche una moderata coespressione dei geni *amrB* e BTH_I2443 dell'operone RND con il gene BTH_I2440, codificante una proteina putativa con funzione di trasportatore ABC (Figura 9).

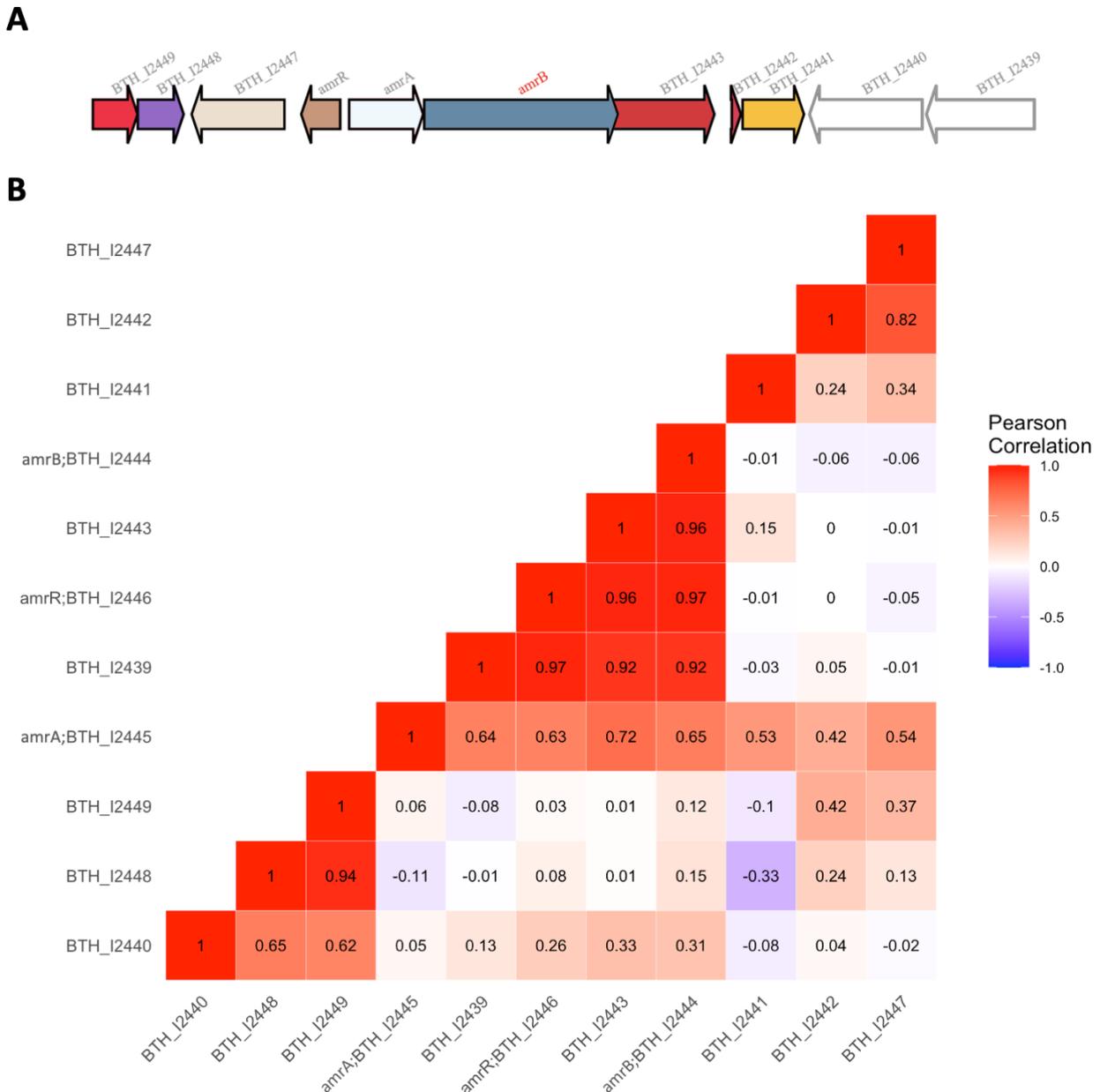


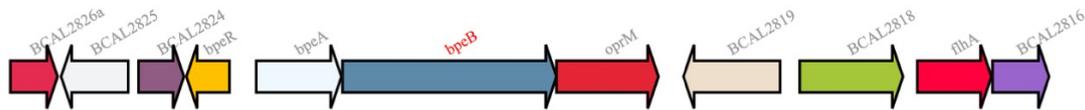
Figura 9 - A: intorno genomico del gene RND3 in *Burkholderia thailandensis* E264; B: heatmap di correlazione tra i geni del cluster.

4.2.2 Operone RND4

In *Burkholderia cenocepacia* J2315 si osservano due distinti cluster di correlazione, uno contenente i geni dell'operone RND4 (*bpeA*, *bpeB* e *oprM*) insieme ai geni BCAL2816 e *flhA*, l'altro contenente i geni *bpeR*, BCAL2824, BCAL2825, BCAL2819 e BCAL2826a. I geni coespressi con l'operone RND codificano rispettivamente una S-formil-glutazione idrolasi e una S-idrossimetil-glutazione

deidrogenasi, enzimi coinvolti nella risposta allo stress da formaldeide nei batteri (Chen et al., 2016). Il gene regolatore dell'operone RND, *bpeR*, è coespresso con il gene *bpeA*, ma anti-espresso con i geni *bpeB* e *oprM* (Figura 10).

