

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS SUSTRATO DE LA ENZIMA  
BPtpA DE *Burkholderia cenocepacia***

**PRESENTADO POR**

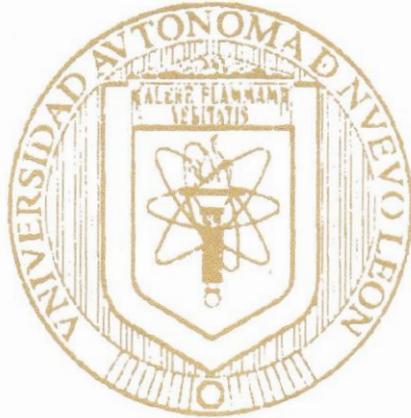
**Q.B.C. BRENDA LOURDES WILSON QUIÑONEZ**

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

**JULIO 2022**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS SUSTRATO DE LA ENZIMA  
BPtpA DE *Burkholderia cenocepacia***

**PRESENTADO POR**

**Q.B.C. BRENDA LOURDES WILSON QUIÑONEZ**

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

**JULIO 2022**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS SUSTRATO DE LA ENZIMA BPT<sub>α</sub> DE  
*Burkholderia cenocepacia***

Presentado por

Q.B.C. Brenda Lourdes Wilson Quiñonez

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

Julio 2020

**BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS SUSTRATO DE LA ENZIMA BPTpA DE**  
*Burkholderia cenocepacia*

Aprobación de la Tesis:



---

**Dr. Angel Andrade Torres**  
Director de Tesis



---

**Dr. Miguel Ángel Becerril García**  
Co-director de Tesis



---

**Dr. Rogelio de Jesús Treviño Rangel**  
Miembro de la Comisión



---

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

**BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS SUSTRATO DE LA ENZIMA BPtpA DE**  
*Burkholderia cenocepacia*

Presentado por:

Q.B.C. Brenda Lourdes Wilson Quiñonez

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. Angel Andrade Torres. Y contó con financiamiento por parte de CONACyT, Ciencia de Frontera [FORDECYT-PRONACES/40760/2020], y del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) [CN1870-21].

**BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS SUSTRATO DE LA ENZIMA BPtpA DE**  
*Burkholderia cenocepacia*

**Q.B.C. Brenda Lourdes Wilson Quiñonez fue becaria del Consejo Nacional de  
Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de registro 1077618**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primero lugar al Dr. Angel, por guiarme en este proyecto, y poder sacar adelante esto a pesar de las adversidades. A la Dra. Gloria María González González, por ser tan comprensiva cuando más lo necesite, a las doctoras Mariana y Alexa, y a los doctores Rogelio, Becerril, José Palma que, a pesar de la contingencia, compartieron sus conocimientos tanto en clase como en el laboratorio, cada uno dejó una marca en mí, y me ayudaron a crecer este conocimiento. Un agradecimiento al Dr. Alejandro Sánchez por tantas risas, por compartir conmigo su lado divertido, su lado crítico y sacarme siempre una sonrisa. Y sobre todo gracias al Dr. Romel, por el apoyo y por ver en mí lo que nadie más ve.

Gracias al equipo de trabajo de Microbiología sanitaria, a Fernanda por tanta paciencia y por enseñarme absolutamente todo lo que se, a Carlitos por ser mi hermanito regio, a Liz de Anda, Oscar y Samantha por tanto apoyo y sobre todo por los momentos divertidos.

Gracias a mis compañeros Lizeth Sánchez y Joan, por apoyarnos en cada paso de esta maestría, y esos abrazos mañaneros de Joan que me alegraban el corazón.

Gracias a mis demás compañeros, Orlando y Gerardo, por sus consejos, gracias a Luis Rodríguez por desesperarme y a la vez darme mucho cariño, a Luis Cortes y Gabriel por tantas platicas profundas en el cubículo, y sobre todo a mi chirris Ana Ríos, mi hermana del alma, por siempre estar al pendiente y cuidar de mí, por tantas horas de chal, por tantas palabras de aliento, por tantos consejos, tantas risas, y sobre todo por estar ahí en los momentos más difíciles, me hiciste y me haces sentir que tengo una hermana aquí, te adoro.

Gracias a mi bebecita Samantha Armijo por apoyarme siempre y abirme las puertas de su casa, y compartir conmigo a su familia y gracias a Karen por tantas emociones y aventuras nuevas.

Quiero agradecer a dos personitas que fueron las responsables de girar mi vista hacia esta maestría, a la maestra Sandra Miranda por impartir con tanta vocación las materias por las que me enamore de la microbiología y en especial la micología, y al

Dr. Marco López, por obligarme a superarme y siempre aspirar a lo mejor, y lo mejor fue esta maestría.

