

Genetic analysis of exopolysaccharide acetylation product by *Burkholderia cepacia*

Linda Furlanis, Lucia Corich, Francesco Gon, Enrico Angelo Tonin, Lucilla Dolzani, Cristina Lagatolla

Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste

Key words: *Burkholderia cepacia*, Exopolysaccharide, Acyltransferase

Analisi genetica dei livelli di acetilazione dell'esopolisaccaride prodotto da *Burkholderia cepacia*

SUMMARY

Bacteria belonging to the *Burkholderia cepacia* complex are mainly isolated from the sputum of cystic fibrosis patients and frequently show a mucoid phenotype. Most of them produce an exopolysaccharide called cepacian, whose repeating unit consists of a branched heptasaccharide carrying from one to three acetyl esters. Two genetic loci, *bceI* and *bceII*, consisting of 11 and 9 genes respectively, are involved in cepacian biosynthesis. Three genes located in the *bceII* locus, named *bceOSU*, code for different acyltransferases. As the presence of acetyl groups influences the viscosity of cepacian, we compared three strains (two clinical isolates named BTS2 and BTS7, and the reference strain *Burkholderia* sp. 383) exhibiting differences both in the acetylation pattern and at the genomic level, for the presence of insertion sequences adjacent to *bceU*.

INTRODUZIONE

Burkholderia cepacia, microrganismo isolato prevalentemente in pazienti affetti da fibrosi cistica, presenta frequentemente fenotipo mucoido.

Il più comune esopolisaccaride (EPS) prodotto è chiamato cepaciano: è costituito da un'unità ripetitiva (UR) eptamerica ramificata (Figura I), acetilata fino a tre volte (1). Per la sintesi di questo EPS sono stati individuati 2 loci genici, *bceI* e *bceII*, costituiti rispettivamente da 11 e 9 geni (2, 3).

Nel locus *bceII* sono localizzati i geni *bceOSU*, che codificano per tre differenti aciltransferasi.

La presenza di gruppi acetile influenza la viscosità del cepaciano.

Due isolati clinici, BTS2 e BTS7 e il ceppo di riferimento *Burkholderia* spp 383, il cui genoma è depositato in banca dati, sono stati studiati perché presentano delle differenze a livello dei geni *bceOSU* cui corrispondono diversi pattern di acetilazione dell'EPS.

MATERIALI E METODI

Il sequenziamento dei loci degli isolati clinici è stato ottenuto da *sub*-cloni della regione d'interesse oppure da prodotti di PCR ottenuti con primer specifici. Per la ricostruzione dell'intero locus è stato utilizzato il programma ContigExpress contenuto nella suite Vector NTI Advance 10 (Invitrogen). Per identificare i geni contenuti nella regione di interesse è stato utilizzato il programma ORF finder fornito dall'NCBI. L'analisi dei promotori è stata eseguita con il programma

"BPROM- Promoter finding in Bacteria". Infine è stata identificata la forcina di terminazione dell'operone tramite il programma "FindTerm - Finding Terminators in bacterial genomes".

RISULTATI

Sono state ricostruite le sequenze dei loci *bceI* e *bceII* sia di BTS2 che di BTS7.

L'analisi di sequenza di *bceII* ha rivelato due regioni aggiuntive in BTS2, omologhe a geni codificanti transposasi (*tnp*), ma inattive per la presenza di numerosi codoni di stop (Figura II).

Una in particolare è inserita in posizione adiacente al gene codificante l'aciltransferasi *BceU*. Apparentemente il loro inserimento non determina inattivazione di tali geni, ma l'analisi mediante 1H-NMR, svolta dal gruppo di ricerca del Prof. Rizzo (DSV) con cui collaboriamo, ha dimostrato che il numero medio degli acetili presenti nell'UR del cepaciano prodotto da BTS2 è pari a 2.2, contro i 3.0-2.8 presenti in quello prodotto rispettivamente da BTS7 e *Burkholderia* 383 (Tabella 1).

CONCLUSIONI

Poiché nell'UR dell'EPS prodotto da *Burkholderia* 383 e BTS7 sono presenti mediamente 3 acetili mentre in quello prodotto da BTS2 ce ne sono mediamente 2, è possibile ipotizzare che l'inserzione di uno dei geni *tnp* abbia determinato l'inattivazione di uno dei geni codificanti per aciltransferasi, la cui espressione verrà studiata in futuro mediante RT-PCR.