A



B

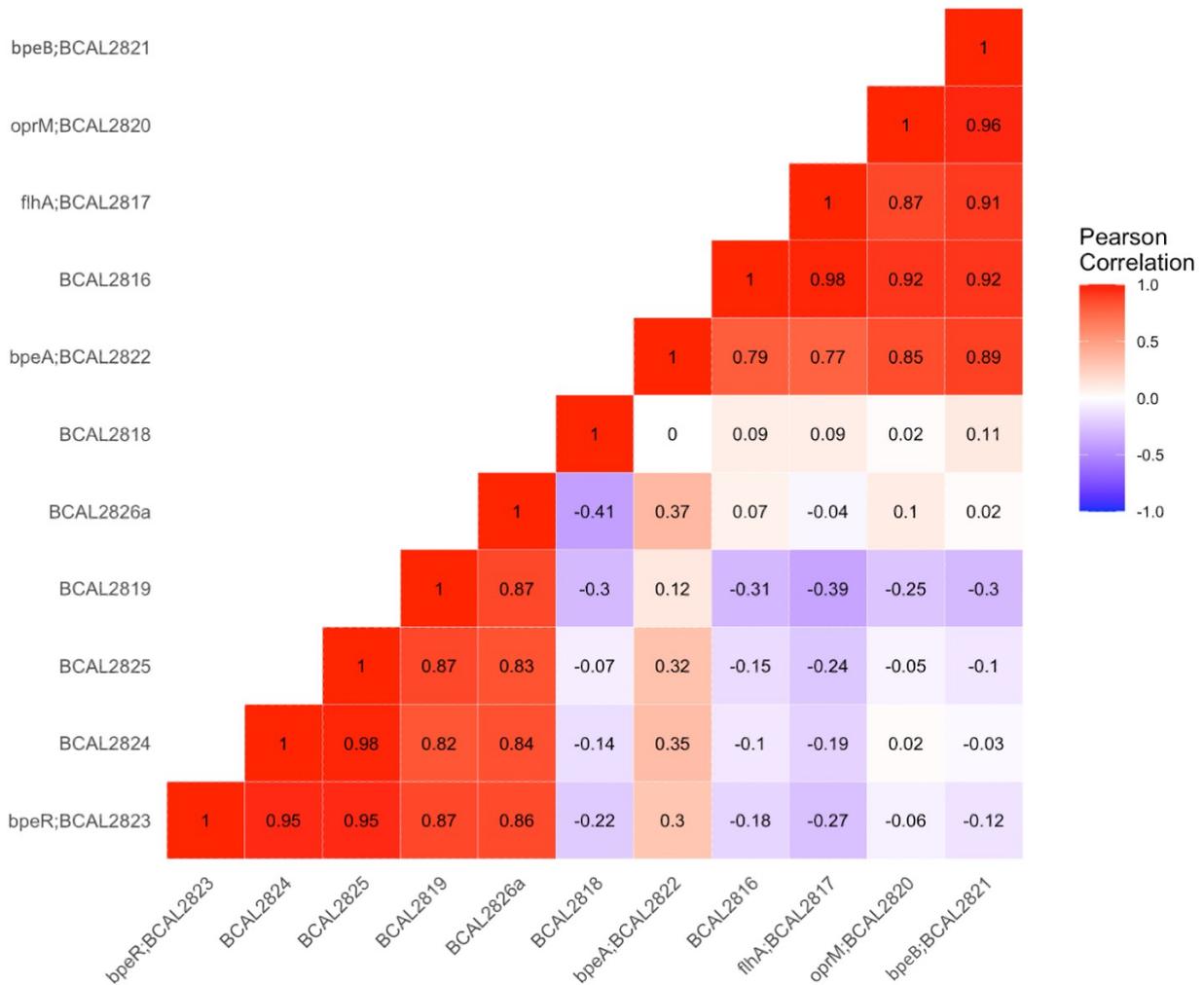


Figura 10 - A: intorno genomico del gene RND4 in *Burkholderia cenocepacia* J2315; B: heatmap di correlazione tra i geni del cluster.

In *Burkholderia cenocepacia* H111 si osserva un unico cluster di coespressione, formato dall'operone RND4 (geni *bpeA*, *bpeB* e *oprM*) e dai geni I35_2673, *flhA*;I35_2674, I35_2675 e I35_2682. I primi due codificano la S-formil-glutazione idrolasi e la S-idrossimetil-glutazione deidrogenasi, come osservato in *B.cenocepacia* J2315, gli altri codificano rispettivamente una xilulosio chinasi e un regolatore trascrizionale di tipo AraC con un dominio HTH di legame al DNA.

L'operone RND è fortemente anti-espresso con il gene I35_2676, codificante un trasportatore xantina/uracile e marginalmente anti-espresso con il proprio regolatore *bpeR* (Figura 11).

