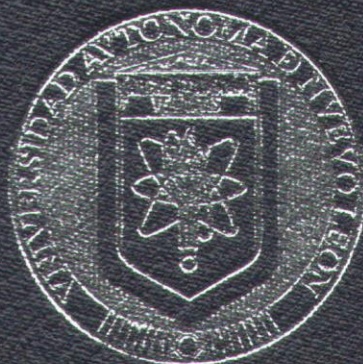


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



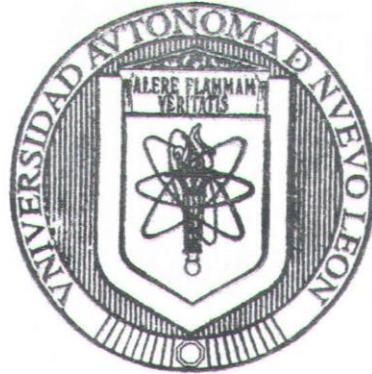
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA
BCAL2200 DE *Burkholderia cenocepacia*

PRESENTADO POR
Q.F.B. REBECA SANCHEZ RODRIGUEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL
GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

AGOSTO 2018

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LA PROTEINA
BCAL2200 DE *Burkholderia cenocepacia*

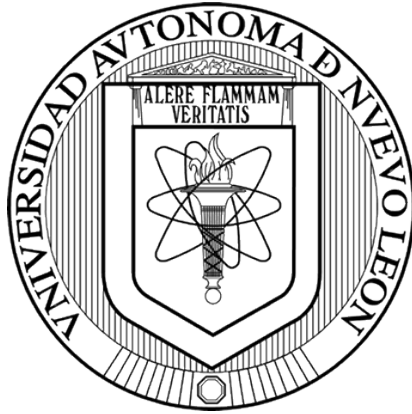
PRESENTADO POR
Q.F.B. REBECA SANCHEZ RODRIGUEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCION DEL
GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ORIENTACION EN MICROBIOLOGIA MEDICA

AGOSTO 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA BCAL2200 DE *Burkholderia*
*cenocepacia***

Presentado por

Q.F.B REBECA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

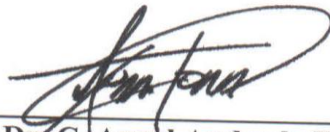
**Como requisito parcial para la obtención del Grado de
Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Médica**

Agosto 2018

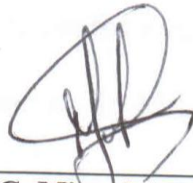
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA BCAL2200 DE

Burkholderia cenocepacia

Aprobación de la tesis:



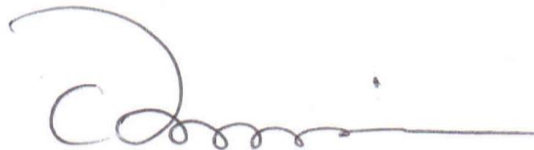
Dr. C. Angel Andrade Torres
Director de tesis



Dr. C. Miguel Angel Becerril García
Co- director de tesis



Dr. C. Gloria María González González
Miembro de la comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA BCAL2200 DE

Burkholderia cenocepacia

Presentado por:

Q.F.B REBECA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

Este trabajo se realizó en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRECEI) adscrito al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Angel Andrade Torres. Y contó con el financiamiento del Programa para el desarrollo profesional docente (PRODEP) de la Secretaria de Educación Pública, No. 511-6/17-7538.



Dr. C. Angel Andrade Torres
Director de tesis

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA BCAL2200 DE *Burkholderia*
*cenocepacia***

Q.F.B. REBECA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ FUE BECARIO DEL CONSEJO NACIONAL DE
CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CON EL NÚMERO DE REGISTRO 781836

“Pero por la gracia de Dios soy lo que soy...”

1Corintios 15:10

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y apoyo de muchas personas. A todos ellos les quiero agradecer lo que han hecho.

Al Dr. Angel Andrade Torres por su excelente dirección y apoyo en estos dos años. Gracias por su paciencia y su confianza a pesar de mis escasos conocimientos de biología molecular al inicio de la maestría. Sin sus consejos, su experiencia y sin sus correcciones este proyecto no hubiera sido posible.

A la Dra. Gloria María González González, por abrirme las puertas del departamento de Microbiología Médica, le agradezco su plena disponibilidad en ayudarme en cualquier cosa y por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo.

A mis profesores del Departamento de Microbiología, de los cuales pude adquirir muchos conocimientos nuevos, así como reforzarlos durante sus clases. Al Dr. Rogelio, por compartir sus conocimientos de Micología. Al Dr. Becerril por enseñarme a ver que la inmunología no es tan difícil como yo creía. Gracias a los doctores José Nicolás, Alejandro Sánchez, Romel Hernández y a las doctoras Mariana Elizondo y Alexa, por todo lo que pude aprender en sus clases en las diversas áreas de la microbiología.

A mi equipo del laboratorio. Muchas gracias Frank por todo tu apoyo en este proyecto, sin ti jamás hubiera podido terminar a tiempo. Gracias por recordarme las cosas miles de veces y ayudarme a tener en orden mis experimentos y mi vida. Gracias Martín por siempre estar dispuesto a regalarme de tu tiempo para explicarme lo que no entendía, por colaborar en mis experimentos cuando el trabajo era demasiado. Gracias por ayudarme a mantener la cordura en mis peores momentos y por todos tus consejos y regaños, los aprecio de verdad. Gracias Sandra por ayudarme a mantener el balance femenino en el laboratorio. Gracias por tu apoyo en mi proyecto cuando me faltaba el tiempo, porque siempre estuviste dispuesta a ayudarme y escucharme. Además, gracias a mis

compañeros de inmunología neonatal, Luis y Orlando, por siempre prestarme su computadora y su mesa de trabajo sin protestar, por disminuir mi aversión hacia el reggaetón y por hacer amenos mis días de trabajo en el laboratorio.

Gracias al personal del laboratorio de Micología: Gabriel, Carlos y Dr. Rogelio por el apoyo brindado y el acceso otorgado a equipos diversos y materiales.

Quiero agradecer además a mi familia de Monterrey: Marcos, Karen y Christian. Gracias por todos los momentos buenos y divertidos que pasamos día a día en el laboratorio y fuera de este. Gracias Karen por prestarme tu casa para pasar las noches, por todas esas pláticas, risas y lágrimas que pasamos juntas estos dos años y porque pude descubrir en ti una gran amiga en quien puedo confiar. Gracias Christian por ser mi segunda madre, por todo tu apoyo y cariño. Porque siempre estuviste dispuesta a escucharme y darme buenos consejos y por hacerme sentir como en casa. Gracias Marcos por hacerme los días más alegres en la maestría con tu buen ánimo y por enseñarme a ver la vida y todas las situaciones, siempre con optimismo.

Gracias a mis compañeros del posgrado de Microbiología: Fernando, Gerardo, Vane, Orlando, Martín y Caro. Les agradezco por todos los buenos momentos que compartimos y por su apoyo en esta etapa de mi vida. Gracias Gerardo por tu amistad, por tus consejos y tus críticas constructivas hacia mi proyecto y mi persona, lo valoro mucho y de verdad me han hecho crecer.

A mis padres Daniel y Pilar, a mis hermanos Rubén, Andrés y Miriam y mis sobrinos Dany y Betsy, porque a pesar de la distancia siempre he sentido su gran amor a mi lado. Gracias por apoyarme en cumplir mis sueños, sin su ayuda y sus muestras de cariño este proyecto no hubiera sido posible. Agradezco también a mis tíos y primos que han estado al pendiente de mi y dispuestos a ayudarme en todo, en especial a mi tío Nicolás Rodríguez y a mi querida abuela Raquel.

A mi mejor amiga, Ana Patricia por recibirme y hacerme parte de su familia y de su vida en esta etapa de mi vida. Gracias por todos tus consejos y por siempre alentarme a seguir adelante.

Y finalmente agradezco a mi buen Padre, por darme la vida, las fuerzas y la inteligencia para terminar este proyecto. Porque a pesar de las dificultades he aprendido que su gracia es suficiente para cualquier necesidad y que, separado de Él nada puedo hacer.

ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Género <i>Burkholderia</i>	1
1.1.1 Complejo <i>Burkholderia cepacia</i> (Bcc)	2
1.1.2 <i>Burkholderia cenocepacia</i>	4
1.1.3 Fibrosis quística y susceptibilidad a infecciones respiratorias	6
1.1.4 Patogénesis y factores de virulencia de <i>B. cenocepacia</i>	7
1.2 Sistemas de fosforilación bacterianos	15
1.2.1 Tirosina cinasas bacterianas	15
1.2.2 Tirosina fosfatasas bacterianas	17
1.2.3 Proteínas Tirosina Fosfatasas de bajo peso molecular (LMW-PTP)	18
2. ANTECEDENTES	22
2.1 Fosforilación en tirosinas en <i>B. cenocepacia</i>	22
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS	26
5. MATERIAL Y MÉTODOS	27
5.1 Cepas bacterianas	27
5.2 Manipulación del DNA	27
5.3 Transformación	34
5.4 Secuenciación de las construcciones generadas	36
5.5 Conjugación triparental	36
5.6 Evaluación del crecimiento en condiciones limitantes de nutrientes	37
5.7 Inmunodetección tipo Western blot	38
5.8 Purificación de proteínas recombinantes	39
5.9 Cuantificación de proteínas recombinantes	40
5.10 Actividad de fosfatasa	40
5.11 Análisis bioinformático de secuencias	41
5.12 Modelaje de la proteína BCAL2200	41
5.13 Análisis estadístico	41
6. RESULTADOS	42

6.1	Identificación de aminoácidos conservados en LMW-PTP	42
6.2	Purificación de DNA	43
6.3	Construcción de versiones mutantes puntuales de BCAL2200	44
6.4	Funcionalidad de las mutantes puntuales de BCAL2200 en la complementación del crecimiento en medio mínimo	48
6.5	Evaluación de la actividad de fosfatasa <i>in vitro</i> de las mutantes puntuales de BCAL2200	50
6.6	Modelaje tridimensional de la proteína BCAL2200	53
7.	DISCUSIÓN	54
8.	CONCLUSIONES	61
9.	BIBLIOGRAFÍA	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Principales factores de virulencia en <i>B. cenocepacia</i> .	10
2. Representación de los principales sistemas de fosforilación en organismos procariotas.	13
3. Mecanismo catalítico general de las LMW- PTP.	19
4. Alineamiento de secuencias múltiples de LMW-PTP.	43
5. Purificación de DNA cromosómico de <i>B. cenocepacia</i> K56-2 y plásmido pDA17.	44
6. Productos de PCR generados durante la mutagénesis sitio dirigida del aminoácido F81A del gen <i>BCAL2200</i> .	45
7. Análisis de colonias portadoras del fragmento clonado mediante PCR.	46
8. Cromatogramas de secuenciación de las diferentes mutantes puntuales de <i>BCAL2200</i> .	47
9. Curvas de crecimiento a 37°C de las versiones mutantes de <i>BCAL2200</i> en medio mínimo.	49
10. Evaluación de las proteínas recombinantes <i>BCAL2200</i> mediante Western blot.	50
11. Purificación del plásmido pET28 y digestión <i>NcoI/XhoI</i> .	51
12. Versiones recombinantes de la proteína <i>BCAL2200</i> purificadas.	52
13. Evaluación de la actividad de fosfatasa <i>in vitro</i> de las versiones mutantes purificadas de la proteína <i>BCAL2200</i> a 37°C usando p-nitrofenol fosfato como sustrato.	52
14. Modelaje tridimensional de la proteína <i>BCAL2200</i> .	53
15. Comparación de la superficie proteica entre una LMW-PTP clase I y clase II	58
16. Estructura de VcLMWPTP-1 de <i>V. cholerae</i> (4LRQ)	59

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Cepas bacterianas empleadas en este estudio	27
2. Plásmidos utilizados en este estudio	32
3. Oligonucleótidos diseñados y condiciones de amplificación por PCR	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Género *Burkholderia*

En 1950, William Burkholder fue el primero en describir la especie *Pseudomonas cepacia*, un microorganismo fitopatógeno capaz de causar podredumbre en las cebollas. La caracterización de estos microorganismos evidencio una gran versatilidad y capacidad para degradar contaminantes aromáticos complejos [1-3].

En 1992, en base a la secuencias de rRNA 16S, homología de DNA-DNA y características fenotípicas, siete especies fueron trasladadas del género *Pseudomonas* y transferidas al nuevo género *Burkholderia* [2, 3]. En contraste con *Pseudomonas*, este género pertenece a las denominadas β -Proteobacterias. Desde que el género *Burkholderia* fue asignado, la taxonomía de éste ha sufrido cambios considerables y el número de especies válidamente nombradas ha aumentado considerablemente y en la actualidad el género se encuentra compuesto por 120 especies diferentes [3, 4].

Los miembros del género *Burkholderia* generalmente habitan el suelo y su distribución geográfica se encuentra fuertemente relacionada con el pH del suelo, teniendo una ventaja competitiva en suelos ácidos [4-6]. En múltiples estudios se ha reportado que estos microorganismos son capaces de coexistir con diversos géneros de hongos, plantas e insectos, degradando contaminantes, fijando nitrógeno e incluso induciendo mecanismos de defensa en el hospedador vegetal. Estas complejas interacciones biológicas posiblemente han ejercido una fuerte presión selectiva, dando lugar a bacterias altamente adaptables [3, 4, 6].

A la fecha, solo un pequeño número de estas especies del género *Burkholderia* se han aislado a partir de muestras humanas. No obstante, en la actualidad se reconoce a las especies *B.*

pseudomallei, *B. mallei* y a la mayoría de las especies del complejo *B. cepacia* (Bcc, por sus siglas en inglés) como patógenos humanos [7, 8].

1.1.1. Complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc)

En 1997 Peter Vandamme propuso por primera vez la designación del Bcc [1]; a principios de la década de 2000 las especies incluidas fueron clasificadas en genomovares debido a que son fenotípicamente indistinguibles, pero filogenéticamente diferentes. Hoy en día, el Bcc está compuesto por 21 especies nombradas sistemáticamente, reemplazando las designaciones por genomovares [1, 5, 8, 9].

Los miembros del Bcc son bacilos Gram negativos, aerobios, mesofílicos, no formadores de esporas y móviles debido a la presencia de uno o más flagelos polares. Miden de 1 a 5 μm de largo por 0.5 a 1 μm de ancho. Estas bacterias son catalasa y oxidasa positiva, aunque en algunos casos la reacción de oxidasa es débil. Todas las especies del Bcc crecen en agar McConkey y no fermentan glucosa ni lactosa. La mayoría de estas especies oxidan la glucosa y también son capaces de reducir nitratos a nitritos durante su respiración. Notablemente, las bacterias del Bcc presentan una gran versatilidad metabólica, siendo capaces de utilizar carbohidratos simples y complejos, alcoholes, aminoácidos y distintas fuentes de carbono, todo esto les confiere la habilidad de colonizar, persistir y adaptarse a múltiples nichos ecológicos [1, 2, 8, 10].

Las especies de este complejo poseen un historial como patógenos nosocomiales, asociados a equipo médico, dispositivos implantables, medicamentos y soluciones desinfectantes contaminadas [1, 8]. Estas bacterias son capaces de causar una variedad de infecciones, incluyendo bacteriemias, infecciones del tracto urinario, osteomielitis, meningitis, peritonitis y principalmente infecciones en el sistema respiratorio [8]. En los últimos 20 años las

especies del Bcc se reconocen como patógenos importantes en individuos inmunocomprometidos, especialmente en pacientes con fibrosis quística (FQ) y con enfermedad granulomatosa crónica (EGC) [1, 10, 11].

La inhalación, es la principal vía de entrada de las bacterias del Bcc en el humano, las infecciones que se desarrollan en los individuos susceptibles son fundamentalmente diferentes presentaciones de neumonías. Los pacientes con FQ infectados por el Bcc suelen presentar una neumonía aguda que a menudo progresa hacia una neumonía crónica. En contraste, en los pacientes con EGC las neumonías por Bcc no suelen ser de curso crónico, sino más bien de tipo recurrente [5].

A pesar de que las especies del Bcc solo originan el 3.5% de las infecciones en pacientes con FQ a nivel mundial, alrededor del 10% de estos pacientes desarrollan una infección denominada “síndrome cepacia” [5, 12]. Este síndrome se caracteriza por una neumonía necrotizante, fiebre alta acompañada de bacteremia, una rápida progresión hacia una insuficiencia respiratoria y generalmente la muerte [1, 2, 5, 12]. En los pacientes con FQ este síndrome raramente ocurre por la infección con otros patógenos [2]. En la actualidad, resulta imposible predecir la progresión de las infecciones por Bcc hacia el síndrome cepacia pues pacientes infectados con la misma cepa los cuales pueden o no desarrollar el mencionado síndrome [1, 2]. Los factores de virulencia bacterianos asociados con este síndrome no son claros; y se sugiere que factores bacterianos y del huésped son críticos en la determinación del pronóstico clínico [2, 13-16].

Una característica sumamente importante en las infecciones por el Bcc, es su resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, incluidos aminoglucósidos, polimixinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y carboxilpenicilinas [2, 5, 12]. En los últimos años, la

resistencia emergente a carbapenémicos y trimetoprim-sulfametoxazol ha aumentado la preocupación clínica, debido a que resulta difícil predecir qué antibióticos serán de utilidad en el tratamiento de las infecciones por estas bacterias [17, 18].

La transmisión de Bcc ocurre por aerosoles y contacto físico directo con personas infectadas o superficies contaminadas, y las estrategias de control están dirigidas a estas rutas de propagación[1, 3]. Las organizaciones nacionales de FQ recomiendan que los pacientes con infección por Bcc deben segregarse entre sí y de otros pacientes con FQ en entornos de atención clínica [2, 3]. Fuera del entorno hospitalario, se recomienda que los pacientes infectados con Bcc eviten el contacto prolongado o cercano con otros pacientes con FQ, para evitar la propagación de estas infecciones[2, 3].

Aunque todas las especies del Bcc se han aislado de infecciones en pacientes con FQ, en Inglaterra y América del Norte los principales brotes se atribuyen a cepas de *B. cenocepacia* y *B. multivorans* [1, 2, 5]. Además, existe evidencia que indica durante las infecciones crónicas en pacientes con FQ *B. cenocepacia* puede remplazar a *B. multivorans* [2].

1.1.2. *Burkholderia cenocepacia*

Debido a su incidencia *B. cenocepacia* representa la especie mayormente estudiada del Bcc [11]. *B. cenocepacia* posee uno de los genomas bacterianos más grande y complejo de los descritos hasta la fecha. El genoma de *B. cenocepacia* tiene un porcentaje de GC elevado, además de numerosas duplicaciones génicas, secuencias de inserción y elementos móviles [10]. Se cree que estos elementos contribuyen a la plasticidad y versatilidad metabólica que presenta este microorganismo, ya que su genoma puede mutar rápidamente cuando se

encuentra en condiciones de estrés *in vitro* o durante las infecciones en el hospedero [10, 19, 20].

Mediante análisis de secuencia del gen *recA* y la tipificación multilocus de secuencias (MLST, por sus siglas en inglés) los aislamientos de *B. cenocepacia* se han subdividido en 4 linajes distintos: IIIA, IIIB, IIIC y IIID [10, 11, 21]. Los linajes IIIB y IIIC pueden cultivarse fácilmente de muestras ambientales, mientras que se han descrito muy pocas cepas ambientales del linaje IIIA, lo que sugiere el cambio de esta subclase, de saprofito del suelo a patógeno humano [10, 11]. El linaje IIIA, también conocido como complejo clonal 31 (CC31, mediante MLST), es la principal clona de Bcc, aislada a partir de muestras clínicas, encontrada en la base de datos del MLST, lo que refleja su estrecha asociación con los humanos [20, 21]. Además, se ha demostrado que existe una relación entre la mortalidad por infecciones causadas por el subgrupo IIIA en pacientes con FQ, en comparación con otros linajes y especies del Bcc [19, 21].