Corresponding author: Linda Furlanis

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste

Via L. Giorgieri, 1 - 34100 Trieste - Tel.: 040 5583693 - Fax: 040 5583691

E-mail: lfurlanis@units.it

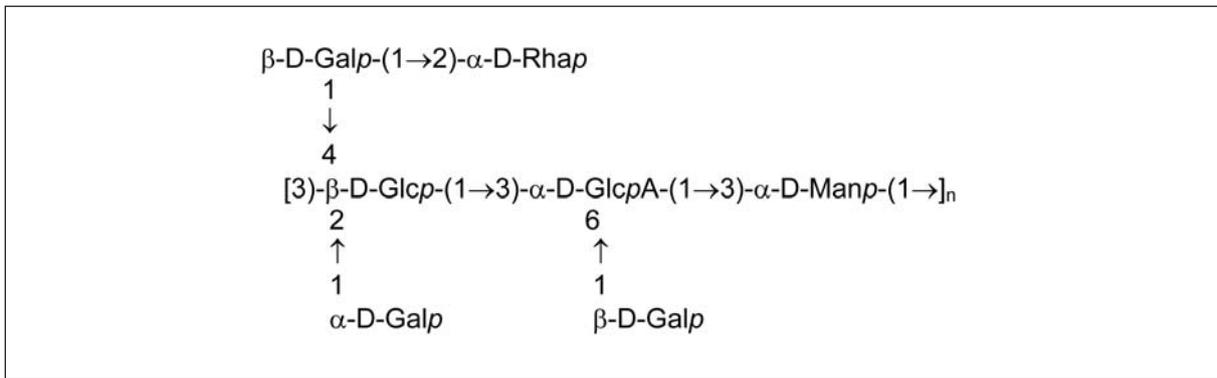


Figura I. Unità ripetitiva deacetilata dell'EPS cepaciano.

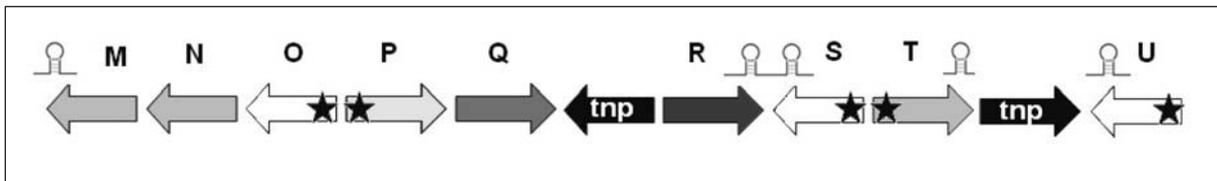


Figura II. Locus *bcell* di *BTS2*: in bianco le acetiltransferasi; in nero i geni codificanti per transposasi. Sono inoltre indicati i promotori (stelle) e le forcine di terminazione.

Tabella I. Quantificazione dei gruppi O-acetile presenti sull'esopolisaccaride cepaciano prodotto da tre specie batteriche diverse, ottenuta mediante spettroscopia ¹H-NMR. L'acetilazione viene espressa come quantità di acetili per unità ripetitiva polisaccaridica. Per il ceppo *BTS7* il valore presentato è la media di 11 preparazioni differenti; per i ceppi *B383* e *BTS2* il valore presentato è la media di 3 preparazioni differenti.

CAMPIONE	O-Ac/UR
BTS7	3.0
B383-a	2.8
BTS2-I	2.2

BIBLIOGRAFIA

- Cescutti P, Impallomeni G, Garozzo D, Rizzo R. O-Acetyl location on cepacian, the principal exopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *Carbohydr Res.* 2011 Dec 27; 346 (18): 2905-12.
- Ferreira AS, Leitão JH, Silva IN, et al. Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical *Burkholderia* strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to stress conditions. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Jan; 76 (2): 441-50. Epub 2009 Nov 30.
- Moreira LM, Videira PA, Sousa SA, Leitão JH, Cunha MV, Sá-Correia I. Identification and physical organization of the gene cluster involved in the biosynthesis of *Burkholderia cepacia* complex exopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Dec 12; 312 (2): 323-33.