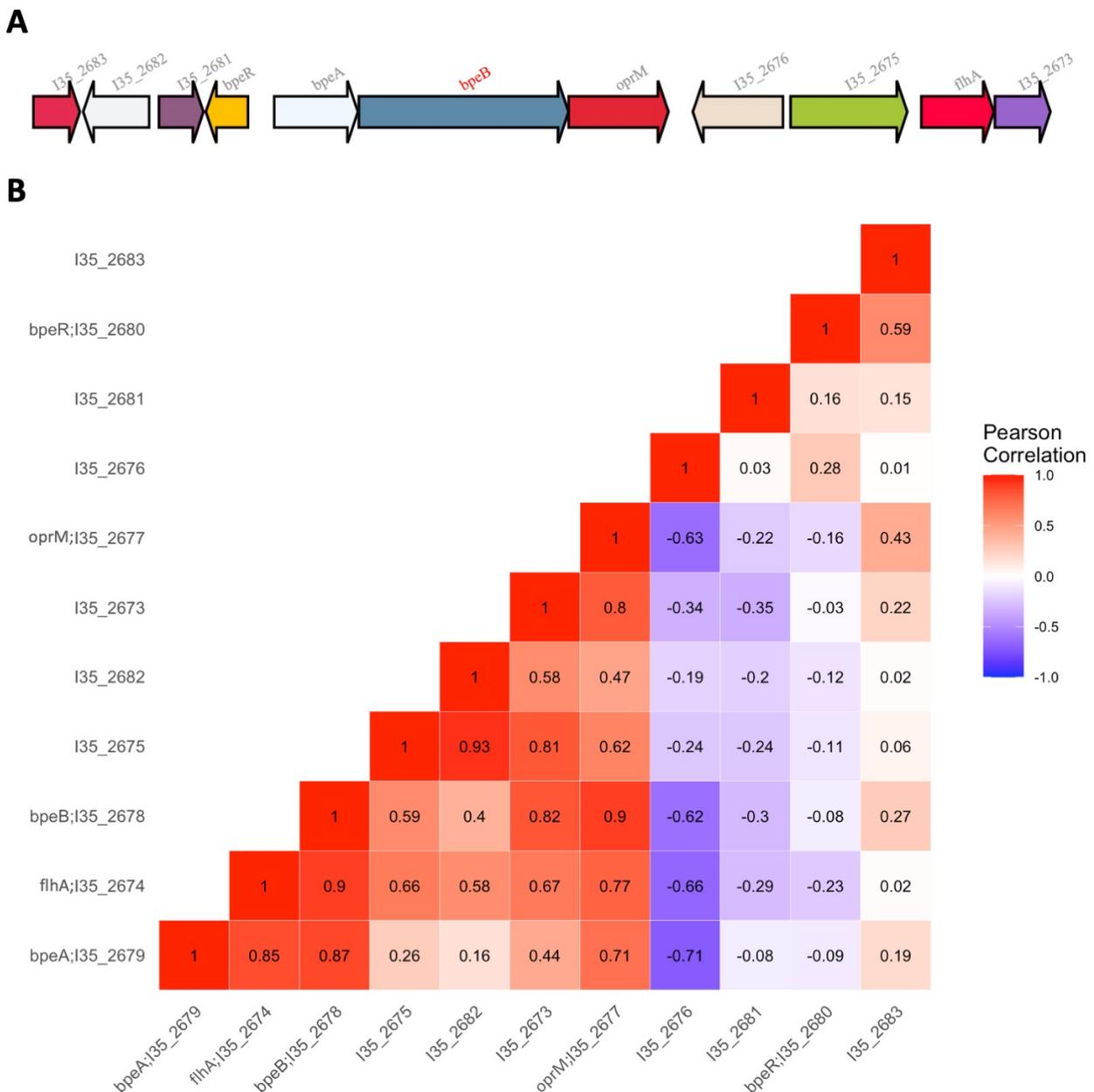
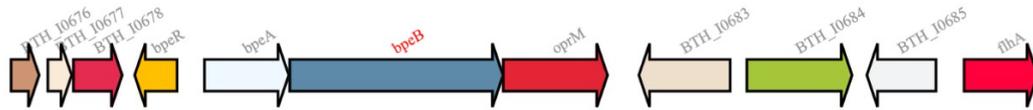


Figura 11 - A: intorno genomico del gene RND4 in *Burkholderia cenocepacia* H111; B: heatmap di correlazione tra i geni del cluster.

In *Burkholderia thailandensis* E264 si osservano tre piccoli cluster di correlazione. In questo caso i geni dell'operone RND4 (*bpeA*, *bpeB* e *oprM*) non sono all'interno dello stesso cluster, ma hanno profili di espressione che variano dalla non correlazione ad una moderata correlazione negativa. Anche il regolatore dell'operone, *bpeR*, non osserva lo stesso tipo di co- o anti-espressione con i geni dell'operone, mostrando un valore molto positivo per *oprM*, un valore vicino allo zero per *bpeB* e un valore negativo per *bpeA*. Il regolatore *bpeR* e il gene *oprM* sono fortemente coespressi con il

gene *flhA* precedentemente menzionato, codificante la S-idrossimetil-glutazione deidrogenasi (Figura 12).