Dentro del linaje IIIA se encuentra la cepa epidémica *B. cenocepacia* J2315, la cual también es miembro del linaje electroforético tipo 12 (ET12, por sus siglas en inglés) [11, 21]. *B. cenocepacia* J2315 es una cepa hipervirulenta responsable de brotes de infecciones en pacientes con FQ en Europa y América del Norte, y se encuentra asociada con el "síndrome cepacia" [21]. Su genoma tiene más de 8000 Kpb y consta de tres cromosomas circulares y un plásmido [10, 11].

La mayoría de los estudios realizados con *B. cenocepacia*, utilizan la cepa J2315 o a la cepa relacionada genéticamente, *B. cenocepacia* K56-2. Esta última es una variante en dos locus con respecto a la cepa J2315, mediante la técnica MLST [10, 20]. Diferencias importantes entre las cepas de *B. cenocepacia* J2315 y K56-2 incluyen, la estructura de los

lipopolisacáridos (LPS), la producción de pigmentos y las interacciones con células eucariotas [10]. Además, debido a que la cepa de *B. cenocepacia* K56-2 presenta una menor resistencia a los agentes antimicrobianos y su manipulación genética resulta más sencilla (en comparación con la cepa J2315), ésta se usa con mayor frecuencia en los estudios *in vitro* [10, 20].

1.1.3. Fibrosis quística y susceptibilidad a infecciones respiratorias

Las células epiteliales que recubren el tracto respiratorio forman una barrera estrecha polarizada [22]. En el dominio apical, estas células cuentan con una capa líquida superficial compuesta por secreciones de células caliciformes, agua y anticuerpos. El aclaramiento mucociliar es un importante mecanismo de defensa innato que contribuye en la protección contra bacterias inhaladas [22]. Los defectos en este mecanismo impiden que el moco se renueve, favoreciendo la acumulación de secreciones y el desarrollo de infecciones. La integridad de la barrera epitelial se mantiene mediante uniones estrechas, las cuales se localizan en los dominios basolaterales de las células epiteliales y son responsables de regular la difusión selectiva de iones, agua, moléculas y células del sistema inmune [22].

En los pacientes con FQ, el defecto primario se debe a mutaciones en el gen que codifica para la proteína transmembranal CFTR, situada en la porción apical de las células epiteliales [14, 22, 23]. Esta proteína es responsable del transporte de iones, principalmente de cloro. La pérdida de la función de esta proteína causa un defecto en el transporte de electrólitos produciendo secreciones anormalmente viscosas [12, 23]. El aclaramiento mucociliar defectuoso, una respuesta inflamatoria potenciada y una menor eficacia de los

péptidos antimicrobianos, contribuyen al desarrollo de infecciones persistentes en pacientes con FQ [12].

1.1.4 Patogénesis y factores de virulencia de *B. cenocepacia*

Las infecciones por *B. cenocepacia* son principalmente de origen nosocomial mediante el contacto directo entre pacientes infectados o a través de gotitas respiratorias. Posterior a la inhalación de la bacteria, el primer paso para el establecimiento de una infección por *B. cenocepacia* en la mucosa pulmonar es la adhesión a la superficie epitelial [12]. Se sabe que las bacterias del Bcc se adhieren a las células epiteliales a través de receptores de proteínas, glicolípidos y mucinas secretoras [22]. Particularmente, *B. cenocepacia* requiere la expresión combinada de un pili específico, además de adhesinas, las cuales se unen a la citoqueratina 13 expresada en la superficie de las células epiteliales [2, 22]. Este pili es una estructura flexible, de gran tamaño (2-4 nm), de distribución períttrica, codificada a partir de cuatro genes. En general, las adhesinas bacterianas se ensamblan en la punta del pili [2, 24]. Por el contrario, las adhesinas del pili de *B. cenocepacia* se distribuyen a lo largo de la estructura [24]. Esta disposición se cree que maximiza las interacciones del pili con la mucina, así como con las células epiteliales [2]. Además, se ha descrito que el pili de *B. cenocepacia* puede entrelazarse con el pili de bacterias adyacentes, mejorando así su adhesión y supervivencia [24]. No obstante, este mecanismo de adhesión no se presenta en todas las bacterias del linaje ET12 de *B. cenocepacia*. Los glicolípidos son otra clase de receptores a los que puede unirse *B. cenocepacia*, los cuales activan la señalización intracelular y desencadenan las respuestas inflamatorias [22].

Posterior a la etapa de adhesión, *B. cenocepacia* pueden invadir y sobrevivir dentro de las células epiteliales y macrófagos al ser internalizada, esto debido a una reorganización del citoesqueleto por parte de la célula huésped [12]. Al ser fagocitada *B. cenocepacia* puede evitar la digestión lisosomal al interferir con la maduración del autofagosoma y replicándose en el retículo endoplásmico [22, 25]. Además *B. cenocepacia* es capaz de resistir al estrés oxidativo, al poseer las enzimas catalasa, peroxidasa, una superóxido dismutasa periplásmica y un pigmento semejante a melanina, que protegen a la bacteria del daño oxidativo por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [10, 26]. También, la proteína MgtC es requerida por *B. cenocepacia* durante la supervivencia intrafagosomal en macrófagos y para el crecimiento de la bacteria en concentraciones bajas de magnesio [10, 26].

La invasión de las células epiteliales por *B. cenocepacia* también puede ocurrir mediante la translocación paracelular (paracitosis), tras el rompimiento de las uniones estrechas del epitelio y su translocación hacia la cara basolateral, este proceso es sumamente importante pues permite a la bacteria alcanzar la circulación y provocar bacteriemia [12, 22].

Los exopolisacáridos (EPS) se consideran otro factor de virulencia de *B. cenocepacia*. El término EPS se refiere a polisacáridos excretados y localizados en la superficie externa de las bacterias, éstos poseen una composición variable, principalmente de carbohidratos y en menor proporción diversos sustituyentes orgánicos e inorgánicos. Se ha reportado que el EPS de *B. cenocepacia* está involucrado en la invasión y persistencia de la bacteria en los pulmones de pacientes con FQ, el EPS de *B. cenocepacia* interfiere en la función del sistema inmune al interactuar con péptidos antimicrobianos, secuestrar especies reactivas de oxígeno o participando en la formación de biopelículas.

Las biopelículas se componen por grandes comunidades bacterianas incrustadas en una matriz extracelular, constituida principalmente por EPS. En *B. cenocepacia* la formación de biopelícula le confiere resistencia a diversos antibióticos, como ceftazidima o ciprofloxacino [2], además de brindarle protección contra las células y efectores del sistema inmune [10, 12]. En los pacientes con fibrosis quística, Bcc forma biopelículas junto con *P. aeruginosa* y ambas bacterias se encuentran interaccionando de manera dinámica y comunicándose mediante señales de quorum [5, 10].

La señal de quorum representa una forma de comunicación bacteriana que permite regular la expresión de genes con base a la densidad de la población celular y a compuestos secretados que se acumulan extracelularmente [10]. En *B. cenocepacia* el sistema de señal de quórum *cepRI*, interviene en la producción de N-octanoil homoserin lactona, molécula que regula numerosas funciones, como son la producción de toxinas, proteasas, lipasas, sideróforos, además de la estabilidad de las biopelículas [2, 10].

En relación a los flagelos, se ha descrito que son necesarios durante la invasión de *B. cenocepacia*, aunque no parecen ser esenciales para la adherencia [22]. La flagelina de esta bacteria es uno de los pocos ligandos capaces de ser reconocidos por el receptor tipo Toll 5 [2, 11], esta unión induce la activación de NF- κ B, que estimula la síntesis del factor de necrosis tumoral α y la interleucina-8 en los macrófagos, produciendo una potente respuesta inflamatoria [2, 10].

Además de los elementos directamente involucrados en la adhesión e invasión, *B. cenocepacia* produce otros factores de virulencia que aumentan su patogenicidad, aunque su contribución precisa no se ha dilucidado por completo. *B. cenocepacia* produce dos distintas metaloproteasas de zinc extracelulares, denominadas ZmpA y ZmpB [10, 22]. Estas enzimas

pueden degradar lactoferrina, inmunoglobulinas así como diversos péptidos antimicrobianos [10].

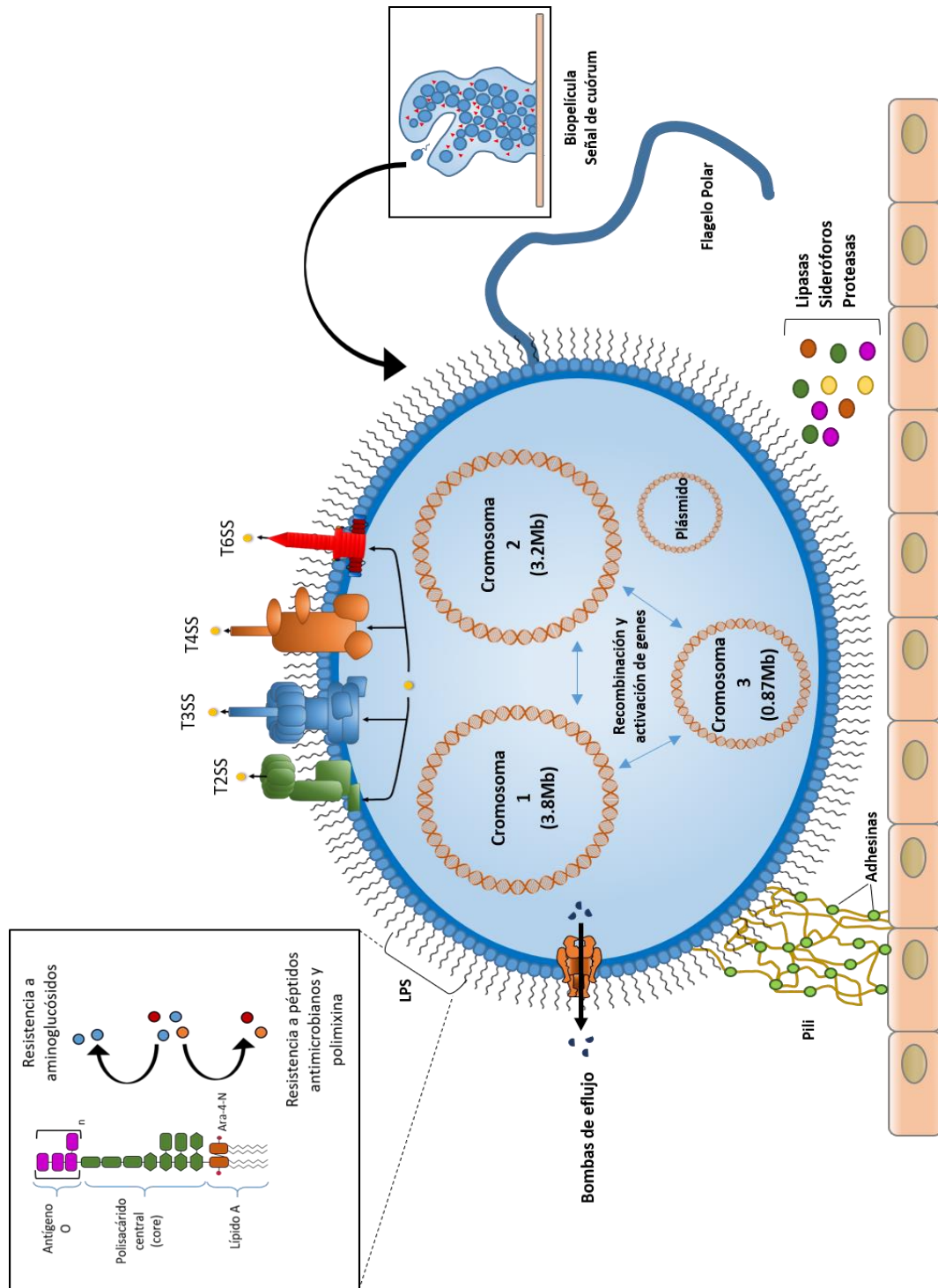


Figura 1. Principales factores de virulencia en *B. cenocepacia*. LPS, Lipopolisacárido; T2SS, sistema de secreción tipo II; T3SS, sistema de secreción tipo III; T4SS, sistema de secreción tipo IV; T6SS, sistema de secreción tipo VI. Tomado y modificado de Eshwar Mahenthalingam *et al.*, 2005 [2].

Una serin proteasa periplásmica, ha sido identificada como un factor de virulencia en la cepa de *B. cenocepacia* K-562, ya que es responsable de la utilización de ferritina como fuente de hierro [10]. Esta capacidad representa una ventaja significativa para esta bacteria, ya que los pacientes con FQ tiene niveles de ferritina más altos que en comparación con los individuos sanos [22].

El hierro es un elemento esencial para funciones celulares fundamentales como son la síntesis de ADN, respiración y eliminación de radicales libres. *B. cenocepacia* produce diversos sideróforos, tales como ornibactina, pioquelina y ácido siálico, éstos actúan como agentes quelantes al secuestrar el hierro y reducirlo a Fe^{2+} , una forma más soluble y aprovechable para su nutrición [10, 11].

Muchas bacterias patógenas emplean sistemas especializados para la secreción de moléculas efectoras que alteran procesos celulares del huésped y son cruciales para la virulencia y la supervivencia [12]. *B. cenocepacia* expresa los sistemas de secreción tipo II, III, IV y VI [26]. El sistema de secreción de tipo III (T3SS) es requerido por *B. cenocepacia* para su supervivencia durante infecciones en un modelo murino. El sistema de secreción tipo IV es necesario para la supervivencia intracelular en células epiteliales y macrófagos. Además, recientemente se describió que el sistema de secreción tipo VI, es necesario para la supervivencia de *B. cenocepacia* en macrófagos [10, 11]. Los principales factores de virulencia de *B. cenocepacia* se ilustran en la figura 1.

El lipopolisacárido (LPS) es un glicolípido complejo localizado en la cara externa de la membrana externa de bacterias Gram negativas. El LPS desempeña un papel importante en la inducción de la respuesta inmune, al ser reconocido por receptores Toll tipo 4, contribuye al daño de la célula huésped [10, 22]. El LPS de *B. cenocepacia* se distingue por tener menos

grupos fosfatos en su estructura, también contiene un azúcar inusual (ácido D-glicero- α -D-talo-oct-2-ulopiranoilónico) situado en el núcleo del LPS y el azúcar 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa sustituyendo a grupos fosfatos en la porción del núcleo y del lípido A [10]. Esta estructura y composición específica reduce la carga aniónica de la superficie celular y confiere a la bacteria una alta resistencia intrínseca a aminoglucósidos, polimixinas y péptidos antimicrobianos [2, 11, 12].

Es importante mencionar que la resistencia a antimicrobianos que presenta *B. cenocepacia* es resultado de múltiples mecanismos tales como: alteraciones en la permeabilidad celular, producción de enzimas que degradan moléculas antimicrobianas, así como la alteración del blanco del antibiótico. En la cepa de *B. cenocepacia* J2315 se han reportado la inducción de β -lactamasas cromosómicas, y diferentes sistemas de eflujo, los cuales modulan la resistencia a antibióticos de amplio espectro. Adicionalmente, se ha descrito que *B. cenocepacia* tiene la capacidad de usar penicilina G como única fuente de carbono [2, 11].

1.2 Sistemas de fosforilación bacterianos

Las proteínas son las efectoras de casi la totalidad de las funciones celulares, comúnmente su actividad se encuentra regulada a través de modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones químicas son muy diversas, siendo las principales: acetilación, carboxilación, fosforilación, glicosilación, lipidación, metilación, nitrosilación y oxidación [27, 28]. Las consecuencias de estas modificaciones pueden ser de tipo estructural o funcional, ya que influyen en el plegamiento y en la estabilidad de las proteínas. De manera general se puede considerar que las modificaciones postraduccionales repercuten en la localización subcelular,

en el mecanismo catalítico y en la regulación de la actividad biológica de las proteínas[27, 28].

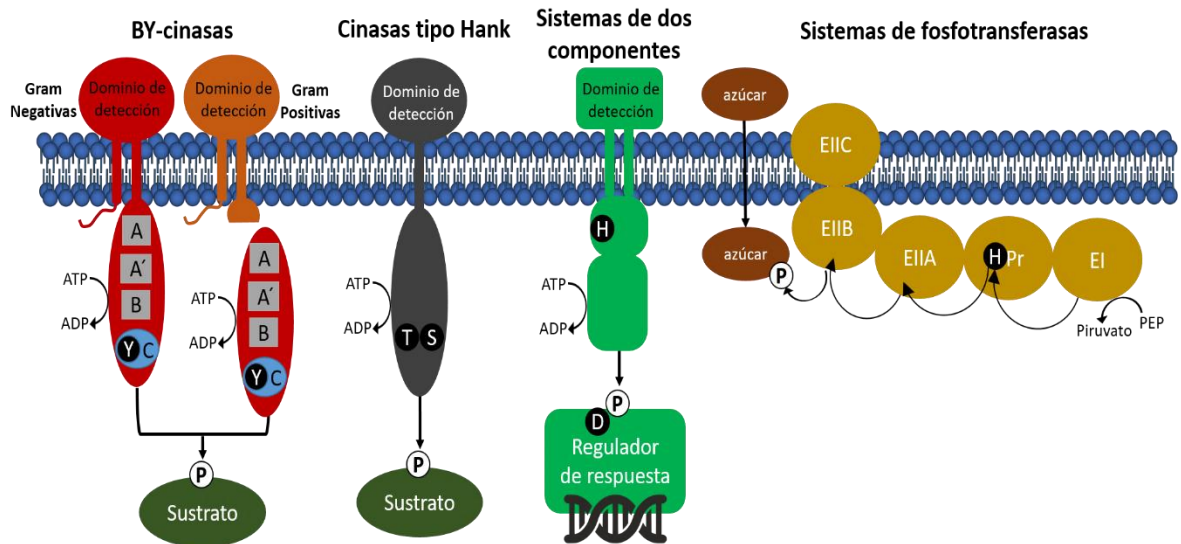


Figura 2. Representación de los principales sistemas de fosforilación en organismos procariotas. A, dominio Walker A; A', dominio Walker A'; B, dominio Walker B; YC, motivo rico en tirosinas; T, treonina; S, serina; H, histidina; D, aspartato; PEP, fosfoenol piruvato; P, grupo fosfato; EI, enzima I; EII, enzima II; Pr, proteína reguladora. Tomado y modificado de Ivan Mijakovic et al.,2016; Ivan Mijakovic y Boris Macek, 2012 [27, 29].

La fosforilación de proteínas, se considera la primera modificación postraduccional descrita y caracterizada en células eucariotas (década de 1950) [30]. Esta modificación consiste en la unión de grupos fosfato a las cadenas laterales de diversos aminoácidos. Desde su descubrimiento, se ha demostrado que la fosforilación de proteínas en eucariotas es un mecanismo versátil y complejo, necesario para la regulación de procesos celulares, como la comunicación y coordinación intercelular [31]. Tan solo en humanos se han detectado más de 500 proteínas cinasas, regulando múltiples procesos celulares [28, 32]. Las proteínas cinasas en células procariotas no fueron descritas hasta la década de 1970. [32].

En contraparte, en células procariotas los primeros sistemas de fosforilación caracterizados fueron los sistemas de dos componentes y los sistemas de fosfotransferasas [31, 33]. Los sistemas de dos componentes constan de una proteína cinasa sensora y una proteína reguladora. La cinasa sensora presenta un dominio sensorial expuesto en la superficie y como respuesta a una señal externa esta cinasa se autofosforila en un residuo de histidina, del denominado dominio aceptor. Posteriormente, el grupo fosfato es transferido a la proteína reguladora de respuesta, específicamente en un residuo de aspartato. La transferencia del grupo fosfato a la proteína reguladora de respuesta generalmente induce su unión a regiones promotoras de genes específicos, y desencadena la activación o represión de la transcripción de estos. Los sistemas de dos componentes se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias y en algunos eucariontes, y se han asociado con las respuestas a estímulos ambientales [28, 32, 33].