Agradezco infinitamente a mi familia, a mis papás, Pedro y Lourdes, que a pesar de no querer verme partir, me apoyaron sin pensarlo, a mis hermanos Pedro y Paola por alentarme en superarme y no pensar en las adversidades. Sin su cariño y amor no estaría hoy donde estoy.

Gracias a Fernando por ser todo lo que necesito, por rescatarme tantas veces, por alentarme, regañarme, abrazarme, apoyarme, comprenderme, gracias por tu familia, gracias por tus amigos, gracias por levantarme tantas veces de los lugares más oscuros, y seguir aquí para mí, para nosotros, y no existen palabras para describir lo que significas para mí, tú ya lo sabes.

Gracias Dios por ponerme en este lugar, en este preciso momento, por rodearme de estas personas, para poder construir a la persona que soy ahora.

## ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	12
Género <i>Burkholderia</i>	12
Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	15
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	17
Determinantes de la virulencia de <i>B. cenocepacia</i>	17
Sistemas de fosforilación en residuos de tirosina	19
Proteínas tirosina fosfatasa de bajo peso molecular (LMW-PTP)	21
3. ANTECEDENTES	23
Proteínas involucradas en la fosforilación de tirosina en <i>B. cenocepacia</i>	23
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 Alineamiento de secuencias de proteínas fosforiladas en tirosina	28
6.2 Cepas bacterianas	28
6.3 Conjugación triparental	29
6.4 Escrutinio de las células $\Delta$ btpA-BPtpAD127A y $\Delta$ iscR-BPtpAD127A transformadas	30
6.5 Expresión de la proteína BPtpA-10XHis en medio rico en nutrientes y estandarización de condiciones óptimas de inducción	30
6.6 Expresión de la proteína BPtpA en condiciones limitantes de nutrientes	30
6.7 Ensayo <i>in vitro</i> de captura de sustrato	31
6.8 Cuantificación de proteínas co-purificadas	32
6.9 Inmunodetección tipo Western blot	32
6.10 Identificación de péptidos por espectrometría de masas	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Identificación de motivos consenso en sitios reportados con residuos de tirosina fosforilados	33

<b>7.2</b>	Identificación de motivos consenso en proteínas completas reportadas con residuos de tirosina fosforilados	<b>36</b>
<b>7.3</b>	Escrutinio de las células $\Delta$ btpA-BPtpAD127A y $\Delta$ iscR-BPtpAD127A transformadas.	<b>38</b>
<b>7.4</b>	Condiciones óptimas para la expresión de la proteína recombinante BPtpA	<b>39</b>
<b>7.5</b>	Medio LB favorece una mayor producción de BPtpA	<b>40</b>
<b>7.6</b>	Co-purificación de proteínas posibles sustrato de BPtpA	<b>41</b>
<b>7.7</b>	Las proteínas contenidas en la banda de 30 kDa contienen dos posibles sustratos de BPtpA	<b>42</b>
<b>8.</b>	DISCUSIÓN	<b>44</b>
<b>9.</b>	CONCLUSIONES	<b>50</b>
<b>10.</b>	BIBLIOGRAFÍA	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>		<b>PÁGINA</b>
1.	Género <i>Burkholderia</i> participa en funciones ambientales y como patógeno en diversos nichos	14
2.	Estructura representativa de una BY-cinasa en Proteobacterias	20
3.	Modelaje tridimensional de la proteína BPtpA	25
4.	Alineamiento de secuencias múltiples de las proteínas reportadas fosforiladas en residuos de tirosina	34
5.	Análisis de colonias transformadas correspondientes a <i>B. cenocepacia</i>	38
6.	Expresión de la proteína recombinante BPtpAD127AX10His	39
7.	Evaluación del medio óptimo para la inducción de la proteína recombinante BPtpA	40
8.	Comparación de proteínas co-purificadas con BPtpA con los fondos genéticos de <i>B. cenocepacia</i> $\Delta$ btpA y $\Delta$ iscR	41
9.	Evaluación de las proteínas co-purificadas mediante Western blot	42
10.	Alineamiento de secuencia de la proteína factor de elongación Tu	45
11.	Alineamiento de la subunidad HslUV de una proteasa dependiente de ATP	47
12.	Estructura tridimensional de los sustratos putativos de BPtpA	49

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>1.</b>	Especies pertenecientes al complejo <i>B. cepacia</i>	<b>16</b>
<b>2.</b>	Cepas bacterianas empleadas en este estudio	<b>29</b>
<b>3.</b>	Proteínas con homología del 100% con los sitios donde ocurre la fosforilación en tirosina	<b>35</b>
<b>4.</b>	Proteínas homólogas con las secuencias arrojadas por The MEME suite	<b>36</b>
<b>5.</b>	Proteínas completas con homología >50% con proteínas de <i>B. cenocepacia</i>	<b>37</b>
<b>6.</b>	Proteínas sustrato putativas identificadas por espectrometría de masas	<b>43</b>