A



B

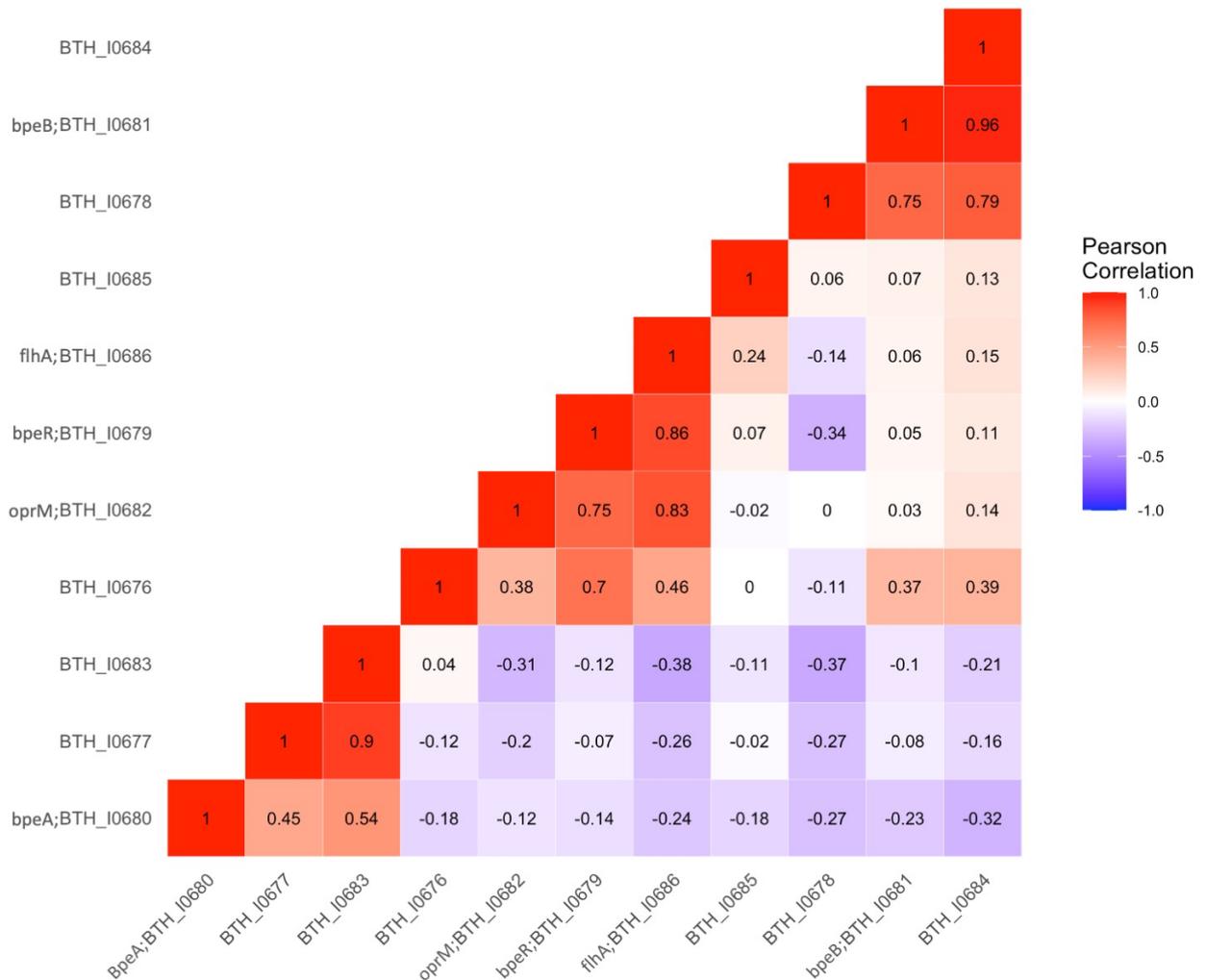


Figura 12 - A: intorno genomico del gene *RND4* in *Burkholderia thalandensis* E264; B: heatmap di correlazione tra i geni del cluster.

2 DISCUSSIONE

In questo studio, attraverso metodi computazionali, sono stati analizzati gli intorni genomici di 16 operoni RND in 93 ceppi appartenenti al genere *Burkholderia*. Dalle analisi si osserva una complessiva omologia dei tre geni appartenenti all'operone RND in tutti gli organismi considerati, oltre a livelli variabili di conservazione dei geni posizionati a monte e a valle dell'operone.

Le analisi si sono successivamente focalizzate sui profili di espressione dei geni appartenenti a tali intorni genomici, concentrandosi sui trasportatori RND3 e RND4 in tre organismi: *B.cenocepacia* J2315, *B.cenocepacia* H111 e *B.thailandensis* E264.

I tre geni appartenenti all'operone RND3 sono coespressi in tutti e tre gli organismi, mentre quelli dell'operone RND4 sono coespressi in *B.cenocepacia* J2315 e *B.cenocepacia* H111, ma non in *B.thailandensis* E264. Nel caso di RND3 il gene *amrR*, codificante il regolatore dell'operone RND, è coespresso con l'operone stesso, indicando una *simple regulation* di tipo positivo sulla trascrizione dei geni codificanti il trasportatore. Il regolatore di RND4, codificato dal gene *bpeR*, è coespresso con *bpeA* in *B. cenocepacia* J2315 e con *oprM* in *B. thailandensis* E264, mentre risulta anti-espresso o non correlato con tutti gli altri geni degli operoni; questo indica una regolazione più complessa a carico di questi geni, che non può essere identificata con un *pattern* di repressione o attivazione semplice.