Los sistemas de fosfotransferasas están involucrados en la absorción de carbohidratos, en estos sistemas un grupo fosfato es transferido a partir de una molécula de fosfoenol piruvato a lo largo de una cadena de proteínas, mediante la fosforilación en residuos de histidina. Sin embargo, debido a que el receptor final del fosfato es un azúcar no se consideran un sistema de fosforilación de proteínas en el sentido estricto [33, 34]. Al igual que en los sistemas de dos componentes, los sistemas de fosfotransferasas también se han descrito en algunos organismos eucariontes [34].

El tercer sistema de fosforilación descrito en bacterias es semejante al sistema de fosforilación dependiente de ATP/GTP ampliamente distribuido en eucariotas. En este sistema cinasas específicas catalizan la fosforilación de grupos hidroxilo en residuos de treonina, serina y tirosina de proteínas. Al ser un proceso reversible, las fosfoproteínas pueden ser desfosforiladas mediante la actividad de fosfatasas específicas [34]. Una

diferencia importante con los sistemas de dos componentes, es que las cinasas de residuos de treonina, serina y tirosina puede fosforilar múltiples sustratos [32].

Tradicionalmente esta modificación postraducciona era considerada exclusiva de organismos eucariotas, sin embargo, en las últimas dos décadas se ha confirmado que las bacterias también realizan la fosforilación de residuos de serina, treonina, y más recientemente, de tirosina. Además, semejante a lo que ocurre en eucariontes, estos sistemas de fosforilación contribuyen de manera importante en la regulación de múltiples funciones celulares.

1.2.1 Tirosina cinasas bacterianas

La primera evidencia de fosforilación de proteínas procariontes en residuos de tirosinas, provino de la caracterización de la proteína Ptk de *Acinetobacter johnsonii* [35]. Ptk es una proteína transmembranal capaz de autofosforilarse en varios residuos de tirosinas de manera dependiente de ATP [30, 35]. Interesantemente, Ptk no comparte homología de secuencia con las tirosina cinasas eucariotas y su mecanismo de autofosforilación es diferente [32, 35]. A partir del descubrimiento de Ptk, en 1997, se han descrito homólogos en diversas especies bacterianas. Las características particulares de estas proteínas ha permitido agruparlas como una nueva familia denominada tirosina cinasas bacterianas (BY-cinasas, por sus siglas en inglés). A la fecha se sabe que las BY-cinasas se encuentran ampliamente distribuidas y representan el principal mecanismo de fosforilación de tirosinas en bacterias [27, 36].

Las BY-cinasas se caracterizan por presentar un dominio extracelular flanqueado por dos α -hélices transmembranales y un dominio catalítico citosólico que contiene los motivos Walker

A y B, además de un tercer motivo adicional Walker A', ubicado entre los motivos A y B [33]. En el extremo C-terminal poseen un motivo rico en tirosinas (YC) [27, 36]. Este motivo puede variar en longitud, de 10 a 20 aminoácidos, y puede contener varios residuos de tirosina (usualmente de tres a siete), dichas tirosinas constituyen los sitios de autofosforilación de las BY-cinasas [31, 36]. Las BY-cinasas pueden autoasociarse y formar oligómeros, debido a que la fosforilación del YC es realizada por la BY-cinasas adyacente y viceversa, se considera más bien un proceso de transfosforilación [31, 35]. La secuencia del YC no está conservada entre las BY-cinasas y se ha demostrado que cada tirosina puede ser fosforilada independientemente de las otras sin ningún orden preferencial [27, 31, 33]. En su estado desfosforilado, las BY-cinasas forman octámeros en forma de anillo donde la tirosina de un monómero se localiza en el sitio catalítico del monómero vecino. Al ser fosforilada la BY-cinasa, el octámero se disocia permitiendo que los monómeros interaccionen y fosforilen los sustratos celulares [27].

En la mayoría de las Proteobacterias, las BY-cinasas están compuestas por un único polipéptido que se localiza en la membrana interna bacteriana. Por el contrario, las BY-cinasas de Firmicutes se componen de dos cadenas polipeptídicas (codificados por genes adyacentes), que requieren interactuar entre sí para formar una enzima funcional [27, 32] [31]. La causa y las consecuencias funcionales de esta división no se han clarificado, aunque recientemente se ha sugerido que puede permitir la interacción de la BY-cinasa con otras proteínas y conferirle una mayor versatilidad a la enzima [30].

Actualmente se considera que la actividad de las BY-cinasas regula múltiples procesos de la fisiología bacteriana tales como; resistencia a antibióticos, replicación del ADN y metabolismo, respuesta al choque térmico, formación de biopelículas, formación de esporas y en su virulencia [32, 33, 36]. Cabe mencionar que la gran mayoría de los genes que

codifican las BY-cinasas se encuentran en operones implicados en la síntesis y exportación de polisacáridos capsulares y EPS [27, 33].

1.2.2 Tirosina fosfatasas bacterianas

Las proteínas fosfatasas catalizan la desfosforilación de sustratos proteicos, previamente fosforilados, al remover el grupo fosfato de residuos de serina, treonina o tirosina o bien desfosforilando a la propia enzima cinasa e inactivándola [31, 33]. Adicionalmente, se ha reportado que algunas bacterias patógenas secretan fosfatasas, las cuales intervienen en la iniciación o progresión de la infección mediante su interacción con proteínas fosforiladas del hospedador [27].

Las fosfatasas se clasifican en tres familias denominadas: Fosfoproteínas Fosfatasas (PPP, por sus siglas en inglés), Proteínas Fosfatasas dependientes de Mg^{2+} ó Mn^{2+} (PPM, por sus siglas en inglés) y las Proteínas Tirosina Fosfatasas (PTP, por sus siglas en inglés). Estas tres familias se encuentran conservadas tanto en organismos eucariotas como procariotas y se diferencian entre sí por su secuencia, por su requerimientos de metales, entre otros aspectos [37]. Las familias PPP y PPM hidrolizan específicamente fosfoésteres de serina/ treonina, y su actividad depende de la adición de metales [37]. Por otra parte, la familia PTP es la responsable de desfosforilar residuos de tirosina.

Numerosas PTP se han identificado en bacterias, las cuales presentan una alta similitud estructural y funcional con sus homólogos eucariotas. Las PTP procariontes se dividen a su vez en tres clases: las tirosina fosfatasas convencionales o similares a eucariotas (cPTP, por sus siglas en inglés), las fosfatasas de bajo peso molecular (LMW-PTP, por sus siglas en

inglés) y las polimerasa e histidinol fosfatasas (PHP, por sus siglas en inglés). Éstas últimas solo se han identificado en procariotas, principalmente en bacterias Gram positivas [27, 31, 33].

Las familias de cPTP y LMW-PTP comparten un motivo conservado en el sitio activo el cual se caracteriza por la secuencia C(X)₅R, además de un residuo de aspartato. Sin embargo, ambas familias difieren en puntos importantes como: el número de aminoácidos entre el aspartato y el motivo C(X)₅R, la secuencia consenso del sitio activo, así como el tamaño del motivo catalítico [33]. En contraste, la familia PHP no muestra similitud de secuencia con las proteínas cPTP y LMW-PTP, y su funcionamiento depende de un pH básico y de metales, principalmente Mn²⁺ [38].

1.2.3 Proteínas Tirosina Fosfatasas de bajo peso molecular (LMW-PTP)

En general, las LMW-PTP poseen un dominio catalítico central formado por 4 β-láminas rodeadas por α-hélices. Además, en su estructura se distinguen tres asas esenciales: el asa P, que contiene la cisteína catalítica del motivo conservado, el asa D que contiene el residuo de aspartato importante para la actividad catalítica y el asa W necesario para el reconocimiento de la fosfotirosina [39].

Como se mencionó, las LMW-PTP utilizan un mecanismo catalítico que requiere el motivo C(X)₅R. En la reacción catalizada por estas enzimas el grupo fosfato es coordinado por el residuo de arginina de dicho motivo para situarlo cercano al residuo de cisteína catalítico. Esta unión produce un cambio conformacional en el asa D permitiendo que el residuo de aspartato catalítico se localice en el sitio activo y actúe como el ácido de la reacción.

algunas bacterias Gram-positivas codifican una o más LMW-PTP, sin embargo dichas LMW-PTP de Gram-positivas, se encuentran codificadas en sitios alejados de las PHP, sin la presencia de algún gen codificante de una enzima BY-cinasa en su cercanía [31, 33]. Otra diferencia importante entre las LMW-PTP de Firmicutes y Proteobacterias, radica en que las LMW-PTP de Firmicutes, generalmente no son capaces de catalizar la desfosforilación de las BY-cinasas [31], lo que sugiere una especificidad en el reconocimiento de sus sustratos.

De acuerdo con su contexto genético la función de las LMW-PTP bacterianas en un inicio se asoció con la biosíntesis de EPS [38]. Sin embargo, actualmente se considera que estas enzimas intervienen en múltiples procesos fisiológicos pues en años recientes el número de proteínas procariontes sustrato a fosforilación en tirosinas se ha incrementado de manera significativa.

Las LMW-PTP bacterianas tienen una alta similitud de secuencia y estructural con sus contrapartes eucariotas, ambas son capaces de desfosforilar *p*-nitrofenol fosfato, fosfotirosinas, así como proteínas endógenas fosforiladas en tirosina, y son incapaces de desfosforilar enlaces fosfoserina o fosfotreonina. Ambas fosfatasas, procariotas y eucariotas, se inactivan con molibdato de amonio, ortovanadato de sodio o con ácido yodoacético [41].

Esta gran similitud entre LMW-PTP procariotas y eucariotas sugiere un probable reconocimiento heterólogo entre sus sustratos. Dicha idea se sustenta en el hecho de que la LMW-PTP, PtpA de *Mycobacterium tuberculosis* puede ser secretada al citosol de macrófagos donde reconoce a la proteína GSK3 α , modulando así la actividad antiapoptótica y permitiendo que la bacteria evada la fagocitosis [42]. No obstante, la interacción entre alguna LMW-PTP procarionte con blancos eucariontes requiere indispensablemente su previa secreción al interior celular eucarionte.

Por otra parte, a pesar de las similitudes mencionadas entre las LMW-PTP, la comparación de estructuras y algunas diferencias en la secuencia del asa W, han llevado a proponer una subdivisión entre las LMW-PTP, en la que las enzimas eucariontes y las de bacterias Gram positivas se designan como LMW-PTP clase I. Mientras que la gran mayoría de las fosfatasas de bacterias Gram negativas se clasifican como LMW-PTP clase II [41].

2. ANTECEDENTES

2.1 Fosforilación en tirosinas en *B. cenocepacia*

Un análisis del genoma de *B. cenocepacia* K56-2 reveló la presencia de marcos de lectura abiertos codificantes de cuatro probables LMW-PTP y tres BY-cinasas. Las LMW-PTP identificadas corresponden a las proteínas BCAL2200, BCAM0208, Dpm (BCAM0628) y BceD (BCAM0857), mientras que las BY-cinasas a las proteínas BCAM1331, BCAM0207 y BceF (BCAM0859). Los genes que codifican estas proteínas se ubican en diferentes operones dentro del primer (BCAL) y segundo (BCAM) cromosoma [7, 43].

El gen *dpm* se localiza en una región del genoma poco conservada, y solo se encuentra en las cepas de *B. cenocepacia* J2315 K56-2 y H111, además de las cepas de *B. cepacia* GG4 y *B. lata*. Es importante mencionar que Dpm se describió como una LMW-PTP inactiva debido a una sustitución de la cisteína del motivo C(X)₅R por un residuo de aspartato. No obstante, Dpm es la única LMW-PTP de *B. cenocepacia* que es secretada al medio extracelular y actúa como una proteína efectora, contribuyendo al retraso de la maduración fagosomal en macrófagos [7].

Los genes *bceD* y *bceF* se localizan dentro del operón *bce*, responsable de la biosíntesis del EPS denominado cepacian y conservado en la mayoría de las cepas de *Burkholderia*. No obstante, *B. cenocepacia* K56-2 no es capaz de producir dicho EPS debido a una eliminación de 11 pares de bases dentro del gen *bceB* [43]. Sin embargo, se ha reportado que la eliminación de *bceD* y *bceF* en *B. contaminans* (previamente *B. cepacia*) IST408 y en *B. cenocepacia* K56-2 afecta la formación de biopelícula [7, 43]. Al analizar el transcriptoma

de la cepa *B. contaminans* IST408 mutante del gen *bceF* se observaron alteraciones en la expresión de más de 600 genes, fenotípicamente esta cepa presentó afectaciones en la producción de EPS y biopelícula, la movilidad, la resistencia al estrés frente a la radiación UV y el calor y sobre la virulencia en *Galleria mellonella*. *B. contaminans* IST408 codifica al menos una segunda BY-cinasa, sin embargo de acuerdo con los resultados descritos, esta otra cinasa no puede compensar la actividad de BceF [44].

El gen que codifica para la BY-cinasa BCAM1331, se describió en la cepa *B. cenocepacia* H111 como parte de un grupo de genes (*BCAM1330* a *BCAM1341*) necesarios para la biosíntesis de un EPS todavía no caracterizado, pero que representa el principal componente de las biopelículas formadas por dicha cepa. Tanto BCAM1331 como BceF han sido detectadas como enzimas tirosina fosforiladas en *B. cenocepacia* K56-2 mediante inmunoreconocimiento con anticuerpos contra fosfotirosinas [43]. Además, en condiciones *in vitro*, se ha descrito que BceF puede ser desfosforilada por las LMW-PTP, BceD y BCAM0208.

Con respecto a BCAM0208 y BCAM0207 (presuntas LMW-PTP y BY-cinasa, respectivamente), los genes que los codifican se localizan en otro operón relacionado con la biosíntesis de EPS. Dicho operón se encuentra ampliamente extendido en el género *Burkholderia*, sin embargo, todavía no ha sido caracterizado. Al analizar la secuencia del producto de BCAM0207 en la cepa *B. cenocepacia* K56-2, se observó que la proteína resultante es de mayor tamaño comparada con el resto de las BY-cinasas (con 400 aminoácidos adicionales), además de carecer del motivo Walker B y de la región rica en tirosinas (YC). Esto es consecuencia de una eliminación de 2 nucleótidos en el codón 646 de BCAM0207, lo que modifica el marco de lectura y lo extiende 406 codones, por lo anterior es muy poco probable que el péptido resultante sea una BY-cinasa funcional [43].

Tanto BCAM0208 y BCAM1331, resultan necesarias para la formación de biopelículas en *B. cenocepacia*. Sin embargo, el papel de los EPS y las biopelículas en la patogénesis de *B. cenocepacia* en humanos no está claro, debido a que se ha asociado una pobre prognosis de pacientes con FQ infectados con aislados no mucoides de *B. cenocepacia*. Además, recientemente se reportó que las bacterias del Bcc no producen biopelículas durante las etapas tardías de la infección pulmonar en pacientes con FQ, manteniéndose más bien como células aisladas [45].

Por último, el gen que codifica la LMW-PTP BCAL2200 no se encuentra asociado a alguno de los operones involucrados en la biosíntesis de EPS. BCAL2200 está codificado dentro de una región altamente conservada en el género *Burkholderia*, presuntamente involucrada en la biosíntesis de los centros hierro-azufre [Fe-S]. Es importante mencionar que esta fosfatasa, diferente a BceD o BCAM0208, no contribuye en la formación de biopelículas y tampoco es capaz de desfosforilar la BY-cinasa BceF. Sin embargo, se reportó que BCAL2200 posee un rol importante en la adaptación de *B. cenocepacia* a condiciones de estrés ya que fue la única LMW-PTP necesaria para el crecimiento óptimo en condiciones limitantes de nutrientes [43]. Estos antecedentes indican que las tres LMW-PTP funcionales de *B. cenocepacia* no son redundantes y cubren funciones específicas, particularmente BCAL2200.

En este sentido la comparación de secuencias de enzimas LMW-PTP de diferentes bacterias evidenció que BCAL2200 (diferente a BceD y BCAM0208) tiene mayor similitud con las enzimas de la clase I. Con base en las diferencias funcionales que presentan estas enzimas se propone que existen aminoácidos conservados en el grupo de LMW-PTP pertenecientes a la clase I que les confiere una especificidad diferente en comparación con las enzimas de la clase II.

3. HIPÓTESIS

Aminoácidos conservados entre BCAL2200 de *Burkholderia cenocepacia* y las enzimas LMW-PTP clase I son relevantes para contender condiciones de estrés nutricional pero prescindibles para su actividad de fosfatasa.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar aminoácidos conservados en las enzimas LMW-PTP clase I y analizar su funcionalidad utilizando la proteína BCAL2200 de *Burkholderia cenocepacia*.

Objetivos Específicos

1. Realizar un análisis de secuencias para identificar aminoácidos conservados en las proteínas de la familia LMW-PTP.
2. Modificar los aminoácidos conservados de las enzimas LMW-PTP clase I en BCAL2200 mediante mutagénesis sitio dirigida.
3. Determinar la funcionalidad de las mutantes puntuales de BCAL2200 en la complementación del crecimiento de la cepa de *B. cenocepacia* $\Delta BCAL2200$ en medio mínimo.
4. Evaluar la actividad de fosfatasa *in vitro* de las mutantes puntuales de BCAL2200.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas

Todas las cepas utilizadas en este estudio se describen en la Tabla 1. Las bacterias se cultivaron a 37°C en medio Luria Bertani (LB, 10 g peptona, 5 g extracto de levadura, 10 g de NaCl) o en medio mínimo M9 (Difco) suplementado con 0.4% de glucosa (Sigma), 10 mM de MgSO₄ (Jalmek[®]) y 100 mM CaCl₂ (Jalmek[®]). Cuando se requirió, el medio se suplementó con tetraciclina [25 µg ml⁻¹], ampicilina [150 µg ml⁻¹], kanamicina [50 µg ml⁻¹] y polimixina B [25 µg ml⁻¹]. Todas las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se conservaron en medio LB con 15% de glicerol a -70 °C.

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en este estudio

Cepa	Descripción	Fuente/referencia
<i>Cepas de E. coli</i>		
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (λDE3)	Novagen
DH5α	F ⁻ φ 80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 thi-1 ΔgyrA96 relA1</i>	Stock de laboratorio
<i>Cepas de B. cenocepacia</i>		
K56-2	Aislado clínico del linaje IIIA, ET12 relacionada a la cepa epidémica J2315	[46]
ΔBCAL2000	K56-2 conteniendo una eliminación de <i>BCAL2200</i>	[43]

5.2 Manipulación del DNA

Purificación de DNA cromosómico

La purificación de DNA cromosómico de la cepa *B. cenocepacia* K56-2 se realizó mediante una extracción con fenol/cloroformo siguiendo la metodología reportada por Maniatis [47]. Brevemente, a partir de un cultivo de noche de *B. cenocepacia* K56-2 en medio LB

suplementado con ampicilina y las células se colectaron mediante centrifugación 16,200 gravedades (g) por 1 minuto. La pastilla se resuspendió en 600 μl de amortiguador de lisis (10mM Tris pH8.8, 10 mM EDTA pH 7.8, 1 % SDS) y se añadió 4 μl de proteinasa K [10 mg ml^{-1}], 4 μl de RNAasa [10 mg ml^{-1}], y 3 μl de lisozima [100 mg ml^{-1}]. La mezcla se incubó por 1 hora a 37 °C y posteriormente se añadió un volumen igual de una solución fenol/cloroformo (1:1), mezclando por inversión. A continuación, la mezcla se centrifugó a 16,200 g por 10 minutos a temperatura ambiente y la fase acuosa se separó cuidadosamente en un tubo nuevo. Se añadió un volumen igual de cloroformo, mezclando por inmersión y centrifugando a 16,200 g por 5 minutos. La fase acuosa se separó en un tubo nuevo y se adicionaron 3 volúmenes de etanol frío al 100 %. La mezcla se incubó a -70 °C por 30 minutos con el fin de precipitar el DNA y se centrifugó a 16,200 g por 15 minutos a 4 °C. Se realizó un lavado de la pastilla con 1 ml de etanol al 70 % y la pastilla resultante se secó a 60 °C durante 1 minuto. Por último, la pastilla se resuspendió en 30 μl de agua estéril y el DNA purificado se conservó a -20 °C.