In *B.cenocepacia* J2315 si osserva la coespressione dell'operone RND3 e di un secondo set di geni responsabili della produzione di fimbrie, strutture coinvolte nell'adesione del batterio alle cellule epiteliali umane durante le infezioni; al contrario, in *B.cenocepacia* H111 tali geni sono anti-espressi con l'operone RND3. Tali correlazioni potrebbero essere di interesse nello studio della risposta di questi organismi, in termini di adesione o distacco dalle cellule, al trattamento antibiotico.

In tutti e tre gli organismi analizzati si osserva una correlazione positiva tra l'espressione dell'operone RND4 e quella di geni coinvolti nella resistenza alla formaldeide; quest'ultima può entrare in contatto con il batterio a partire da varie fonti, tra cui l'utilizzo di prodotti sterilizzanti, oppure essere presente nel torrente circolatorio di un individuo infetto. La coespressione di questi geni potrebbe risultare significativa per ulteriori analisi sulla persistenza delle infezioni da *Burkholderia*.

Lo studio, valutando questi aspetti, offre uno spunto per l'approfondimento delle caratteristiche che regolano i meccanismi di resistenza di questo clade batterico agli antibiotici attraverso le pompe di efflusso.

6 BIBLIOGRAFIA

- Akova, M., 2016.** Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence* 7, 252–266. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1159366>
- Amyes, S.G.B., Towner, K.J.Y. 1990,** n.d. Trimethoprim resistance; epidemiology and molecular aspects. *J. Med. Microbiol.* 31, 1–1. <https://doi.org/10.1099/00222615-31-1-1>
- Antimicrobial resistance** [WWW Document], URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (accessed 4.6.21).
- Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Drevinek, P., Vandamme, P., Govan, J.R., Waine, D.J., LiPuma, J.J., Chiarini, L., Dalmastrri, C., Henry, D.A., Speert, D.P., Honeybourne, D., Maiden, M.C.J., Dowson, C.G., 2007.** Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 458–461. <https://doi.org/10.3201/eid1303.060403>
- Baldwin, A., Sokol, P.A., Parkhill, J., Mahenthiralingam, E., 2004.** The *Burkholderia cepacia* Epidemic Strain Marker Is Part of a Novel Genomic Island Encoding Both Virulence and Metabolism-Associated Genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect. Immun.* 72, 1537–1547. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1537-1547.2004>
- Bartlett, J.G., Gilbert, D.N., Spellberg, B., 2013.** Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 56, 1445–1450. <https://doi.org/10.1093/cid/cit070>
- Bazzini, S., Udine, C., Sass, A., Pasca, M.R., Longo, F., Emiliani, G., Fondi, M., Perrin, E., Decorosi, F., Viti, C., Giovannetti, L., Leoni, L., Fani, R., Riccardi, G., Mahenthiralingam, E., Buroni, S., 2011.** Deciphering the Role of RND Efflux Transporters in *Burkholderia cenocepacia*. *PLOS ONE* 6, e18902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018902>
- Boto, L., Martínez, J.L., 2011.** Ecological and Temporal Constraints in the Evolution of Bacterial Genomes. *Genes* 2, 804–828. <https://doi.org/10.3390/genes2040804>
- Buroni, S., Matthijs, N., Spadaro, F., Acker, H.V., Scoffone, V.C., Pasca, M.R., Riccardi, G., Coenye, T., 2014.** Differential Roles of RND Efflux Pumps in Antimicrobial Drug Resistance of Sessile and Planktonic *Burkholderia cenocepacia* Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7424–7429. <https://doi.org/10.1128/AAC.03800-14>
- Buroni, S., Pasca, M.R., Flannagan, R.S., Bazzini, S., Milano, A., Bertani, I., Venturi, V., Valvano, M.A., Riccardi, G., 2009.** Assessment of three Resistance-Nodulation-Cell Division drug efflux transporters of *Burkholderia cenocepacia* in intrinsic antibiotic resistance. *BMC Microbiol.* 9, 200. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-200>
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J.M., Gabaldón, T., 2009.** trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25, 1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- Caroff, M., Karibian, D., 2003.** Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res., Bacterial Antigens and Vaccines* 338, 2431–2447. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.07.010>
- Chen, N.H., Djoko, K.Y., Veyrier, F.J., McEwan, A.G., 2016.** Formaldehyde Stress Responses in Bacterial Pathogens. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.0>
- Chiarini, L., Bevivino, A., Dalmastrri, C., Tabacchioni, S., Visca, P., 2006.** *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends Microbiol.* 14, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.04.006>

Cassini, A., Högberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D.A., Oliveira, T.C., Struelens, M.J., Suetens, C., Monnet, D.L., Strauss, R., Mertens, K., Struyf, T., Catry, B., Latour, K., Ivanov, I.N., Dobрева, E.G., Tambic Andrašević, A., Soprek, S., Budimir, A., Paphitou, N., Žemlicková, H., Schytte Olsen, S., Wolff Sönksen, U., Märtin, P., Ivanova, M., Lyytikäinen, O., Jalava, J., Coignard, B., Eckmanns, T., Abu Sin, M., Haller, S., Daikos, G.L., Gikas, A., Tsiodras, S., Kontopidou, F., Tóth, Á., Hajdu, Á., Guólaugsson, Ó., Kristinsson, K.G., Murchan, S., Burns, K., Pezzotti, P., Gagliotti, C., Dumpis, U., Liuimiene, A., Perrin, M., Borg, M.A., de Greeff, S.C., Monen, J.C., Koek, M.B., Elstrøm, P., Zabicka, D., Deptula, A., Hryniewicz, W., Caniça, M., Nogueira, P.J., Fernandes, P.A., Manageiro, V., Popescu, G.A., Serban, R.I., Schréterová, E., Litvová, S., Štefkovicová, M., Kolman, J., Klavs, I., Korošec, A., Aracil, B., Asensio, A., Pérez-Vázquez, M., Billström, H., Larsson, S., Reilly, J.S., Johnson, A., Hopkins, S., 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* 19, 56–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)

Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Mering, C. von, Creevey, C.J., Snel, B., Bork, P., 2006. Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life. *Science* 311, 1283–1287. <https://doi.org/10.1126/science.1123061>

Cock, P.J.A., Antao, T., Chang, J.T., Chapman, B.A., Cox, C.J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., de Hoon, M.J.L., 2009. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics* 25, 1422–1423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>

Cooper, V.S., Vohr, S.H., Wrocklage, S.C., Hatcher, P.J., 2010. Why Genes Evolve Faster on Secondary Chromosomes in Bacteria. *PLOS Comput. Biol.* 6, e1000732. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000732>

Cox, G., Wright, G.D., 2013. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol., Special Issue Antibiotic Resistance* 303, 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>

Dandavate, V., Jinjala, J., Keharia, H., Madamwar, D., 2009. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresour. Technol.* 100, 3374–3381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.011>

Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 74, 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>

Drawz, S.M., Bonomo, R.A., 2010. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 160–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>

El-Halfawy, O.M., Klett, J., Ingram, R.J., Loutet, S.A., Murphy, M.E.P., Martín-Santamaría, S., Valvano, M.A., 2017. Antibiotic Capture by Bacterial Lipocalins Uncovers an Extracellular Mechanism of Intrinsic Antibiotic Resistance. <https://doi.org/10.1128/mBio.00225-17>

Ernst, R.K., Yi, E.C., Guo, L., Lim, K.B., Burns, J.L., Hackett, M., Miller, S.I., 1999. Specific Lipopolysaccharide Found in Cystic Fibrosis Airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 286, 1561–1565. <https://doi.org/10.1126/science.286.5444.1561>

Everaert, A., Coenye, T., 2016. Effect of β -Lactamase inhibitors on in vitro activity of β -Lactam antibiotics against *Burkholderia cepacia* complex species. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 5, 44. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0142-3>

Fleming, M.P., Datta, N., Grüneberg, R.N., 1972. Trimethoprim Resistance determined by R Factors. *Br Med J* 1, 726–728. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5802.726>

- Garcia, B.A., Carden, J.L., Goodwin, D.L., Smith, T.A., Gaggar, A., Leon, K., Antony, V.B., Rowe, S.M., Solomon, G.M., 2018.** Implementation of a successful eradication protocol for *Burkholderia Cepacia* complex in cystic fibrosis patients. *BMC Pulm. Med.* 18, 35. <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0594-8>
- Geftic, S.G., Heymann, H., Adair, F.W., 1979.** Fourteen-year survival of *Pseudomonas cepacia* in a salts solution preserved with benzalkonium chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 505–510.
- Gilbert, P., Das, J., Foley, I., 1997.** Biofilm Susceptibility to Antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11, 160–167. <https://doi.org/10.1177/08959374970110010701>
- Govan, J.R., Brown, P.H., Maddison, J., Doherty, C.J., Nelson, J.W., Dodd, M., Greening, A.P., Webb, A.K., 1993.** Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* 342, 15-9. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91881-l](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91881-l)
- Govan, J.R., Deretic, V., 1996.** Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60, 539–574.
- Graham, J.P., Evans, S.L., Price, L.B., Silbergeld, E.K., 2009.** Fate of antimicrobial-resistant enterococci and staphylococci and resistance determinants in stored poultry litter. *Environ. Res.* 109, 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.05.005>
- Gumulya, Y., Boxall, N.J., Khaleque, H.N., Santala, V., Carlson, R.P., Kaksonen, A.H., 2018.** In a Quest for Engineering Acidophiles for Biomining Applications: Challenges and Opportunities. *Genes* 9. <https://doi.org/10.3390/genes9020116>
- Hwang, J., Kim, H.S., 2015.** Cell Wall Recycling-Linked Coregulation of AmpC and PenB β -Lactamases through ampD Mutations in *Burkholderia cenocepacia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7602–7610. <https://doi.org/10.1128/AAC.01068-15>
- Kitt, H., Lenney, W., Gilchrist, F.J., 2016.** Two case reports of the successful eradication of new isolates of *Burkholderia cepacia* complex in children with cystic fibrosis. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 17, 14. <https://doi.org/10.1186/s40360-016-0054-0>
- Klenotic, P.A., Moseng, M.A., Morgan, C.E., Yu, E.W., 2020.** Structural and Functional Diversity of Resistance–Nodulation–Cell Division Transporters. *Chem. Rev.* <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00621>
- Kultima, J.R., Sunagawa, S., Li, J., Chen, W., Chen, H., Mende, D.R., Arumugam, M., Pan, Q., Liu, B., Qin, J., Wang, J., Bork, P., 2012.** MOCAT: A Metagenomics Assembly and Gene Prediction Toolkit. *PLOS ONE* 7, e47656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047656>
- Lee, C., Kim, M.I., Park, J., Kim, J., Oh, H., Cho, Y., Son, J., Jeon, B.-Y., Ka, H., Hong, M., 2020.** Crystal structure of the *Pseudomonas aeruginosa* PA0423 protein and its functional implication in antibiotic sequestration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 528, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.023>
- Li, X., Chen, F., Chen, Y., 2020.** Geluster: a simple-to-use tool for visualizing and comparing genome contexts for numerous genomes. *Bioinformatics* 36, 3871–3873. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa212>
- Loutet, S.A., Valvano, M.A., 2011.** Extreme Antimicrobial Peptide and Polymyxin B Resistance in the Genus *Burkholderia*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 1. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00006>
- Martinez, J.L., 2014.** General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov. Today Technol.* 11, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
- Martinez, J.L., Baquero, F., 2000.** Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1771–1777. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1771-1777.2000>

- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Yamaguchi, A., 2002.** Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419, 587–593. <https://doi.org/10.1038/nature01050>
- NCBI Resource Coordinators, 2018.** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 46, D8–D13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>
- Nummila, K., Kilpeläinen, I., Zähringer, U., Vaara, M., Helander, I.M., 1995.** Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Mol. Microbiol.* 16, 271–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02299.x>
- O’Sullivan, L.A., Mahenthiralingam, E., 2005.** Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 8–11. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01758.x>
- Paganin, P., Tabacchioni, S., Chiarini, L., 2011.** Pathogenicity and biotechnological applications of the genus *Burkholderia*. *Open Life Sci.* 6, 997–1005. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0072-2>
- Palmer, A.C., Kishony, R., 2014.** Opposing effects of target overexpression reveal drug mechanisms. *Nat. Commun.* 5, 4296. <https://doi.org/10.1038/ncomms5296>
- Payne, G.W., Vandamme, P., Morgan, S.H., LiPuma, J.J., Coenye, T., Weightman, A.J., Jones, T.H., Mahenthiralingam, E., 2005.** Development of a *recA* Gene-Based Identification Approach for the Entire *Burkholderia* Genus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3917. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3917-3927.2005>
- Perrin, E., Fondi, M., Papaleo, M.C., Maida, I., Buroni, S., Pasca, M.R., Riccardi, G., Fani, R., 2010.** Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the genus *Burkholderia*. *BMC Evol. Biol.* 10, 164. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-164>
- 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>
- Podnecky, N.L., Rhodes, K.A., Schweizer, H.P., 2015.** Efflux Pump-mediated Drug Resistance in *Burkholderia*. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00305>
- Pope, C.F., Gillespie, S.H., Pratten, J.R., McHugh, T.D., 2008.** Fluoroquinolone-Resistant Mutants of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1201–1203. <https://doi.org/10.1128/AAC.00799-07>
- Price, L.B., Johnson, E., Vailes, R., Silbergeld, E., 2005.** Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* isolates from conventional and antibiotic-free chicken products. *Environ. Health Perspect.* 113, 557–560. <https://doi.org/10.1289/ehp.7647>
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2010.** FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLOS ONE* 5, e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Raetz, C.R.H., Whitfield, C., 2002.** Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Read, A.F., Woods, R.J., 2014.** Antibiotic resistance management. *Evol. Med. Public Health* 2014, 147. <https://doi.org/10.1093/emph/eou024>
- Ren, Q., Kang, K.H., Paulsen, I.T., 2004.** TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Res.* 32, D284–D288. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh016>
- Rhodes, K.A., Schweizer, H.P., 2016.** Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug Resist. Updat.* 28, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.07.003>

Rice, P., Longden, I., Bleasby, A., 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* TIG 16, 276–277. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(00\)02024-2](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)02024-2)

Roth, Barbara., Falco, E.A., Hitchings, G.H., Bushby, S.R.M., 1962. 5-Benzyl-2,4-diaminopyrimidines as Antibacterial Agents. I. Synthesis and Antibacterial Activity in vitro. *J. Med. Pharm. Chem.* 5, 1103–1123. <https://doi.org/10.1021/jm01241a004>

Ruggerone, P., Vargiu, A.V., Collu, F., Fischer, N., Kandt, C., 2013. MOLECULAR DYNAMICS COMPUTER SIMULATIONS OF MULTIDRUG RND EFFLUX PUMPS. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 5, e201302008. <https://doi.org/10.5936/csbj.201302008>

Saiman, L., Siegel, J.D., LiPuma, J.J., Brown, R.F., Bryson, E.A., Chambers, M.J., Downer, V.S., Fliege, J., Hazle, L.A., Jain, M., Marshall, B.C., O'Malley, C., Pattee, S.R., Potter-Bynoe, G., Reid, S., Robinson, K.A., Sabadosa, K.A., Schmidt, H.J., Tullis, E., Webber, J., Weber, D.J., 2014. Infection Prevention and Control Guideline for Cystic Fibrosis: 2013 Update. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 35, s1–s67. <https://doi.org/10.1086/676882>