Purificación de DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico se realizó utilizando el estuche comercial Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep (Jena Bioscience®) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, a partir de un cultivo de la cepa portadora del plásmido de interés en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, se colectaron las células mediante centrifugación 16,200 g. La pastilla se resuspendió en 300 μl de amortiguador de lisis proporcionado por el fabricante. Posteriormente se añadieron 300 μl de amortiguador de neutralización mezclando por inversión inmediatamente. La mezcla se centrifugó 10 minutos a 16,200 g. Entretanto la columna de centrifugación proporcionada por el fabricante se activó con 90 μl de amortiguador de activación. El sobrenadante posterior a la centrifugación se

transfirió a la columna previamente activada y se centrifugó a 16,200 g durante 1 minuto. El lavado de la columna se realizó en dos ocasiones. Para finalizar, el DNA se eluyó con 35 μ l de agua estéril precalentada a 50 °C.

En algunos casos la purificación de ADN plasmídico también se realizó mediante extracción por lisis alcalina siguiendo la metodología reportada por Birnboim y Doly [48]. Brevemente, a partir de un cultivo de la cepa portadora del plásmido de interés en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, se colectaron las células mediante centrifugación a 16,200 g a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 μ l de solución de lisis alcalina I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) en frío, agitando vigorosamente. Posteriormente se añadieron 200 μ l de solución de lisis alcalina II (0.2 N NaOH, 1% SDS) en frío, mezclando por inversión inmediatamente. A continuación, se añadieron 150 μ l de solución de lisis alcalina III (5 M acetato de potasio, 5 M ácido acético) en frío, mezclando por inversión y dejando reposar el tubo en hielo por 5 minutos. El lisado bacteriano se centrifugó a 16,200 g por 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se añadió un volumen igual de una solución fenol/cloroformo (1:1), mezclando por inversión y la emulsión se centrifugó a 16,200 g por 2 minutos a 4 °C. La fase acuosa se separó y se añadió un 1 volumen de isopropanol frío dejando reposar la mezcla por 2 minutos. La mezcla se centrifugó a 16,200 g 5 minutos a 4 °C eliminando el sobrenadante. Se realizó un lavado de la pastilla con 1 ml de etanol al 70 % y la pastilla resultante se secó a 60 °C durante 1 minuto. Para finalizar, la pastilla se resuspendió en 50 μ l de agua estéril y el DNA purificado se conservó a -20 °C.

En todos los casos la integridad del material genético se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa (AMRESCO®; Ohio, USA) al 1.2 %, teñidos con bromuro de etidio [10mg ml⁻¹] y se visualizaron en el fotodocumentador (MultiDoc-it™ 125 Imaging System, UVP).

Mutagénesis sitio dirigida del gen *BCAL2200*

El gen *BCAL2200* se amplificó mediante PCR a partir del DNA cromosómico de la cepa de *B. cenocepacia* K56-2, utilizando la DNA polimerasas High Fidelity (Jena Bioscience). Todos los oligonucleótidos utilizados y las temperaturas de alineamiento se describen en la Tabla 3.

Para la mutagénesis sitio dirigida se usó como templado el gen *BCAL2200*, previamente clonado en pDA17 (Tabla 2). Para la generación de cada una de las mutantes puntuales se utilizaron dos pares de oligonucleótidos, el primer par contiene la mutación que se desea introducir en su parte media y son oligonucleótidos complementarios entre sí (Tabla 3). El segundo par de oligonucleótidos (6008 y 6009) alinean al inicio y al final del gen *BCAL2200* y contienen una secuencia de corte para las enzimas de restricción *NdeI/XbaI* (Tabla 3). Se realizaron dos reacciones de PCR paralelas combinando los pares de oligonucleótidos mencionados previamente, originando dos fragmentos del gen *BCAL2200*. El primer fragmento codifica del inicio del gen hasta la región a mutagenizar, y el segundo fragmento codifica desde la región a mutagenizar hasta el final del gen. Posteriormente, dichos fragmentos se utilizaron como templado en una tercera reacción de PCR, usando los oligonucleótidos 6008 y 6009 (Tabla 3).

Los productos de PCR se purificaron utilizando un estuche comercial (Omega™) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, a la reacción de PCR se le añadieron 5 volúmenes de solución de amortiguador de unión y 0.4 volúmenes de isopropanol 100 %. La mezcla se colocó en una columna, proporcionada por el fabricante, y se centrifugó a 16,200 g durante 1 minuto. El sobrenadante se descartó y se realizaron 2 lavados con 700 µl de

amortiguador de lavado. El producto de PCR se eluyó en 50 µl de agua estéril precalentada a 50 °C y se conservó a -20 °C.

Clonación de mutantes puntuales del gen *BCAL2200* en el plásmido pDA17

Cada uno de los productos de PCR purificados correspondientes a las versiones mutantes puntuales de *BCAL2200* y el plásmido pDA17 (Tabla 2), se digirieron con las enzimas *NdeI* (Invitrogen) y *XbaI* (Invitrogen) a 37 °C durante 4 horas. Ambas enzimas se utilizaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los productos de estas digestiones se purificaron siguiendo el protocolo descrito para la purificación de las reacciones de PCR. Posteriormente, los productos digeridos y purificados se ligaron utilizando la enzima T4 ligasa (Invitrogen), en una relación 1:5 (vector: inserto) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las reacciones de ligación se incubaron a temperatura ambiente durante la noche.

Clonación de mutantes puntuales del gen *BCAL2200* en el plásmido pET28

Las construcciones en pET28 se generaron a partir de la amplificación por PCR usando como templado las construcciones previamente originadas en pDA17 (Tabla 2) y los oligonucleótidos 7271 y 7272 (Tabla 3). Los productos de PCR se purificaron de igual manera a como se describió anteriormente. Los productos de PCR purificados y el plásmido pET28, se digirieron con las enzimas *NcoI* (Jena Bioscience®) /*XhoI* (Invitrogen) a 37 °C durante 4 horas. Y posteriormente se purificaron como se describió para la purificación de las reacciones de PCR.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmidos	Descripción	Fuente
pDA17	Vector de expresión para <i>Burkholderia</i> , <i>oripBBR1</i> Tetr <i>mob Pdhfr</i> FLAG epitope	Daniel Aubert <i>et al.</i> , no publicado
pET28	Vector de expresión que fusiona una etiqueta de 6 histidinas en la región 3', <i>oripBBR1</i> Kan ^R <i>PT7</i>	[49]
pRK2013	<i>oricoleI</i> , RK2 derivative, Kan ^r <i>mob tra</i>	[50]
pL2200	Gen <i>BCAL2200</i> clonado en pDA17	[7]
pL2200 _{T44A}	pL2200 con la mutación puntual T44A	Este estudio
pL2200 _{W47A}	pL2200 con la mutación puntual W47A	Este estudio
pL2200 _{ΔW47}	pL2200 con la mutación puntual ΔW4A	Este estudio
pL2200 _{H48A}	pL2200 con la mutación puntual H48A	Este estudio
pL2200 _{D80A}	pL2200 con la mutación puntual D80A	Este estudio
pL2200 _{F81A}	pL2200 con la mutación puntual F81A	Este estudio
pL2200 _{D127A}	pAL2200 con la mutación puntual D127A	[43]
pL2200 _{F130A}	pL2200 con la mutación puntual F130A	Este estudio
pL2200 _{D141A}	pL2200 con la mutación puntual D141A	Este estudio
pL2200 _{C147A}	pL2200 con la mutación puntual C147A	Este estudio
pAT44	Gen <i>BCAL2200</i> clonado en pET28	[43]
pAT44 _{T44A}	pAT44 con la mutación puntual T44A	Este estudio
pAT44 _{W47A}	pAT44 con la mutación puntual W47A	Este estudio
pAT44 _{ΔW47}	pAT44 con la mutación puntual ΔW47	Este estudio
pAT44 _{H48A}	pAT44 con la mutación puntual H48A	Este estudio
pAT44 _{D80A}	pAT44 con la mutación puntual D80A	Este estudio
pAT44 _{F81A}	pAT44 con la mutación puntual F81A	Este estudio
pAT44 _{D127A}	pAT44 con la mutación puntual D127A	Este estudio
pAT44 _{F130A}	pAT44 con la mutación puntual F130A	Este estudio
pAT44 _{D141A}	pAT44 con la mutación puntual D141A	Este estudio
pAT44 _{C147A}	pAT44 con la mutación puntual C147A	Este estudio

El vector pET28 y los productos de PCR digeridos (*NcoI*/*XhoI*) y purificados se ligaron utilizando la enzima T4 ligasa (Invitrogen), en una relación 1:5 (vector: inserto) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las reacciones de ligación se incubaron a temperatura ambiente durante la noche.

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados y condiciones de amplificación por PCR

Oligo	Secuencia 5'-3'	Sitio de corte	T. A (°C)	Propósito
7506	5' GATCGATTTCGGCCGGCGCCGGCGACTGGCACGTG 3'	NA	80.3	Par para el cambio de T44A de BCAL2200
7507	5' CACGTGCCAGTCGCCGGCGCCGGCCGAATCGATC 3'	NA	80.3	
7508	5' CAGGTGAGCGCGGGCGTTCGAGCGGTTTCGATC 3'	NA	79.1	Par para el cambio de D80A de BCAL2200
7509	5' GATCGAACCCTCGAACGCCCGCGCTCACCTG 3'	NA	79.1	
7512	5' CTCGAACAGGTGCTCGCCAGGTCGAGCGCGCG 3'	NA	79.1	Par para el cambio de D141A de BCAL2200
7513	5' CGCGCGCTCGACCTGGGCGAGCACCTGTTTGAAG 3'	NA	79.1	
7514	5' CCAGTTCGAGCGCGGCCCGGGCCTGCTGGAG3'	NA	84.0	Par para el cambio de C147A de BCAL2200
7515	5' CTCCAGCAGGCCCGCGCCCGCGCTCGACCTGG 3'	NA	84.0	
7575	5' GCCGGCACCGGCGACGCGCACGTGGGCGAGCC 3'	NA	83.9	Par para el cambio de W47A de BCAL2200
7576	5' GGCTCGCCACGTGCGCGTCGCCGGTGCCGGC 3'	NA	83.9	
7577	5' GGCACCGGCGACTGGGCCGTGGGCGAGCCGCC 3'	NA	84.5	Par para el cambio de H48A de BCAL2200
7578	5' GGGCGGCTCGCCACGGCCAGTCGCCGGTGCC 3'	NA	84.5	
7579	5' GTGGCCGATCCGTATGCCGGCGGTGCGCAGGGC 3'	NA	80.8	Par para el cambio de F130A de BCAL2200
7580	5' GCCCTGCGCACCGCCGGCATAACGGATCGGCCAC 3'	NA	80.8	
001	5' CGGCCGGCACCGGCGACCACGTGGGCGAGCCGCC3'	NA	98.9	Par para la eliminación de ΔW47 de BCAL2200
002	5' GCGGCTCGCCACGTGGTTCGCCGGTGCCGGCCG 3'	NA	98.9	
003	5' GTGAGCGCGGGCGGATGCCGAGCGGTTTCGATCTG 3'	NA	91.2	Par para el cambio de F81A de BCAL2200
004	5' CAGATCGAACCGCTCGGCATCCGCCGCGCTCAC 3'	NA	91.2	
7271	5' TTTCCATGGCCCGGTTGCGATCTG 3'	<i>NcoI</i>	69.5	Alinea en el 5' de <i>BCAL2200</i>
7272	5' TTTCTCGAGGCGCGCCGTGCGGGCC 3'	<i>XhoI</i>	76.1	Alinea en el 3' de <i>BCAL2200</i>
6008	5' TTTCATATGACCCGCGTTGCGATC 3'	<i>NdeI</i>	68.0	Alinea en el 5' de <i>BCAL2200</i>
6009	5' TTTTCTAGAGCGCGCCGTGCGGGC 3'	<i>XbaI</i>	73.7	Alinea en el 3' de <i>BCAL2200</i>
7570	5'CGCAGCAGGGCAGTCGCCCT3'	NA	57.0	Par para realizar el escrutinio de clonas en pDA17
7571	5'ACTCTCGCATGGGGAGACCC3'	NA	57.0	
35	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	NA	53.4	T7 promotor
36	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'	NA	58.1	T7 terminador

5.3 Transformación

Preparación de células *E. coli* DH5 α electrocompetentes

Se realizó la siembra de la cepa *E. coli* DH5 α en agar LB, mediante estría cruzada, y se incubó a 37 °C durante 12 h. Posteriormente se tomaron colonias aisladas de los últimos dos cuadrantes y se resuspendieron en 1 ml de caldo LB. Esta suspensión se agregó a un matraz con 150 ml de caldo LB y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6. A continuación la suspensión bacteriana se centrifugó a 3000 g a 4 °C por 20 minutos. El sobrenadante se eliminó en condiciones de esterilidad y la pastilla se resuspendió con 100 ml de agua estéril fría. La suspensión se centrifugó nuevamente y se resuspendió con 50ml de agua estéril fría. Este último paso se repitió una vez más y posteriormente las células se resuspendieron con 10 ml de 20 % glicerol frío. La suspensión se centrifugó en las mismas condiciones y la pastilla se resuspendió con 1.5 ml de 20 % glicerol frío. Las células se alicuotaron y se congelaron inmediatamente a -70°C.

Electroporación de células *E. coli* DH5 α electrocompetentes

La electroporación de las células *E. coli* DH5 α se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito por Dower *et al.* con ligeras modificaciones [51]. Las células electrocompetentes *E. coli* DH5 α se descongelaron en hielo, se añadieron 2-3 μ l de plásmido o de la reacción de ligación y se incubaron en hielo durante 1 minuto. La mezcla se transfirió a celdas de electroporación frías y estériles. Posteriormente se aplicó un pulso eléctrico de 1800 V (Eppendorf® Electroporator 2510). Inmediatamente posterior al pulso eléctrico, se adicionaron 800 μ l de medio LB estéril y la suspensión se incubó por 1 hora a 37 °C con agitación. Finalmente, las células se sembraron en placas de agar LB suplementadas con tetraciclina [25 μ g ml⁻¹].

Preparación de células *E. coli* BL21 DE3 rubidiocompetentes

Se realizó la siembra de la cepa *E. coli* BL21 DE3 en agar LB mediante estría cruzada, y se incubó a 37 °C durante 12 h. Posteriormente se tomaron las colonias aisladas en los últimos dos cuadrantes y se resuspendieron en 1 ml de caldo LB. Esta suspensión se agregó a un matraz con 250 ml de caldo LB, el cual se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6 y se cosecharon a 4,830 g a 4 °C durante 10 minutos. A partir de este punto las células se mantuvieron en hielo. El sobrenadante de la centrifugación se descartó y la pastilla se resuspendió en 100 ml de TFB1 (100 mM RbCl, 50 mM MgCl₂, 30mM CH₃CO₂K, 10mM CaCl₂, 15 % glicerol). La suspensión celular se incubó durante 5 minutos y centrifugo a 4,830 g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 10 ml de la solución TFB2 (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15 % glicerol). Esta suspensión se incubó en hielo por 1 hora. Y las células se alicuotaron (80 µl) y se congelaron inmediatamente a -70 °C.

Transformación de células *E. coli* BL21 DE3 rubidiocompetentes

Las células *E. coli* BL21 DE3 rubidiocompetentes se descongelaron y se mantuvieron en hielo. Se adicionaron de 2-3 µl de los plásmidos construidos basados en pET28 (Tabla 2) y se incubaron en hielo durante 1 hora. Posteriormente se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos, seguido de una incubación a 4 °C durante 10 minutos y finalmente se añadieron 800 µl de caldo LB. Las células se recuperaron a 37 °C durante 1 hora en agitación, y se sembraron en placas de agar LB suplementadas con kanamicina [50 µg ml⁻¹].

Escrutinio de las células *E. coli* DH5 α y BL21 DE3 transformadas

Las colonias resultantes de la electroporación y transformación de las reacciones de ligación en los vectores pDA17 y pET28 se analizaron mediante PCR de colonia utilizando los pares de oligonucleótidos 7570-7571 y 35-36, respectivamente. Como controles negativos se utilizaron los plásmidos pDA17 y pET28 vacíos. Los productos de las reacciones de PCR se separaron en geles de agarosa al 1.2 %.

5.4 Secuenciación de las construcciones generadas

A partir de las clonas en pDA17 y pET28 identificadas como positivas se realizaron cultivos de toda la noche en caldo LB con tetraciclina [25 $\mu\text{g ml}^{-1}$] o kanamicina [50 $\mu\text{g ml}^{-1}$], respectivamente, y se siguió el procedimiento descrito para la purificación de DNA plasmídico. La incorporación de la mutación deseada y la integridad del gen clonado se verificaron mediante secuenciación tipo Sanger de DNA en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia de *BCAL2200* reportada por Holden [11].

5.5 Conjugación triparental

Las construcciones en pDA17 se movilizaron a *B. cenocepacia* (Δ BCAL2000) mediante conjugación triparental utilizando como cepa movilizadora a *E. coli* DH5 α portadora del plásmido pRK2013 (Tabla 2). Se prepararon cultivos de toda la noche en caldo LB suplementado con los antibióticos correspondientes de las cepas donadoras (portadoras de las construcciones en pDA17, Tabla 2), movilizadora y receptora (cepas de *B. cenocepacia*,

Tabla 1). Un ml de cultivo de la cepa donadora se centrifugo durante 5 minutos a 16,200 g, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 800 μ l de la cepa receptora y 500 μ l de la cepa movilizadora. La mezcla se centrifugó nuevamente y la pastilla resultante se resuspendió con 100 μ l de caldo LB. La suspensión celular se colocó en el centro de una placa de agar LB y se incubó durante la noche a 37 °C. Las bacterias resultantes se colectaron y resuspendieron, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 100 μ l de cada dilución en agar LB suplementado con tetraciclina [100 μ g ml⁻¹], ampicilina [150 μ g ml⁻¹] y polimixina B [12 μ g ml⁻¹].

5.6 Evaluación del crecimiento en condiciones limitantes de nutrientes

Las cepas transconjugantes de *B. cenocepacia* Δ BCAL2200 portadoras de las construcciones en pDA17 (Tabla 2), se sembraron en 4 ml de caldo LB suplementado con ampicilina [100 μ g ml⁻¹] y tetraciclina [100 μ g ml⁻¹] y se incubaron a 37 °C en agitación durante toda la noche. Al día siguiente, 1 ml de cada cultivo se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió con 1 ml de agua estéril, este paso se repitió en dos ocasiones con el fin de eliminar los antibióticos de la suspensión bacteriana. Posteriormente, las células se resuspendieron con 1 ml de medio M9 1x, suplementado con 0.4% de glucosa, [10 mM] MgSO₄ y [100 mM] CaCl₂. Se determinó la absorbancia de dicha suspensión y se ajustó el volumen a una absorbancia 600 nm de 0.04, se colocaron 300 μ l por pozo de cada suspensión bacteriana en una microplaca de 96 pozos estéril por triplicado. La microplaca se colocó en un crecínómetro (EPOCH², BioTek®) y el crecimiento bacteriano se evaluó a 37°C, durante 25 horas, en agitación, midiendo la absorbancia a la DO_{600nm} cada hora.