Santos, P.E. los, Rojas-Rojas, F.U., Tapia-García, E.Y., Vásquez-Murrieta, M.S., Hirsch, A.M., 2016. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Ann. Microbiol.* 66, 1303–1314. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1183-1>

Scoffone, V.C., Barbieri, G., Buroni, S., Scarselli, M., Pizza, M., Rappuoli, R., Riccardi, G., 2020. Vaccines to Overcome Antibiotic Resistance: The Challenge of *Burkholderia cenocepacia*. *Trends Microbiol.* 28, 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.12.005>

Scoffone, V.C., Chiarelli, L.R., Trespidi, G., Mentasti, M., Riccardi, G., Buroni, S., 2017. *Burkholderia cenocepacia* Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01592>

Sievers, F., Higgins, D.G., 2018. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* 27, 135–145. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>

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>

Smith, T.C., Gebreyes, W.A., Abley, M.J., Harper, A.L., Forshey, B.M., Male, M.J., Martin, H.W., Molla, B.Z., Sreevatsan, S., Thakur, S., Thiruvengadam, M., Davies, P.R., 2013. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs and Farm Workers on Conventional and Antibiotic-Free Swine Farms in the USA. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063704>

Snell, G., Reed, A., Stern, M., Hadjiliadis, D., 2017. The evolution of lung transplantation for cystic fibrosis: A 2017 update. *J. Cyst. Fibros.* 16, 553–564. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.06.008>

Speert, D.P., Bond, M., Woodman, R.C., Curnutte, J.T., 1994. Infection with *Pseudomonas cepacia* in chronic granulomatous disease: role of nonoxidative killing by neutrophils in host defense. *J. Infect. Dis.* 170, 1524–1531. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.6.1524>

Speert, D.P., Henry, D., Vandamme, P., Corey, M., Mahenthalingam, E., 2002. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* Complex in Patients with Cystic Fibrosis, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 181–187. <https://doi.org/10.3201/eid0802.010163>

Sputael, V., Van Schandevyl, G., Hanssens, L., 2020. A case report of successful eradication of new isolates of *Burkholderia cenocepacia* in a child with cystic fibrosis. *Acta Clin. Belg.* 75, 421–423. <https://doi.org/10.1080/17843286.2019.1630585>

- Stewart, P.S., William Costerton, J., 2001.** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358, 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- Sunagawa, S., Mende, D.R., Zeller, G., Izquierdo-Carrasco, F., Berger, S.A., Kultima, J.R., Coelho, L.P., Arumugam, M., Tap, J., Nielsen, H.B., Rasmussen, S., Brunak, S., Pedersen, O., Guarner, F., de Vos, W.M., Wang, J., Li, J., Doré, J., Ehrlich, S.D., Stamatakis, A., Bork, P., 2013.** Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes. *Nat. Methods* 10, 1196–1199. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2693>
- Symmons, M.F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V., 2009.** The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7173–7178. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900693106>
- Temgoua, F., Wu, L., 2019.** Mechanisms Efflux Pumps of *Acinetobacter baumannii* (MDR): Increasing Resistance to Antibiotics. *J. Biosci. Med.* 07, 48–70. <https://doi.org/10.4236/jbm.2019.71006>
- Tseng, S.-P., Tsai, W.-C., Liang, C.-Y., Lin, Y.-S., Huang, J.-W., Chang, C.-Y., Tyan, Y.-C., Lu, P.-L., 2014.** The Contribution of Antibiotic Resistance Mechanisms in Clinical *Burkholderia cepacia* Complex Isolates: An Emphasis on Efflux Pump Activity. *PLOS ONE* 9, e104986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104986>
- Ussery, D.W., Kiil, K., Lagesen, K., Sicheritz-Pontén, T., Bohlin, J., Wassenaar, T.M., 2009.** The Genus *Burkholderia*: Analysis of 56 Genomic Sequences. *Microb. Pathog.* 6, 140–157. <https://doi.org/10.1159/000235768>
- van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J.M., 2011.** Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Front. Microbiol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
- Vandamme, P., Dawyndt, P., 2011.** Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.10.002>
- Vandamme, P., Peeters, C., De Smet, B., Price, E.P., Sarovich, D.S., Henry, D.A., Hird, T.J., Zlosnik, J.E.A., Mayo, M., Warner, J., Baker, A., Currie, B.J., Carlier, A., 2017.** Comparative Genomics of *Burkholderia singularis* sp. nov., a Low G+C Content, Free-Living Bacterium That Defies Taxonomic Dissection of the Genus *Burkholderia*. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01679>
- Ventola, C.L., 2015.** The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* 40, 277–283.
- Wiersinga, W.J., Currie, B.J., Peacock, S.J., 2012.** Melioidosis. *N. Engl. J. Med.* 367, 1035–1044. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1204699>
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Arakawa, M., 1992.** Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and Transfer of Seven Species of the Genus *Pseudomonas* Homology Group II to the New Genus, with the Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36, 1251–1275.