5.7 Inmunodetección tipo Western Blot

Se prepararon cultivos en medio M9 1X ajustados a una absorbancia 600 nm de 0.04 de las cepas transconjugantes de *B. cenocepacia* Δ BCAL2200 portadoras de las construcciones en pDA17 (Tabla 2) como se describió previamente. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 25 horas en agitación. Posteriormente, las células se centrifugaron a máxima velocidad durante 2 minutos. La pastilla celular se resuspendió con 50 μ l de PBS y la cantidad de proteínas se cuantificó mediante el método colorimétrico de Bradford (ver adelante). Se tomaron 250 μ g de cada una de las proteínas y se añadió amortiguador de carga SDS 1X (25mM Tris HCl, 20mM Glicina, 0.1% SDS) y 1 μ l de 2-mercaptoetanol. La suspensión se hirvió durante 5 minutos. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (P^{SQ}- Immobilon®) a 75 V durante 2 horas a 4 °C. Las membranas se bloquearon con una solución de leche semidescremada 5 % en 1X TBS-Tween (TBS 10X, 1% Tween® 20 SIGMA). Las membranas bloqueadas se lavaron 3 veces con 1X TBS-Tween durante 20 min y fueron incubadas con anticuerpo monoclonal anti-FLAG (SIGMA) diluido 1:15000 en 1X TBS-Tween durante 4 horas a 4 °C. Por último, las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-ratón acoplado a la peroxidasa de rábano (SIGMA) diluido 1:15000 en 1X TBS-Tween durante 4 horas a 4 °C. La inmunodetección se realizó con un estuche comercial (MILIPORE- Immobilon Western®), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

De manera paralela, se corrió un segundo gel de poliacrilamida al 15%, el cual fue teñido con azul de Coomassie por 30 minutos y posteriormente desteñido con ácido acético. Este gel se utilizó como control de carga de cada una de las muestras.

5.8 Purificación de proteínas recombinantes

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) portadora de los plásmidos construidos en pET28 (Tabla 2) se inocularon en 150 ml de caldo LB con kanamicina [$50 \mu\text{g ml}^{-1}$] a 37°C , en agitación constante. Al alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.7 se añadió IPTG (SIGMA) a una concentración final de 0.3 mM, y se continuó la incubación durante 4 horas más a 30°C . Las células se colectaron por centrifugación y se conservaron a -20°C . La pastilla se resuspendió en amortiguador de unión (BB) (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 M NaCl). Las células se rompieron mediante sonicación (SONIFIER 250, Branson) y posteriormente se centrifugaron a 16,200 g por 40 minutos a 4°C para desechar las membranas y las células intactas. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se incubó con 700 μl de resina (Amintra Ni-NTA Resin, expedeon™) pre-equilibrada con amortiguador BB, durante 1 hora a 4°C . La mezcla se transfirió a una columna y se lavó con 20 ml de amortiguador BB con 20 mM de imidazol, seguido de un lavado con 10 ml de amortiguador BB con 40 mM de imidazol y dos lavados con 6 ml de BB con 60 mM de imidazol. Las proteínas recombinantes se eluyeron con 700 μl de BB con 400 mM de imidazol. Las proteínas purificadas se dializaron en amortiguador TNED (50 mM Tris-Cl pH 7.6, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA y 1 mM DTT, AMRESCO®) y se mantuvieron a 4°C para su uso en los ensayos posteriores.

En todos los casos la pureza de las proteínas recombinantes se verificó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS (SDS-PAGE) mediante una tinción con azul de Coomassie.

5.9 Cuantificación de proteínas recombinantes

La concentración de las proteínas recombinantes se determinó con el método colorimétrico de Bradford (Bradford ULTRA Reagent®). Brevemente, se prepararon 6 estándares seriados de albumina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) con concentraciones conocidas (0, 50, 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$). En una microplaca de 96 pozos, se colocaron por triplicado 10 μl de cada uno de los estándares de BSA y posteriormente 10 μl de cada una de las proteínas recombinantes purificadas. A continuación, se añadieron 150 μl del reactivo de Bradford en cada uno de los pozos y se leyó la absorbancia a una $\text{DO}_{595\text{nm}}$, en un lector de absorbancias de placas (iMark™ BIORAD). Con las lecturas de absorbancias obtenidas para los estándares se obtuvo una curva patrón de BSA. La concentración de las proteínas recombinantes purificadas se determinó sustituyendo los valores de absorbancia en la curva patrón.

5.10 Actividad de fosfatasa

Para este ensayo se utilizó como sustrato p-NPP [4mM] (SIGMA®) siguiendo la metodología descrita por Andrade *et al.* con ligeras modificaciones [43]. Brevemente, se prepararon mezclas de reacción, las cuales contenían en un volumen final de 700 μl ; 10 μg de proteína purificada y dializada en 20 mM Tris pH 7.0, 5 mM MgCl_2 y 1 mM DTT incubando a 37 °C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de NaOH para alcanzar una concentración final de 0.2 N, y se midió la absorbancia a 405 nm. La concentración de p-NPP obtenida se estimó usando un coeficiente de extinción molar de $1.78104 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y la actividad de fosfatasa para cada sustrato se calculó a partir de la pendiente obtenida en los análisis del curso de tiempo.

5.11 Análisis bioinformático de secuencias

La búsqueda de LMW-PTP homólogas, se realizó utilizando la herramienta bioinformática Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando como secuencias semilla la secuencia de las proteínas BCAL2200 de *B. cenocepacia* y Wzb de *Escherichia coli*. A partir de esta búsqueda se realizó el análisis de secuencias e identificación de aminoácidos conservados, mediante alineamientos de secuencias múltiples, con el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>).

5.12 Modelaje de la proteína BCAL2200

El modelaje tridimensional de BCAL2200 se realizó con el servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) [43], utilizando como templado la estructura de la proteína PtpA de *S. aureus* (PDB: 3ROF), o la estructura de VcLMWPTP-1 de *Vibrio cholerae* (PDB: 4LRQ). La visualización de los modelos obtenidos y de las estructuras cristalográficas se realizó con el programa PyMOL (Schrödinger).

5.13 Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron repetidos al menos en tres ocasiones independientes. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism 5, utilizando la distribución t de Student. Para las curvas de crecimiento se calculó el área bajo la curva de cada una de las gráficas obtenidas y se realizó un análisis de varianza de ANOVA con prueba de Dunnett aplicando una $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación de aminoácidos conservados en LMW-PTP

Se realizó la búsqueda de secuencias homólogas, utilizado como secuencia semilla, la secuencia de la proteína BCAL2200. Se estableció como punto de corte el valor E máximo de $1e-90$. Además, se realizó la búsqueda manual de secuencias de LMW-PTP previamente caracterizadas.

Las secuencias homólogas obtenidas se analizaron mediante un alineamiento de secuencias múltiples y posteriormente se identificaron aminoácidos conservados en las LMW-PTP de clase I. Los aminoácidos identificados como conservados en las enzimas de la clase I fueron (de acuerdo con la secuencia de BCAL2200); treonina 44(T44), triptófano 47 (W47), histidina 48 (H48), aspartato 80 (D80), fenilalanina 81 (F81), fenilalanina 130 (F130), aspartato 141 (D141) y cisteína 147 (C147) (Figura 4). Estos ocho aminoácidos se seleccionaron para intercambiarlos por alanina, adicionalmente debido a que en las LMW-PTP clase II no presentan un aminoácido equivalente al W47, se decidió también construir una mutante de BCAL2200 carente de dicho residuo.

LMW-PTP clase II	LMWPTP_Dyj	-----MFKRILIVCGNICRSPTAEYLFRRHLSAAGA-----SIESAGLGA-LVGKPMDAQALQILGHEGVDGSEHRARQTSASMLRDADLVLAMEREHVASLMRMAPEAS-GKV	103
	LMWPTP_Rhsp	-----MFERILIVCMGNVCRSPTAEYLFRRHSKSRV-----SFSSAGLCA-PAGRPMDS TALQLAESGIDGMHRRARQLTPLMLREADLVLGMEKSQVEAMMQLAPETR-GKV	103
	LMWPTP_Prr	-----MFNHILVCMGNICRSPTGERLLQYFPEK-----TVHSSAGIISA-KNDRPAYDSAIRIAQQHLSLENHQSRRLTSELCKKTDLILVMEKSHIAKIHQLFPETR-GKV	101
	LMWPTP_Edt	MTNNDALFKTMFKKILIVCIGNICRSPTGEYLLRQLRITDR-----HISSAGIISA-RVGEPADTLAAEVAQQHGLMTGHCARQLTRALCQDADLILVMEKSHISAVASIDPSAR-GKT	111
	LMWPTP_Kla	-----MFNKILVVCVGNICRSPTAERLLRSHLPSL-----TVESAGLGA-LVGKAADRAASVAAEHAIISLDGHCARQTSGRMCREYDILAMEKRHIATLHEMAPEMR-GKV	101
	LMWPTP_Enh	-----MFNKILVVCVGNICRSPTAERLLKRYQPAL-----TVDSAGLGA-LVGKGADRAASVALEHNLSDGHVARQVSGRMCREYDILAMEKRHIHALCDIAPEMR-GKV	101
	PTP_Esc	-----MFNHILVVCVGNICRSPTAERLLQRYHPEL-----KVESAGLGA-LVGKGADPTAISVAAEHQLSLEGHCARQTSRRLCRNYDILLMEKRHIERLCEMAPEMR-GKV	101
	LMWPTP_Sae	-----MFNKILVVCVGNVCRSPTAERLLKRFHPSL-----TVASAGLGA-LVGKGADPAASVANAHDLSENHCARQTSAPLCREYDILLMEKRHIAALCDIAPEMR-GKV	101
	LMWPTP_Shs	-----MFESILIICTGNICRSPTAERLLRSKITNR-----KIDSAGTGA-LVGFPDHSATIKVSEKNGYLSLEGHKATQFSKLGROYDILVMEKHNIEQISNIAPPEAR-GKT	101
	LMWPTP_Klp	-----MFNSILVCTGNICRSPIGERLLRTFLPGK-----KIDSAGTGA-LIDHSADES AIRVASLHGISLKEHHARQFTSSLGRQYDILVMEKHHLSEIGKIAPPEAR-GKT	101
	BCAM0208_Buc	-----MPTPPFLLAVCEGNVCRSPAALAAKLAALPHA-----RTGSAGLAP-PNGRPADPLARDMAAARGLNLDHAARPVTAALCAQADLIFVMDGQRRALEARHFLR-GRV	104
	BceD_Buc	-----MFRNILLVCHANVCRSPAAMFLKSHAASRGGPR-P-TFHSAGVHA-NDGGIDPVMRQLLAERGVDATTHRSRRLSRRIVRDADLILVSEREQITKAVESVDFPFR-GRV	106
	LMWPTP_Cag	-----MFGSVLIVCHANVCRSPAAMFLFRAHLHERGATP-I-EFQSGAGLYA-MEGDDIDPTMYRLLAEGQVDPGSHRRARRDRRMAAADLILVPERKQITAIARLEPTR-GKV	106
	LMWPTP_Acb	-----IKNILVVCIGNICRSPTAEYLFKQYYPQL-----NIESAGISG-LIGHQADEKAQLCMQRLGIDMQSHIARKLNAELIKKADLILVMSNNQKHIEQITWPAK-GKT	100
	LMWPTP_Cut	-----MIKTVLVVCIGNICRSPTAEGLLRQALPEG-----EVVSAGLGA-LSGHAADPHAVDLMRQGVDSIGHRAQQLNHLIRRADLILVMDAAQRIEQLRHPATT-GRV	101
LMWPTP_Nisp	-----MFNKILIVCIGNICRSPTAEGLLQKQIAELGKAD-C-FVCSAGLHA-LVGHSAADPKACQLMIKKGIDISGHRAQQLNMEMIRKADLILVMEFSQKIIIEEKPESSK-GKV	106	
PTP_Sta	-----AYF-QGMVDVAFVCLGNICRSPTAEIMRQRLKDRNIHD-I-KVHSRGTGSNHLGEPHGETQKILNKHNIIPFDGMISELFE--ATDDFDYIVAMDQSNVDNIKSINPNLKGQLF	110	
LMWPTP_Sta	-----MVDVAFVCLGNICRSPTAEIMRQRLKDRNIHD-I-KVHSRGTGSNHLGEPHGETQKILNKHNIIPFDGMISELFE--ATDDFDYIVAMDQSNVDNIKSINPNLKGQLF	105	
LMWPTP_Vic	-----MQKVLVCMGNICRSPTAEAVLRAKA--AQLKVDVE-VDSAGTIGYHGNPDPDARSKAAGEKRGYFSFGIKARKIRDEDEKVKFDWILAADQENLAELKARCPQSQHQKL	106	
LMWPTP_Psa	-----MRVLFVCLGNICRSPTAEGVFRKVEEAGLASRIH-VDSAGTGANHVGEPDTRAQAARTRGYDLSLARARQVSAADFERFDLLAMDEANLAELRRRCPPAHRDKV	107	
LMWPTP_Pax	-----MKTVSIKFCVCLGNICRSPTAEVMRRLVGEARLAELHIE-IDSAGTGANHVGEPDTRAQAARTRGYDLSLARARQVSAADFERFDLLAMDEANLAELRRRCPPAHRDKV	110	
PTP_Bum	-----MTRVAICFVCLGNICRSPTAEGVMRHQVDAAGLADHIE-IDSAGTGANHVGEPDTRAQAARTRGYDLSLARARQVSAADFERFDLLAMDEANLAELRRRCPPAHRDKV	110	
BCAL2200_Buc	-----MTRVAICFVCLGNICRSPTAEGVMRHQVDAAGLADHIE-IDSAGTGANHVGEPDTRAQAARTRGYDLSLARARQVSAADFERFDLLAMDEANLAELRRRCPPAHRDKV	110	
LMWPTP_Bup	-----MSGCT-MKSVAIKFCVCLGNICRSPTAEGVMRHQVAAAGLDGATIE-IDSAGTGANHVGEPDTRAQAARTRGYDLSLARARQVSAADFERFDLLAMDEANLAELRRRCPPAHRDKV	115	
LMWPTP_But	-----MKSVAIKFCVCLGNICRSPTAEGVMRHQVAAAGLDVAIE-IDSAGTGANHVGEPDTRAQAARTRGYDLSLARARQVSAADFERFDLLAMDEANLAELRRRCPPAHRDKV	110	
LMWPTP_Myt	-----M-SDPLHVTFCVCLGNICRSPTAEKMFQQLRHRGLDADR-ITSAGTGANHVGSCADERAAGVLRHAGVPTD-HRAAQVGTHELA-ADLLVALDRNHARLLRQLGVEA--ARV	107	
LMWPTP_Tth	-----M-DRPVRVLFVCLGNICRSPTAEKIFRLLKERGLDRFE-VDSAGTGANHVGEPDTRARRVLEEGAYFP-HVARLITREVDLAYHILVMDRENLEEVLRFPPEARAKV	110	
LMWPTP_Spo	-----M-TKNIQVLFVCLGNICRSPTAEAVFRNEVEKAGLEARFDTIDSCGTAHNVGNRPDPTLEVLKKNIGIHTK-HLARKLSTSDKFNFDYIFAMDSNLRINRVPQGSRAKV	111	
LMWPTP_Sce	-----MTIE-KPKISVAFICLGNICRSPTAEKIFKHEVEKANLENRNFKIDISFGTANHVGESPDHRTVSIKQKGVKIN-HKKGQIKTKHDEYDYIIGMDESNNLKKIQPEGSKAKV	114	

LMWPTP_Dyj	MLLDRWGE-----GGDIPDPYRQSRFAFDHVYQLIDRAVQSHLPYL-----	144
LMWPTP_Rhsp	YLLDKWLN-----GDDIPDPYRQRTAFEVYHEMIAGVDSH-----	140
LMWPTP_Prr	MLFGQWLN-----KTEIPDPHKRSDEMFEHVYQLMEKAATAWQCKI-----	142
LMWPTP_Edt	MLFGHWISG-----ESEVPDPYRLSREAYEHVYALLERGDASWAKKL-----	152
LMWPTP_Kla	MLFGHWDN-----EREIPDPYRKSREAFVAVYQLLDRSASQWAQAL-----	142
LMWPTP_Enh	MLFGHWDS-----EREIPDPYRKSREDFEAVYTLDDQSARQWAQAL-----	142
PTP_Esc	MLFGHWDN-----ECEIPDPYRKSRETFEAVYTLLEERSARQWAQALNAEQV-----	147
LMWPTP_Sae	MLFGHWDS-----EREIPDPYRKSREAFVAVYTLLEERSARQWAQAL-----	142
LMWPTP_Shs	MLLGHWIG-----MKEIPDPYRKSDEAFESVYQLIEESCQCWAKLGR-----	144
LMWPTP_Klp	MLFGHWLN-----DREIPDPYRKSDEAFESVYQLIEQASKAWAEKLAS-----	144
BCAM0208_Buc	FRLGEYARIADG-APLGLDIPDPYRGTRODFRCAALIDLAVGSWLPRLAARPHITASFSGFQS	168
BceD_Buc	HLLGKWEG-----AEIADPHGGPEADYRESYSLIERLVQGNLQKLC-----	147
LMWPTP_Cag	HLLGKWED-----SEVADPYGGHETAYRESFGLIERLVGLNKLIC-----	147
LMWPTP_Acb	YRLGHWN-----KNVPDPYQHEQAVFDETCQLIQCVADW-----	136
LMWPTP_Cut	FRLGELEK-----FDVPDPYRQRAAFESALQLIQGVESWVPRIRALG-----	145
LMWPTP_Nisp	FRLGEWGR-----FDIADPYQKELLVFEQSLTLIERGVFQWISKL-----	146
PTP_Sta	K-LLEFSN-----MEESVDPDPYIT--NMFEGVYDMLSSCDNLIIDYIVKDANLKG-----	158
LMWPTP_Sta	K-LLEFSN-----MEESVDPDPYIT--NMFEGVYDMLSSCDNLIIDYIVKDANLKEG-----	154
LMWPTP_Vic	SLMLSHSD-----SEYQIIPDPYI--GGERGFELVLDLVEDAAEQFLKLRKQGGQH-----	155
LMWPTP_Psa	DLFLRRYG-----SERDEVDPYI--GGEEGFQVLDLIEHADRLLEAKGRL-----	154
LMWPTP_Pax	RLLMFVPETEARWGGAREVDPYI--GGADGFQVLDQCEAAARGLIARLRLQA-----	165
PTP_Bum	RLLMFAPGA-----SETEVADPYI--GGAQGFQVLDQVERACEGLDTRLRARLAR-----	160
BCAL2200_Buc	RLLMFAPGA-----TETEADPYI--GGAQGFQVLDQVERACAGLLETLRARLAR-----	160
LMWPTP_Bup	RLLMFAGDG-----SAGDIADPYI--GGARGFQVLDQCEAAARGLLDSLRRETAR-----	164
LMWPTP_But	RLLMAYAGDG-----SAGEIADPYI--GGARGFQVLDQCEAAARGLLESRLRETAR-----	159
LMWPTP_Myt	RMLRSFDPRSG-----THALDVEDPYI--GDHSDFEEVFAVIESALPGLHDWDERL--ARNGPS-----	163
LMWPTP_Tth	LVLEELG-----GGEVQDPYI--GDLEDFEVYVTLLEAALQAFLDHRGSPSPAAGRA-----	161
LMWPTP_Spo	MLFGEYASP-----GVSKIVDDPYI--GSDGFQDCYIQLVDFSQNFKLSIA-----	156
LMWPTP_Sce	CLFGWNTNDG---TVQTIIEDPWIGDIQDFEYFKQITYFSKQFLKKE-----	161

Figura 4. Alineamiento de secuencias múltiples de LMW-PTP e identificación de aminoácidos conservados (en gris) en las LMW-PTP clase I. Djy (*Dyella japonica*), Rhsp (*Rhodanobacter sp.*), Prr (*Providencia rettgeri*), Edt (*Edwardsiella tarda*), Kla (*Kluyvera ascorbata*), Enh (*Enterobacter hormaechei*), Esc (*Escherichia coli*), Sae (*Salmonella entérica*), Shs (*Shigella sonnei*), Klp (*Klebsiella pneumoniae*), Buc (*Burkholderia cenocepacia*), Cag (*Caballeronia glathei*), Acb (*Acinetobacter baumannii*), Cut (*Cupriavidus taiwanensis*), Nisp (*Nitrosomonas sp.*), Sta (*Staphylococcus aureus*), Vic (*Vibrio cholerae*), Psa (*Pseudomonas aeruginosa*), Pax (*Paraburkholderia xenovorans*), Bum (*Burkholderia multivorans*), Bup (*Burkholderia pseudomallei*), But (*Burkholderia thailandensis*), Myt (*Mycobacterium tuberculosis*), Tth (*Thermus thermophilus*), Spo (*Schizosaccharomyces pombe*) y Sce (*Streptomyces coelicolor*).

6.2 Purificación de DNA

Se realizó la purificación de DNA cromosómico de la cepa *B. cenocepacia* K56-2 mediante extracción con fenol-cloroformo. También se purificó el plásmido pDA17 utilizando un estuche comercial (Jena Bioscience). Ambos purificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, observándose íntegros y libres de RNA (figura 5). Se obtuvo una concentración estimada de DNA cromosómico y DNA plasmídico de 970.5 y 255.3 ng μl^{-1} respectivamente.

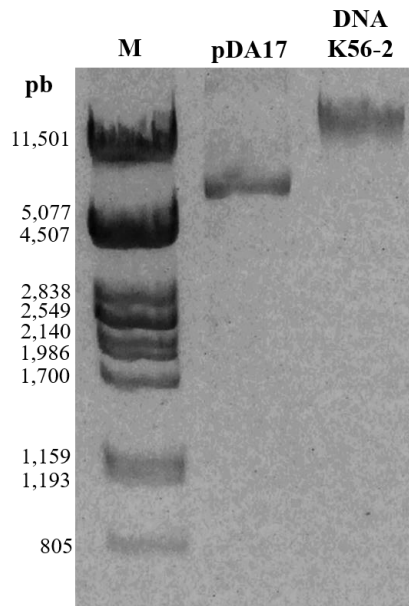


Figura 5. Purificación de DNA cromosómico de *B. cenocepacia* K56-2 y plásmido pDA17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Se utilizó λ /Pst como marcador de peso molecular (M). El tamaño de las diferentes bandas se indica en pares de bases (pb).

6.3 Construcción de versiones mutantes puntuales de BCAL2200

Se utilizó una estrategia basada en tres reacciones de PCR (ver material y métodos) para realizar la incorporación de los cambios en los aminoácidos seleccionados. A continuación, se describe el procedimiento realizado para la mutante puntual F81A. Se utilizó como templado DNA cromosómico de la cepa de *B. cenocepacia* K56-2. Se realizaron dos reacciones de PCR paralelas, utilizando los oligonucleótidos 6008/004 y 003/6009 (Tabla 3), los productos obtenidos presentaron un tamaño correspondiente al esperado 255pb y 265pb respectivamente (Figura 6, carril 1 y 2). Posteriormente, dichos productos se utilizaron como templado en una tercera reacción de PCR, usando los oligonucleótidos 6008 y 6009. El

producto obtenido de esta tercera reacción corresponde al gen *BCAL2200* completo (520 pb) con la sustitución del codón 81 por alanina (Figura 6, carril 3).

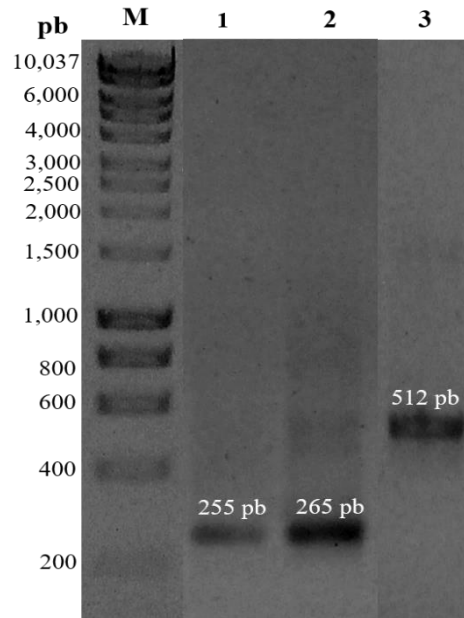


Figura 6. Productos de PCR generados durante la mutagénesis sitio dirigida del codón 81 del gen *BCAL2200*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Marcador de peso molecular 1 Kb (M). El tamaño de las diferentes bandas se indica en pares de bases (pb).

El procedimiento descrito se realizó para mutagenizar por alanina cada uno de los aminoácidos seleccionados (T44, W47, H48, F81A, F130A, D141A y C147A), utilizando los oligonucleótidos correspondientes (Tabla 3). Las mutaciones puntuales construidas fueron: T44A, W47A, H48A, F81A, F130A, D141A, C147A. Una estrategia semejante se siguió para la eliminación del triptófano 47 (Δ W47), en este caso en el par de oligonucleótidos mutagénicos se eliminó el codón correspondiente (Tabla 2). Para la mutación puntual D80A no se consiguió amplificar el producto correspondiente a pesar de realizar diversas modificaciones en las condiciones de la reacción de PCR, por esta razón dicha mutación se excluyó de las evaluaciones posteriores.

Los productos de PCR de *BCAL2200* generados con las diferentes mutaciones puntuales, y el plásmido pDA17 purificado, fueron digeridos con las enzimas *NdeI/XbaI* y ligados usando la enzima T4 ligasa.

Las construcciones fueron transformadas en células rubidiocompetentes de *E. coli* DH5 α y las colonias resultantes fueron analizadas mediante PCR utilizando el par de oligonucleótidos 7570/7571 (Tabla 3) para identificar las colonias portadoras del fragmento clonado. Para la mutante puntual F81A se utilizó como control positivo la construcción pL2200 (Tabla 2) (Figura 7). La colonia portadora del fragmento clonado amplificó un fragmento de tamaño similar al control positivo (Figura 7, carril pL2200 y C). El resto de las colonias analizadas mediante PCR (Figura 7, carril A-B y D-H) no poseen el fragmento clonado por lo que fueron descartadas. Este procedimiento se realizó para cada una de colonias obtenidas en la transformación de las diferentes reacciones de ligación.

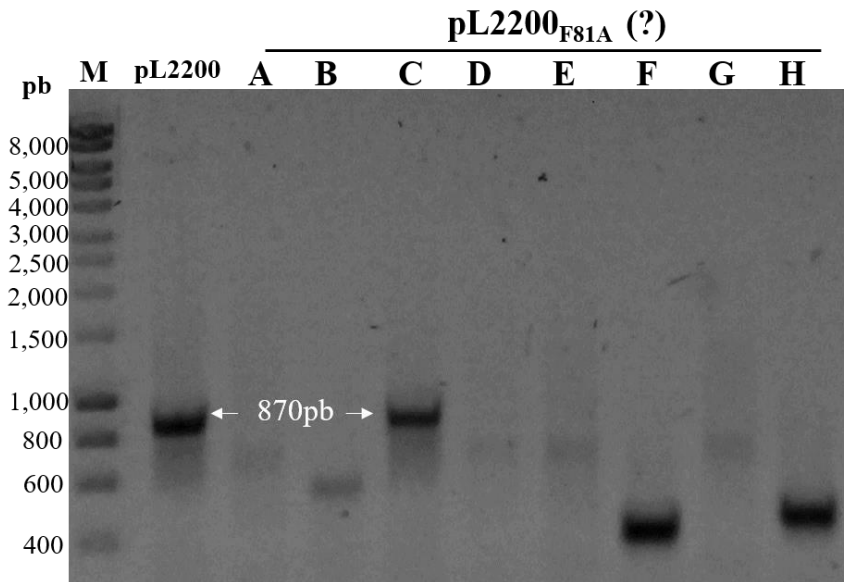


Figura 7. Análisis de colonias portadoras del fragmento clonado mediante PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Se utilizó 1Kb como marcador de peso molecular (M). El tamaño de las diferentes bandas se indica en pares de bases (pb).

Una vez identificadas las clonas positivas para las diferentes clonaciones se purificó el DNA plasmídico de cada una de éstas y se procedió a su secuenciación. Todas las construcciones realizadas en este estudio se verificaron por secuenciación tipo Sanger, se corroboró la incorporación de la mutación deseada (Figura 8), así como la integridad del gen *BCAL2200*. Una vez confirmada la mutación puntual en las diferentes versiones de *BCAL2200*, se llevó a cabo la conjugación triparental (ver material y métodos) en la cepa de *B. cenocepacia* mutante para el gen *BCAL2200* (Δ BCAL2000).

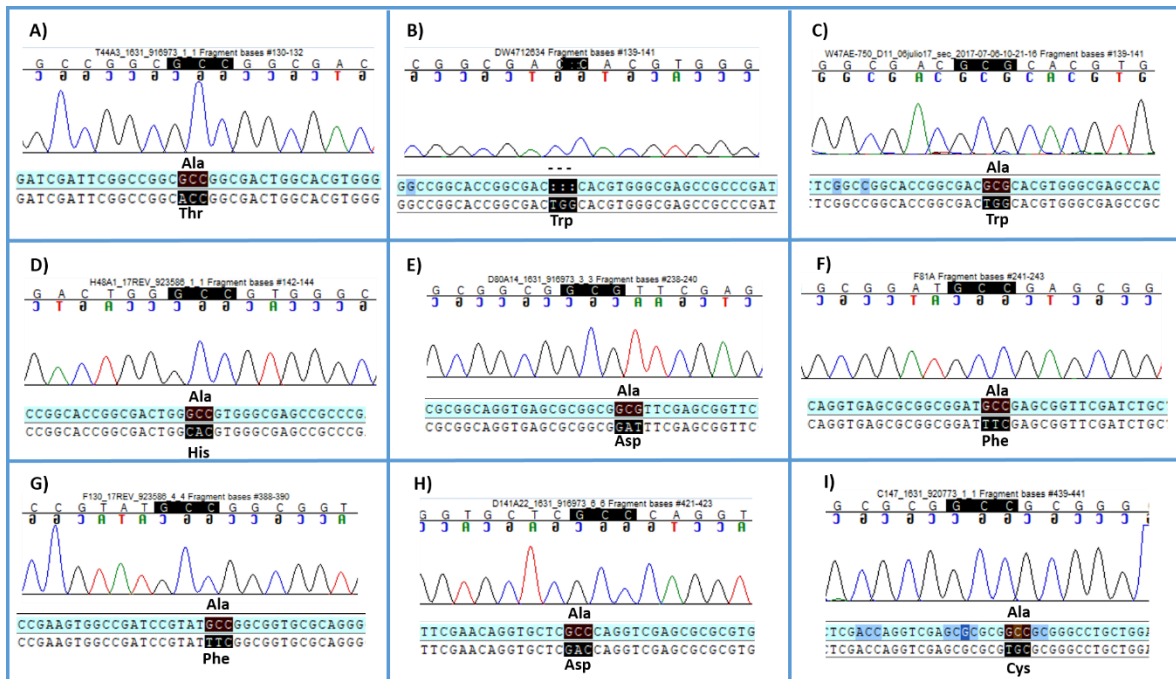


Figura 8. Cromatogramas de secuenciación de las diferentes mutantes puntuales de *BCAL2200*. En cada uno de los recuadros se muestra la sustitución del codón: A) T44A; B) Δ W47; C) W47A; D) H48A; E) D80A; F) F81A; G) F130A; H) D141A; I) C147A.

6.4 Funcionalidad de las mutantes puntuales de BCAL2200 en la complementación del crecimiento en medio mínimo.

Se evaluó el crecimiento de las cepas transconjugantes de *B. cenocepacia* mutante en *BCAL2200* (Tabla 4) en condiciones limitantes de nutrientes (ver material y métodos). Como controles positivo y negativos se utilizaron las cepas de *B. cenocepacia* Δ BCAL2200, conjugada con el plásmido pL2200 (WT), y con los plásmidos pDA17 y pL2200_{D127A}, respectivamente. Consistente con lo reportado previamente [43] la cepa Δ BCAL2200-pDA17 y la mutante catalítica Δ BCAL2200-pL2200_{D127A}, mostraron una tasa de crecimiento significativamente reducida en comparación con la cepa WT (Figura 9A).

La complementación de *B. cenocepacia* Δ BCAL2200 con las mutantes puntuales T44A, F130A, D141A y C147A fue semejante a la complementación con el gen silvestre (Figura 9B). En contraste, la tasa de crecimiento resulto significativamente reducida cuando la complementación se realizó con las versiones de BCAL2200 W47A, Δ W47, H48A y F81A (Figura 9A). Los resultados obtenidos para dichas mutantes puntuales son comparables con los controles negativos utilizados (pDA17 y pL2200_{D127A}, Figura 9A).

Con el fin de comprobar que el defecto en el crecimiento observado para las versiones mutantes de BCAL2200 W47A, Δ W47, H48A y F81A, no se debía a la falta de expresión de la proteína correspondiente, se evaluó la presencia de las proteínas recombinantes mediante inmunoreconocimiento, como se describe en material y métodos.

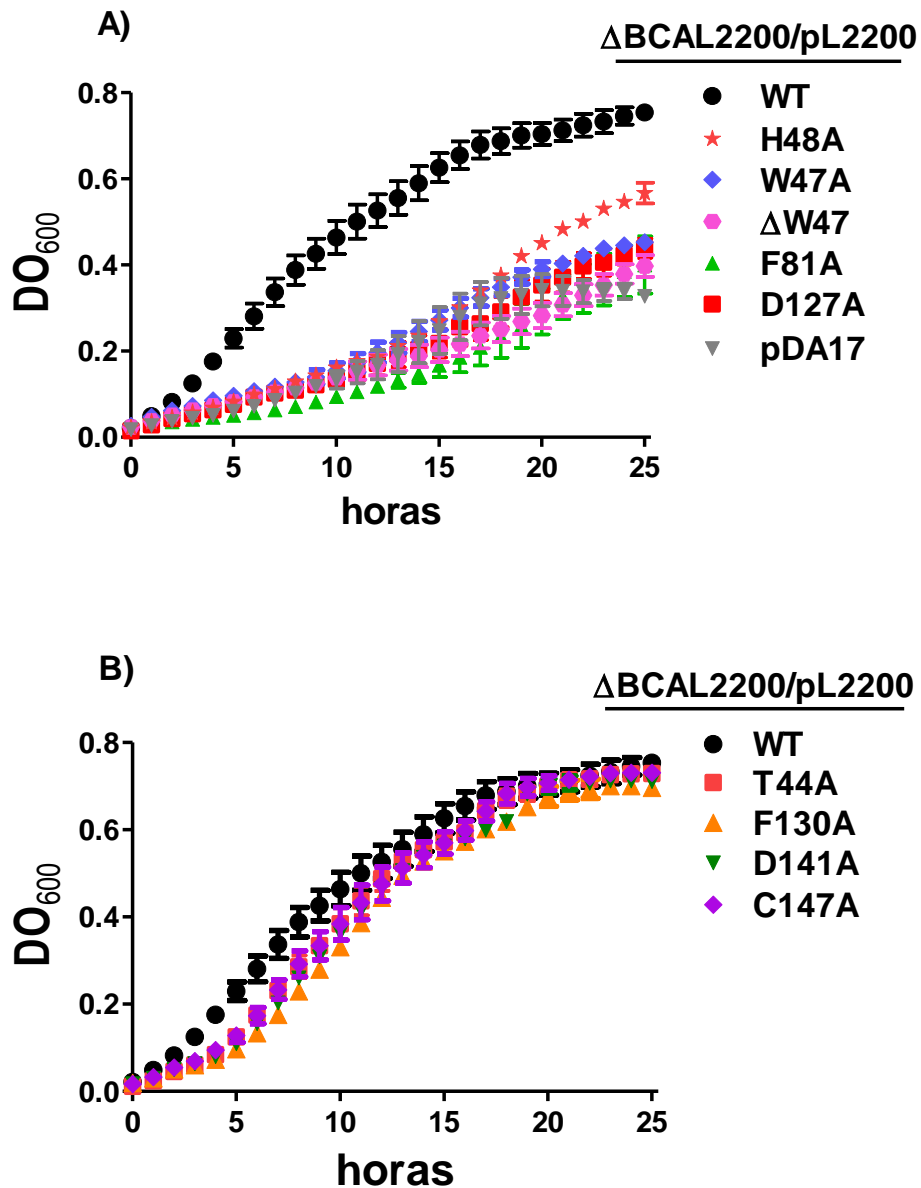


Figura 9. Curvas de crecimiento a 37°C de las versiones mutantes de BCAL2200 en medio mínimo. A) Mutantes puntuales de BCAL2200 que mostraron un defecto significativo en su crecimiento en comparación con la cepa WT. B) Mutantes puntuales de BCAL2200 que se comportaron semejante a la cepa WT. Los datos representan la media \pm DS de al menos tres experimentos independientes y fueron analizados mediante un análisis de varianza ANOVA con prueba de Dunnett, aplicando una $p < 0.05$.

La señal identificada utilizando los anticuerpos contra la etiqueta FLAG demostró que todas las versiones mutantes puntuales de BCAL2200, incluyendo las mutantes que presentaron una tasa de crecimiento reducida (W47A, Δ W47, H48A y F81A), se producen bajo las

condiciones analizadas (Figura 10A). No obstante, la señal en las mutantes puntuales de BCAL2200 F81A y F130A se observó disminuida (Figura 10 A). Para corroborar que la cantidad de proteínas separadas en cada carril fuera semejante, una réplica del gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomassie (Figura 10 B).

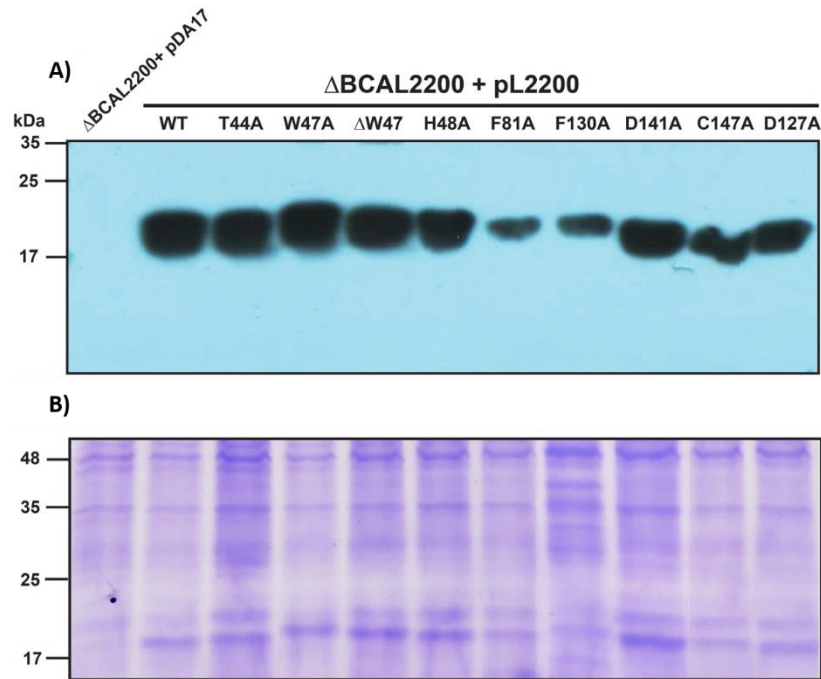


Figura 10. Evaluación de las proteínas recombinantes BCAL2200 mediante Western blot. A. Inmunoreconocimiento de las versiones mutantes de BCAL2200, transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpo anti α -FLAG (1:15,000). B. SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie. Las masas moleculares se indican a la derecha de las figuras.

6.5 Evaluación de la actividad de fosfatasa *in vitro* de las mutantes puntuales de BCAL2200.

Para evaluar nuestra hipótesis que los cambios realizados en la LMW-PTP BCAL2200 no afectan la actividad enzimática, se clonaron las versiones mutantes del gen *BCAL2200* en pET28. Cada versión mutante puntual del gen se amplificó mediante PCR usando como templado las construcciones previamente originadas en pDA17 (Tabla 2) y el par de oligonucleótidos 7271/ 7272 (Tabla 3). Los productos de PCR obtenidos y el plásmido

pET28 purificado (Figura 11, carril 1), fueron digeridos con las enzimas *NcoI/XhoI* (Figura 11, carril 2) y ligados usando la enzima T4 ligasa.

Estas construcciones fueron transformadas en células rubidiocompetentes de *E. coli* DH5 α y las colonias resultantes fueron analizadas mediante PCR utilizando el par de oligonucleótidos 35/ 36 (Tabla 3) para identificar las colonias portadoras del fragmento clonado.

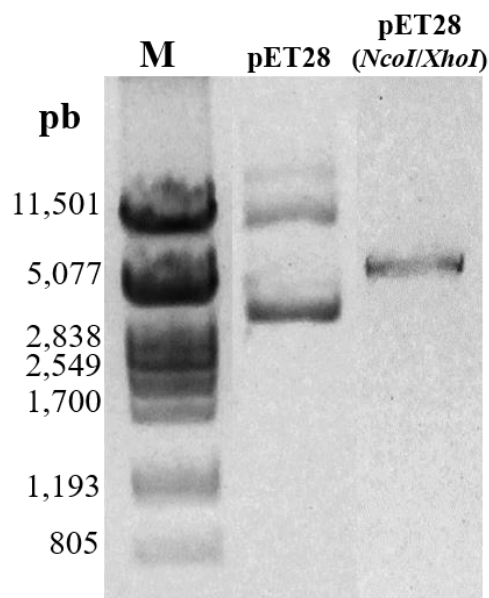


Figura 11. Purificación del plásmido pET28 y digestión *NcoI/XhoI*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Se utilizó λ /Pst como marcador de peso molecular (M). El tamaño de las diferentes bandas se indica en pares de bases (pb).

La integridad de cada versión de BCAL2200 clonado se corroboró mediante secuenciación. Posteriormente, las construcciones basadas en pET28 se transformaron en células electrocompetentes BL21 (DE3), para la sobreexpresión y purificación de las proteínas recombinantes de BCAL2000 correspondientes.

La sobreexpresión de las proteínas recombinantes y su posterior purificación se realizó mediante una cromatografía de afinidad por níquel, como se describió anteriormente (ver material y métodos). Todas las versiones recombinantes de BCAL2200 purificadas se dializaron y cuantificaron (ver material y métodos). Se obtuvo un rendimiento promedio de

160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína BCAL2200 WT. El rendimiento fue semejante para las diferentes versiones mutantes de la proteína BCAL200, excepto para la mutante puntual F81A, en la que el rendimiento obtenido fue de 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual es consistente con lo observado en la Figura 12.

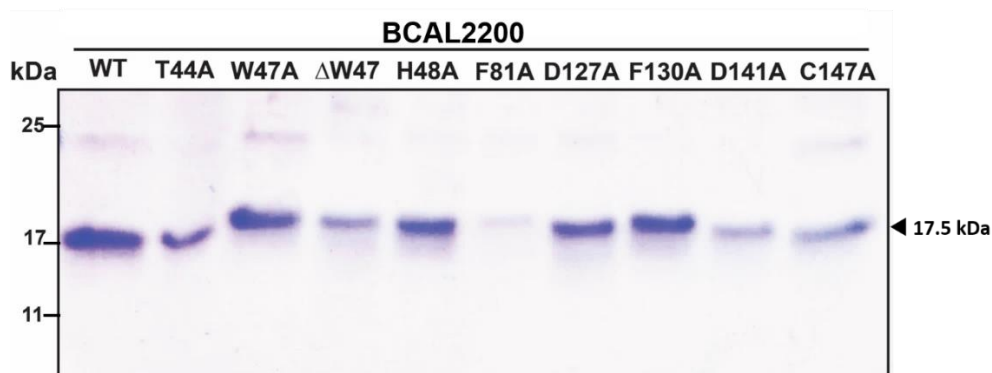


Figura 112. Versiones recombinantes de la proteína BCAL2200 purificadas. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE (15%) y se tiñeron con azul de Coomassie. Las masas moleculares se indican a la derecha.

Las proteínas recombinantes de BCAL2200 purificadas y dializadas, se evaluaron en ensayos de actividad de fosfatasa *in vitro*, utilizando p-nitrofenol fosfato como sustrato (Figura 13).

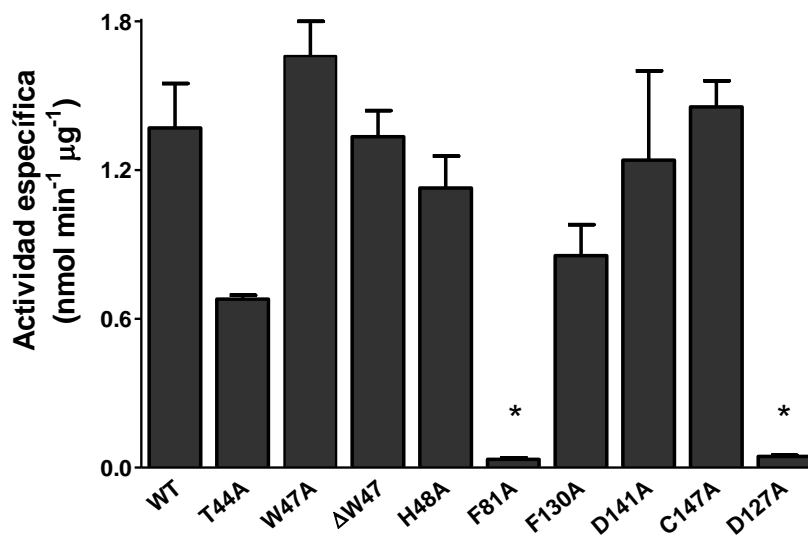


Figura 13. Evaluación de la actividad de fosfatasa *in vitro* de las versiones mutantes purificadas de la proteína BCAL2200 a 37°C usando p-nitrofenol fosfato como sustrato. Los datos representan la media \pm DS de al menos tres experimentos independientes, analizados mediante distribución t de Student, * p < 0.05.

De acuerdo con la hipótesis planteada, los resultados obtenidos indican que los cambios en BCAL2200 W47A, Δ W47, H48A F130A, D141A y C147A no presentaron diferencias significativas en comparación con la actividad de fosfatasa de la enzima silvestre (Figura 13). Al contrario, BCAL2200 con la mutación puntual T44A presentó una disminución significativa de la actividad de fosfatasa, mientras que la mutación F81A resultó en la pérdida completa de la actividad enzimática, comportándose de manera semejante a la mutante catalítica, D127A (Figura 13).

6.6 Modelaje tridimensional de la proteína BCAL2200.

Con el objetivo de ubicar espacialmente los aminoácidos mutagenizados en este estudio, se realizaron modelos tridimensionales de la proteína BCAL2200 (Figura 14). El modelaje se realizó con el servidor SWISS-MODEL y se visualizó con el programa PyMOL (Ver material y métodos).

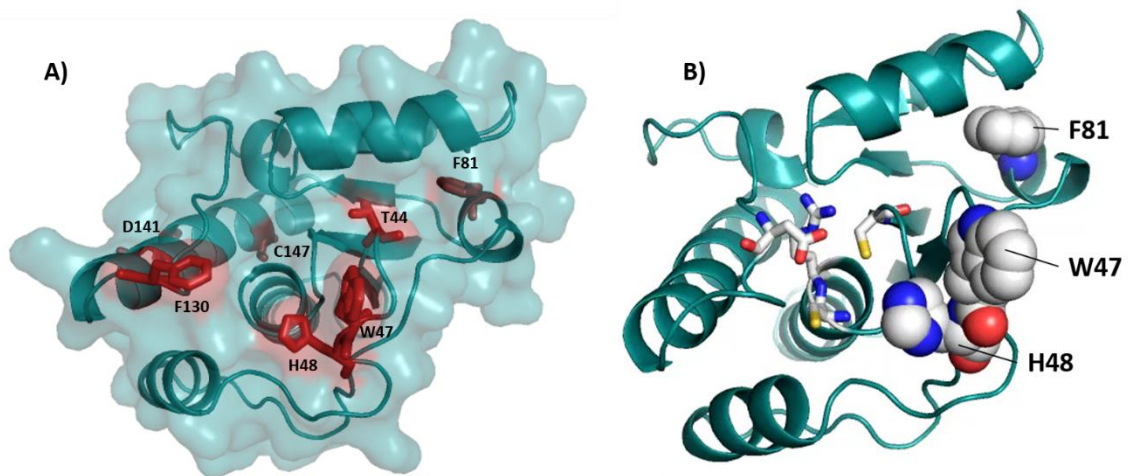


Figura 14. Modelaje tridimensional de la proteína BCAL2200. (A) La proteína se representa en listones y se incluye la superficie. En barras rojas se muestran los diferentes residuos identificados como conservados en las LMW-PTP clase I. (B) En esferas se muestran los aminoácidos importantes para la complementación del crecimiento y en barras los aminoácidos catalíticos. En (A) y (B) el modelaje se realizó con la proteína VcLMWPTP-1 de *V. cholerae* (4LRQ) como templado.

El modelo obtenido evidenció que los aminoácidos identificados como conservados se encuentran distribuidos en diferentes regiones de la enzima, destacan los residuos T44, W47, H48 y F130 por su orientación y cercanía al sitio activo (Figura 14 A). De acuerdo con nuestros resultados y las estructuras tridimensionales reportadas para otras enzimas LMW-PTP, es muy factible que los residuos W47 y H48 se encuentren expuestos en la superficie de BCAL2200, componiendo una especie de puerta de acceso al sitio activo (Figura 14 B). El tercer amino ácido que presento fenotipo en la complementación en medio mínimo, F81 se ubicó en nuestro modelo al interior de la estructura de la proteína, en una región apartada del sitio catalítico de la enzima (Figura 14 B).

7.0 DISCUSIÓN

B. cenocepacia pertenece al complejo Bcc, un grupo bacteriano que destaca por ocasionar infecciones oportunistas y por presentar una alta resistencia a la mayoría de los antibióticos usados en la clínica. De las infecciones asociadas al Bcc, *B. cenocepacia* es la especie que se aísla con mayor frecuencia, principalmente de individuos inmunocomprometidos y de pacientes con fibrosis quística. Diferentes factores de virulencia se han descrito en las especies del Bcc, sin embargo se reconoce su capacidad de adaptación y gran versatilidad metabólica como factores cruciales para su persistencia y el establecimiento de una infección crónica. De acuerdo con lo anterior, reportes recientes en especies del Bcc indican una contribución de la fosforilación en tirosinas en la resistencia a condiciones de estrés, producción de EPS, la fisiología y en la virulencia [35, 52]. No obstante, los mecanismos de señalización y las proteínas substratos de dicha modificación postraducciona l todavía se desconocen.

B. cenocepacia posee tres enzimas homólogas de la familia LMW-PTP; BceD, BCAM0208 y BCAL2200. A pesar de la gran similitud de secuencia que presentan estas tres fosfatasa s, sabemos que no son funcionalmente redundantes [43]. Por estas razones, el presente trabajo se fundamentó en entender las bases moleculares que dictan la especificidad de función de las enzimas LMW-PTP de *B. cenocepacia*. Los resultados obtenidos, evidenciaron que BceD y BCAM0208 pertenecen a las LMW-PTP clase II (grupo predominante en bacterias Gram negativas), mientras que BCAL2200 se agrupa junto con las enzimas de la clase I (LMW-PTP encontradas principalmente en eucariontes). El análisis de múltiples secuencias de enzimas LMW-PTP pertenecientes a las clases I y II nos permitió identificar aminoácidos conservados exclusivamente en las enzimas de la clase I. En este sentido y de acuerdo con lo reportado por Ewen Lescop *et al.*, una característica distintiva de estas fosfatasa s (clase I) es

la presencia de un aminoácido aromático en el asa W (W47 en BCAL2200), aminoácido que contacta directamente los sustrato a desfosforilación [41, 53]. Dicho residuo aromático se ha estudiado principalmente en fosfatasas eucariontes. En la LMW-PTP, BPTP de bovino, se ha propuesto que la naturaleza hidrofóbica y la orientación del W49 resulta importante para el reconocimiento de diferentes sustratos [53]. De manera semejante, en las LMW-PTP, HCPTPA (humano) y MptpA (*M. tuberculosis*) el residuo aromático (Y49 y W48, respectivamente), se localiza sobre el sitio catalítico formando una hendidura hidrofóbica que se propone sitúa el anillo imidazólico de la tirosina fosforilada [54-56]. Por el contrario, las LMW-PTP clase II, carecen de un residuo aromático equivalente, y por consiguiente su asa W resulta un residuo más corta y se modifica el mecanismo de reconocimiento de los sustratos [53].

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran la importancia del residuo aromático del asa W en las LMW-PTP clase I de procariontes. La eliminación o sustitución por alanina del W47 de BCAL2200, resultó en una enzima incapaz de complementar el crecimiento de la cepa *B. cenocepacia* Δ BCAL2200 en condiciones limitantes de nutrientes, a pesar de no presentar alteraciones en su actividad de fosfatasa. Adicionalmente, evidenciamos que el aminoácido consecutivo a este residuo aromático (W47), también se encuentra conservado, generalmente corresponde a una histidina (H48 en BCAL2200), y su sustitución por alanina deriva en un fenotipo semejante a una mutación del residuo aromático, ocasionando la pérdida de función de BCAL2200 sin alterar la actividad enzimática.

Un modelo tridimensional de BCAL2200 sugiere que el W47 se localiza expuesto en la superficie de la proteína, cercano al sitio catalítico y que la orientación de este residuo depende del residuo consecutivo, la histidina 48 (Figura 15A). La disimilitud de la región que contiene el asa W, entre las enzimas clase I y II, resulta notoria al comparar el modelo

de BCAL2200 con la estructura de Wzb (Figura 15). En BCAL2200 (LMW-PTP clase I) se forma una hendidura en la parte superior del motivo catalítico, que es flanqueada por al menos dos aminoácidos aromáticos, W47 y F130 (Figura 15A). Por el contrario, en Wzb (LMW-PTP clase II) solo se encuentra uno de estos dos residuos aromáticos, Y117, y en la posición equivalente al aromático del asa W se localiza el residuo no polar L40 (Figura 15A). Cabe mencionar que esta L40, se ha reportado como importante para la interacción de Wzb con la BY-cinasa, Wzc [53].

El residuo F130 de BCAL2200 se ubica en el asa D (asa que contiene el aspartato catalítico), y común a todas las enzimas clase I, posterior al aspartato catalítico se encuentran dos aminoácidos aromáticos consecutivos (Y129 y F130 en BCAL2200). En contraste, en las LMW-PTP clase II sólo se encuentra conservado el primer residuo aromático del asa D (Y117, en Wzb). Aparentemente, en las enzimas clase I, el segundo aminoácido aromático del asa D (W134 en LTP1, y Y131 en HCPTPA y BPTP), participa en la estabilización del sustrato, mediante una interacción tipo π con el anillo aromático de la fosfotirosina [53, 56]. Sin embargo, en BCAL2200 el intercambio por alanina del aminoácido correspondiente (F130) no afectó la funcionalidad de la proteína, por lo que es probable que en ausencia de la F130 el aromático adyacente, la Y129 mantenga la interacción tipo π con el sustrato fosforilado.

Adicional a los residuos aromáticos de las asas W y D, se ha reportado que la especificidad de las enzimas LMW-PTP por sus sustratos, también se encuentra influenciada por la distribución de carga de la región que circunda el sitio activo y que alteraciones en la carga de dicha zona alteran la afinidad de la enzima por el sustrato [53, 55, 57]. Al comparar la distribución de cargas de BCAL2200 y Wzb, observamos que la primera tiene un

componente electronegativo en la región inferior del asa W, mientras que la región correspondiente en Wzb no presenta una carga neta (Figura 15C y D).

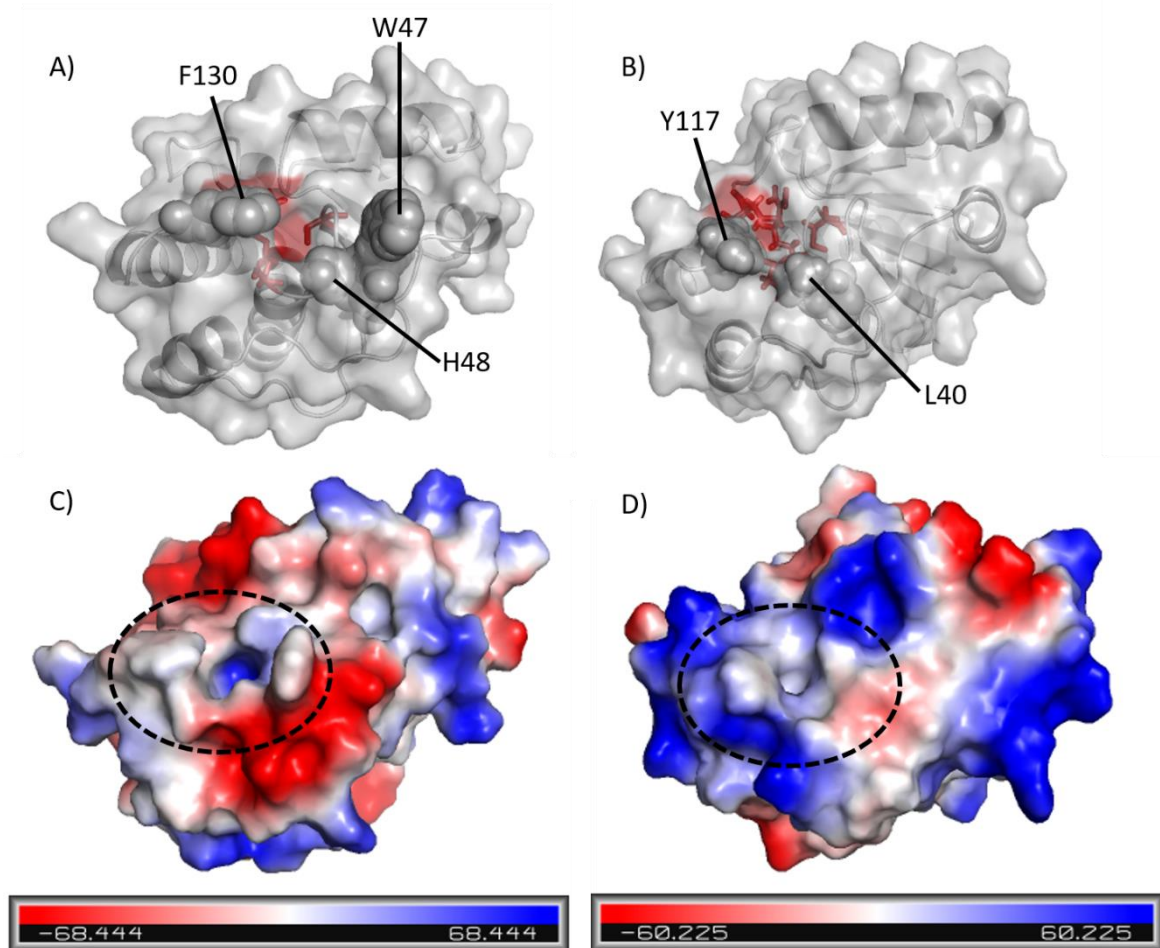


Figura 15. Comparación de la superficie proteica entre una LMW-PTP clase I y clase II. Modelo de BCAL2200 sobre 4LRQ. B. Estructura de Wzb (2FEK), en rojo los aminoácidos catalíticos. C-D. Vista del sitio activo que muestra las distribuciones de carga superficial de C) BCAL2200 y D) Wzb. Las regiones cargadas positivamente se muestran en azul, con carga negativa en rojo y las regiones sin carga en blanco. La superficie cercana al motivo catalítico se enmarca en un ovalo.

Por otra parte, el cambio en BCAL2200 de la F81 por alanina resultó también en una versión incapaz de complementar el crecimiento en condiciones limitantes de nutrientes, en una señal disminuida en el inmunoreconocimiento de esta proteína y se obtuvo el rendimiento de purificación más bajo en comparación con la enzima WT y el resto de las versiones mutantes

puntuales. Además, BCAL2200 F81A presentó una actividad enzimática abatida, semejante a la mutante catalítica D127A, dicho resultado inesperado (junto con el resto de los resultados obtenidos para la mutante puntual F81A), nos sugieren que el residuo F81 puede ser crítico en la conformación y estabilidad de la proteína. Al analizar la estructura tridimensional de la LMW-PTP clase I, VcLMWPTP-1 de *V. cholerae*, enzima que comparte la fenilalanina (F77) correspondiente a F81 en BCAL2200, observamos que la cadena lateral de este residuo se localiza al interior de la proteína y que establece una interacción de tipo hidrofóbica con la L94 (L98 en BCAL2200), dicho aminoácido no polar esta conservado en todas las LMW-PTP. Además de una interacción de tipo electrostática con la H102 (H106 en BCAL2200) (Figura 16). Lo anterior apoya la hipótesis de un papel de F81 en la estabilidad de BCAL2200, sin embargo, se requiere realizar otras evaluaciones para confirmar dicha hipótesis.

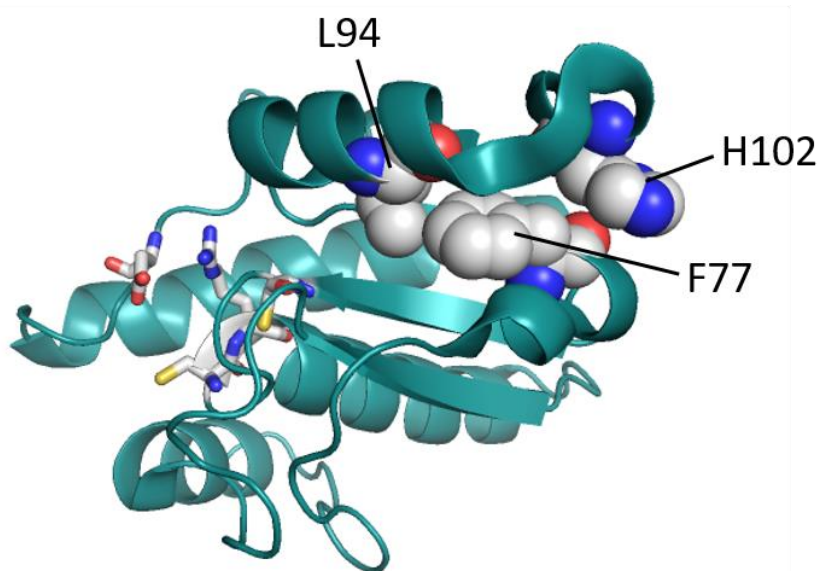


Figura 16. Estructura de VcLMWPTP-1 de *V. cholerae* (4LRQ). En esferas se muestran los aminoácidos que interaccionan con F77 (F81 en BCAL2200) para la complementación del crecimiento y en barras los aminoácidos catalíticos.

Para finalizar, se observó que el cambio en BCAL2200 de T44 por alanina presentó una disminución significativa de la actividad de fosfatasa en comparación con la proteína WT. Sin embargo, la disminución en la actividad enzimática en esta versión mutante de BCAL2200, no afectó la capacidad de complementar el crecimiento en condiciones limitantes de nutrientes, lo que sugiere que una baja actividad de fosfatasa de BCAL2200 es suficiente para llevar a cabo su función al menos durante el crecimiento en medio mínimo. En las LMW-PTP eucariontes, BPTP (bovina) y LTP1 (*Saccharomyces cerevisiae*), se ha reportado que una serina conservada (S41 en BCAL2200) establece puentes de hidrógeno con la asparagina conservada (N13 en BCAL2200) contenida en el motivo catalítico, C(X)₅R del asa P. Estas interacciones cumplen una función estructural permitiendo que el asa P adopte la geometría más favorable durante la unión del fosfato del sustrato [58, 59]. Por lo que sugerimos que el defecto observado en la actividad enzimática de BCAL2200 T44A, puede deberse a alteraciones en los puentes de hidrógeno y en la geometría del asa P.

7. CONCLUSIONES

- En función de la secuencia de aminoácidos, las enzimas LMW-PTP se pueden subdividir en dos grupos, LMW-PTP Clase I (encontradas principalmente en eucariontes) y LMW-PTP Clase II (grupo predominante en bacterias Gram negativas). BceD y BCAM0208 pertenecen a las LMW-PTP clase II, mientras que BCAL2200 se agrupa junto con las enzimas de la clase I.
- Se identificaron 8 aminoácidos conservados en las LMW-PTP clase I.
- El intercambio de los aminoácidos de BCAL2200, W47, H48, así como la eliminación del W47, afecta el crecimiento de *B. cenocepacia* en condiciones limitantes de nutrientes, y este fenotipo no está relacionado con cambios en la actividad enzimática
- La localización del residuo aromático (W47) y del residuo consecutivo (H48) en el asa W de las LMW-PTP clase I, indica que estos residuos están expuestos en la superficie de la proteína cercanos al sitio activo, donde podrían representar el punto de acceso/reconocimiento de las proteínas substrato a ser desfosforiladas.
- El cambio F81A en BCAL2200 provoca la pérdida de la actividad de fosfatasa y la funcionalidad de la enzima. Los resultados aquí obtenidos además de la localización estructural de este residuo sugieren un papel en la conformación y estabilidad de la proteína.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Mahenthiralingam, E., A. Baldwin, and C.G. Dowson, *Burkholderia cepacia complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology*. J Appl Microbiol, 2008. **104**(6): p. 1539-51.
2. Mahenthiralingam, E., T.A. Urban, and J.B. Goldberg, *The multifarious, multireplicon Burkholderia cepacia complex*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(2): p. 144-56.
3. Tom Coenye, P.V., John R. W. Govan and John J. Lipuma, *Taxonomy and Identification of the Burkholderia cepacia Complex*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2001. **39**: p. 3427–3436
4. Leo Eberl, P.V., *Members of the genus Burkholderia: good and bad guys*. F1000 Faculty Reviews, 2016. **5**: p. 1-10.
5. Torres, E.R.G.L.a.A.G., *The art of persistence—the secrets to Burkholderia chronic infections*. Pathogens and Disease, 2016. **74**(6).
6. Bazzini, S., C. Udine, and G. Riccardi, *Molecular approaches to pathogenesis study of Burkholderia cenocepacia, an important cystic fibrosis opportunistic bacterium*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **92**(5): p. 887-95.
7. Andrade, A. and M.A. Valvano, *A Burkholderia cenocepacia gene encoding a non-functional tyrosine phosphatase is required for the delayed maturation of the bacteria-containing vacuoles in macrophages*. Microbiology, 2014. **160**(Pt 7): p. 1332-45.
8. Peter H. Gilligan, G.L., Peter A. R. Vandamme, Susan Whittier, *Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Brevundimonas, Coamamonas, Delftia, Pandoraea and Acidovorax*, in *Manual of Clinical Microbiology*, A. press, Editor 2015: Washington. p. 791-812.
9. Antonio Teri, S.S., Arianna Biffi, Daniela Girelli, Monica D'Accico, Milena Arghittu, Carla Colombo, Fabiola Corti, Giovanna Pizzamiglio, Lisa Cariani *Molecular typing of Burkholderia cepacia complex isolated from patients attending an Italian Cystic Fibrosis Centre*. New Microbiologica, 2018. **41**(2), 141-144.
10. Loutet, S.A. and M.A. Valvano, *A decade of Burkholderia cenocepacia virulence determinant research*. Infect Immun, 2010. **78**(10): p. 4088-100.
11. Holden, M.T., et al., *The genome of Burkholderia cenocepacia J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients*. J Bacteriol, 2009. **191**(1): p. 261-77.
12. Jorge H. Leitão, S.A.S., Ana S. Ferreira, Christian G. Ramos, Inês N. Silva, Leonilde M. Moreira, *Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against Burkholderia cepacia complex pathogens and related species*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **87**:3: p. 1–40.
13. James E. A. Zlosnik, L.C.G.a.D.P.S., *Serum susceptibility in clinical isolates of Burkholderia cepacia complex bacteria: development of a growth-based assay for high throughput determination*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2012. **2**: p. 1-10.
14. Carla P.Coutinho, S.C.d.S., Andreia Madeira, Nuno P. Mira, Ana S. Moreira and Isabel Sá-Correia, *Long-term colonization of the cystic fibrosis lung by Burkholderia cepacia complex bacteria: epidemiology, clonal variation, and genome-wide expression alterations*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2011. **1**(12): p. 1-12.

15. Kay A. Ramsay, C.A.B., Stuart Paynter, Robert S. Ware, Timothy J. Kidd, Claire E. Wainwright, Scott C. Bella, *Factors Influencing Acquisition of Burkholderia cepacia Complex Organisms in Patients with Cystic Fibrosis*. Journal of Clinical Microbiology 2013. **51(12)**: p. 3975–3980.
16. Fiona E. Clode, M.E.K., Henry Malnick and Tyrone L. Pitt, *Distribution of Genes Encoding Putative Transmissibility Factors among Epidemic and Nonepidemic Strains of Burkholderia cepacia from Cystic Fibrosis Patients in the United Kingdom* Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38(5)**: p. 1763–1766.
17. Juyan Zhou, Y.C., Setareh Tabibi, Luis Alba, Elizabeth Garber, and Lisa Saiman, *Antimicrobial Susceptibility and Synergy Studies of Burkholderia cepacia Complex Isolated from Patients with Cystic Fibrosis*. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 2007. **51(3)**: p. 1085-1088
18. Napoleón González-Saldaña, H.G.H.-O., José Luis Castañeda-Narváez, Patricia Barbosa-Arzate, Esther Lombardo-Aburto y José Antonio Girón-Hernández, *Brotos de Burkholderia cepacia en el Instituto Nacional de Pediatría*. Acta Pediátrica de México 2008. **29 (4)** p. 185-188.
19. Carla P. Coutinho, C.C.C.R.d.C., Andreia Madeira, Ana Pinto-de-Oliveira and Isabel Sa´-Correia, *Burkholderia cenocepacia Phenotypic Clonal Variation during a 3.5-Year Colonization in the Lungs of a Cystic Fibrosis Patient*. INFECTION AND IMMUNITY, 2011. **79 (7)**: p. 2950–2960.
20. April S. Gislason, K.T., 2 Mike Domaratzki³ and Silvia T. Cardona^{4,*}, *Comparative analysis of the Burkholderia cenocepacia K56-2 essential genome reveals cell envelope functions that are uniquely required for survival in species of the genus Burkholderia*. Microbial Genomics 3, 2017. **3**: p. 1-18.
21. Jaroslav Nunvar, V.C., Karel Fiser, Libor Fila, Pavel Drevinek, *What matters in chronic Burkholderia cenocepacia infection in cystic fibrosis: Insights from comparative genomics*. PLoS Pathogens, 2017. **13(12)**.
22. Callaghan, S.M.a.M., *Burkholderia cepacia complex: epithelial cell– pathogen confrontations and potential for therapeutic intervention*. Journal of Medical Microbiology 2009. **58**: p. 1-12.
23. Regan KH, B.J., *Eradication therapy for Burkholderia cepacia complex in people with cystic fibrosis*. Cochrane Database of Systematic, 2016(11).
24. Umadevi S Sajjan, L.S., Richard Golstein and Janet F. Forstner, *Cable (Cbl) Type II Pili of Cystic Fibrosis-Associated Burkholderia (Pseudomonas) cepacia: Nucleotide Sequence of the cblA Major Subunit Pilin Gene and Novel Morphology of the Assembled Appendage Fibers*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1995 **177(4)**: p. 1030–1038.
25. Valvano, M.A., et al., *Molecular mechanisms of Burkholderia cepacia complex intracellular survival in phagocytic cells*, in *From Genomes to Function*, T. Coeyne and E. Mahenthiralingam, Editors. 2014, Horizon Scientific Press: Norwich, UK.
26. Valvano, M.A., *Intracellular survival of Burkholderia cepacia complex in phagocytic cells*. Can J Microbiol, 2015: p. 1-9.
27. Ivan Mijakovic, C.G.a.K.T., *Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems*. FEMS Microbiology Reviews, 2016. **40**: p. 398–417.
28. Joel A. Cain, N.S., Stuart J. Cordwell, *Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria*. JOURNAL OF PROTEOMICS, 2014. **97**: p. 265-286.

29. Macek, I.M.B., *Impact of phosphoproteomics on studies of bacterial physiology*. FEMS Microbiology Reviews, 2012. **36** p. 877–892.
30. Grangeasse, C., S. Nessler, and I. Mijakovic, *Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1602): p. 2640-55.
31. Grangeasse, C., et al., *Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(2): p. 86-94.
32. Cousin, C., et al., *Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation*. FEMS Microbiol Lett, 2013. **346**(1): p. 11-9.
33. Whitmore, S.E. and R.J. Lamont, *Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence*. Int J Oral Sci, 2012. **4**(1): p. 1-6.
34. Cozzone, A.J., et al., *Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria*. Arch Microbiol, 2004. **181**(3): p. 171-81.
35. Christophe Grangeasse, R.T., Sylvie Nessler, *Bacterial tyrosine-kinases: Structure–function analysis and therapeutic potential*. Biochimica et Biophysica Acta 2010. **1804**: p. 628–634.
36. Joseph D. Chao, D.W.a.Y.A.-G., *Microbial Protein-tyrosine Kinases*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 2014. **289**(14) p. 9463–9472.
37. Kennelly, P.J., *Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective*. FEMS Microbiology Letters 2002. **206** p. 1-8.
38. Standish, A.J. and R. Morona, *The role of bacterial protein tyrosine phosphatases in the regulation of the biosynthesis of secreted polysaccharides*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(14): p. 2274-89.
39. David Barford, A.K.D., and Marie-Pierre Egloff, *THE STRUCTURE AND MECHANISM OF PROTEIN PHOSPHATASES: Insights into Catalysis and Regulation*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 1998. **27** (1) p. 133-164
40. Sergienko, T.L.E.A., *High-Throughput Screening for Protein Tyrosine Phosphatase Activity Modulators*, in *Phosphatase Modulators*, J.L. Millán, Editor 2013 Humana Press: Clifton, N.J. p. 223-240.
41. Anna Caselli, P.P., Alice Santi, Camilla Mugnaioni, Alessandra Toti, Guido Camici, Paolo Cirri, *Low molecular weight protein tyrosine phosphatase: Multifaceted functions of an evolutionarily conserved enzyme*. Biochimica et Biophysica Acta 2016. **1864**: p. 1339–1355.
42. Andaleeb Sajid, G.A., Anshika Singhal, Vipin C. Kalia, and Yogendra Singh, *Protein Phosphatases of Pathogenic Bacteria: Role in Physiology and Virulence*. Annual Review of Microbiology, 2015. **69**: p. 527-547.
43. Andrade, A., et al., *Tyrosine Phosphorylation and Dephosphorylation in Burkholderia cenocepacia Affect Biofilm Formation, Growth under Nutritional Deprivation, and Pathogenicity*. Appl Environ Microbiol, 2016. **82**(3): p. 843-56.
44. Ferreira, A.S., et al., *Comparative transcriptomic analysis of the Burkholderia cepacia tyrosine kinase bceF mutant reveals a role in tolerance to stress, biofilm formation, and virulence*. Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(9): p. 3009-20.
45. James E. A. Zlosnik, P.S.C., Rollin Brant, Paul Y. B. Mori, Trevor J. Hird, Monica C. Fraenkel, Pearce G. Wilcox, A. George F. Davidson, and David P. Speert *Mucoid and Nonmucoid Burkholderia cepacia Complex Bacteria in Cystic Fibrosis Infections* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicina, 2011. **183**(1): p. 67-72.

46. Mahenthiralingam, E., et al., *Diagnostically and experimentally useful panel of strains from the Burkholderia cepacia complex*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(2): p. 910-3.
47. Maniatis T., E.F.F.a.J.S., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, ed. C.S.H. Laboratory 1982, NY.
48. J.Doly, H.C.B.a., *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Research, 1979. **7**(6): p. 1513-1523.
49. Flannagan, R.S., T. Linn, and M.A. Valvano, *A system for the construction of targeted unmarked gene deletions in the genus Burkholderia*. Environ Microbiol, 2008. **10**(6): p. 1652-60.
50. Figurski, D.H. and D.R. Helinski, *Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(4): p. 1648-52.
51. William J.Dower, J.F.M.a.C.W.R., *High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation*. Nucleic Acids Research, 1988. **16**(3): p. 6127-6145.
52. Bechet, E., et al., *Tyrosine-kinases in bacteria: from a matter of controversy to the status of key regulatory enzymes*. Amino Acids, 2009. **37**(3): p. 499-507.
53. Lescop, E., et al., *The solution structure of Escherichia coli Wzb reveals a novel substrate recognition mechanism of prokaryotic low molecular weight protein-tyrosine phosphatases*. J Biol Chem, 2006. **281**(28): p. 19570-7.
54. Tanja Stehle, S.S., Frank Löhr, Christian Richter, Krishna Saxena, Hendrik R. A. Jonker and Harald Schwalbe, *The Apo-structure of the Low Molecular Weight Protein-tyrosine Phosphatase A (MptpA) from Mycobacterium tuberculosis Allows for Better Target-specific Drug Development*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 2012. **287**(41): p. 34569–34582.
55. Chaithanya Madhurantakam, E.R., Pooja Anjali Mazumdar, Baisakhee Saha, Devrani Mitra, Harald G. Wiker, Rajan Sankaranarayanan and Amit Kumar Das, *Crystal Structure of Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase from Mycobacterium tuberculosis at 1.9-Å Resolution*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 2005. **187**(6): p. 2175–2181.
56. Marie Zhang, C.V.S., Dayin Lin and Robert L. Van Etten, *Crystal Structure of a Human Low Molecular Weight Phosphotyrosyl Phosphatase IMPLICATIONS FOR SUBSTRATE SPECIFICITY**. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1998. **273**(34): p. 21714–21720.
57. Huimin Xu, B.X.a.C.J., *Solution Structure of a Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase from Bacillus subtilis*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2006. **188** (4): p. 1509–1517
58. Bornadata Evans, P.A.T., Christine Pokalsky, Marie Zhang, and Robert L. Van Etten, *Site-Directed Mutagenesis, Kinetic, and Spectroscopic Studies of the P-Loop Residues in a Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase*. Biochemistry 1996. **35**: p. 13609-13617.
59. Shuishu Wang, L.T., Marie Zhang, Etti Harms, Robert L. Van Etten and Cynthia V. Stauffacher, *Crystal Structures of a Low-Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase from Saccharomyces cerevisiae and Its Complex with the Substrate p-Nitrophenyl Phosphate*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 10903-1904.