## 1. RESUMEN

*Burkholderia cenocepacia* es un patógeno oportunista que puede causar infecciones pulmonares graves en pacientes con fibrosis quística. Algunas cepas de *B. cenocepacia* son altamente transmisibles y resistentes a la mayoría de los antibióticos empleados en la clínica. Dentro del genoma de *B. cenocepacia* se encuentran codificadas 4 proteínas tirosina fosfatasas de bajo peso molecular (LMW-PTP, por sus siglas en Inglés). La actividad de las LMW-PTP se ha relacionado con diversos procesos celulares como la biosíntesis de polisacáridos extracelulares y la respuesta a diferentes tipos de estrés, aspectos que impactan en la patogenicidad bacteriana y en la persistencia intracelular en macrófagos. Particularmente, la actividad de la LMW-PTP, BPtpA, se ha implicado en la respuesta a condiciones de nutrientes limitados. En este trabajo, con el objetivo de identificar proteínas sustrato de la fosfatasa BPtpA de *B. cenocepacia*, se realizaron ensayos de captura de sustrato (*pull-down*), utilizando como cebo una versión inactiva de esta enzima (BPtpA<sub>D127A</sub>). Los resultados obtenidos indican que una proteína de aproximadamente 30 kDa co-purifica con BPtpA. Además, dicha proteína resultó reactiva al anticuerpo anti-P-Tyr, lo que sugiere fuertemente un estado fosforilado de la misma. Por medio de espectrometría de masas, se determinó la presencia de las proteínas 30S ribosomal S2 y acetil-glutamato cinasa, en la región correspondiente a los 30 kDa de las muestras co-purificadas con BPtpA<sub>D127A</sub>. La caracterización de la posible regulación por medio de fosforilación en tirosinas de las proteínas 30S ribosomal S2 y acetil-glutamato cinasa permitirá un mejor entendimiento de la fisiología de *B. cenocepacia* y su relación con los mecanismos de adaptación a condiciones de estrés.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Género *Burkholderia*

William Burkholder en 1949 aisló una bacteria causante de la podredumbre de los bulbos de cebolla [1], se describió que podía ocasionar tanto enfermedades en las plantas, como infecciones en el humano, nombrando a esta bacteria como *Pseudomonas cepacia* [2]. Posteriormente, gracias al análisis de las secuencias de rARN 16S, los valores de homología ADN-ADN, la composición de lípidos y ácidos grasos celulares y las características fenotípicas, en 1992 se propuso un nuevo género, denominado *Burkholderia*. En éste fueron asignadas siete especies pertenecientes al grupo II de homología de ARN del género *Pseudomonas*, *B. cepacia*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. caryophylli*, *B. gladioli*, *B. pickettii* y *B. solanacearum* [3]. A diferencia del género *Pseudomonas*, *Burkholderia* pertenece a la subdivisión  $\beta$  del filo *Proteobacteria* [4].

A su vez, la especie *B. cepacia* se divide en 5 grupos genómicos, denominados genomavares, enumerados del I al V, donde se agrupan cepas con características fenotípicas similares, pero diferentes genotípicamente [5].

A la fecha el género *Burkholderia* se encuentra constituido por alrededor de 100 especies [6], éstas pueden colonizar y habitar en diferentes nichos, como suelo, agua, rizósfera, suelo y semillas. Algunas especies tienen la capacidad de establecer simbiosis con plantas, ya sea como microorganismos endófitos de cítricos [7], o desarrollando nódulos en leguminosas (p. ej. en *Stylosanthes*) [8]. Además, el género *Burkholderia* tiene un importante potencial biotecnológico como fuente de nuevos antibióticos, metabolitos secundarios bioactivos, control biológico, promoción del crecimiento vegetal, biorremediación y degradación de contaminantes [9].

En este sentido, se describió que *B. vietnamiensis* G4, degrada tricloroetileno (TCE), uno de los contaminantes orgánicos más abundantes detectados en los acuíferos de agua subterránea en los EE. UU., en presencia de moléculas inductoras aromáticas como el tolueno o el fenol [10]. Además, las especies de *B. cenocepacia* IIIA, *B.*

*vietnamiensis*, *B. cepacia* y *B. multivorans*, se describieron como degradadoras de benzo(a)pireno, componente perteneciente a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que es uno de los principales contaminantes en plantas de tratamiento de aguas residuales [11].

Otras especies como *B. bryophila* y *B. megapolitana*, aislados de musgo mostraron actividad antifúngica contra fitopatógenos, así como propiedades promotoras del crecimiento de las plantas [12].

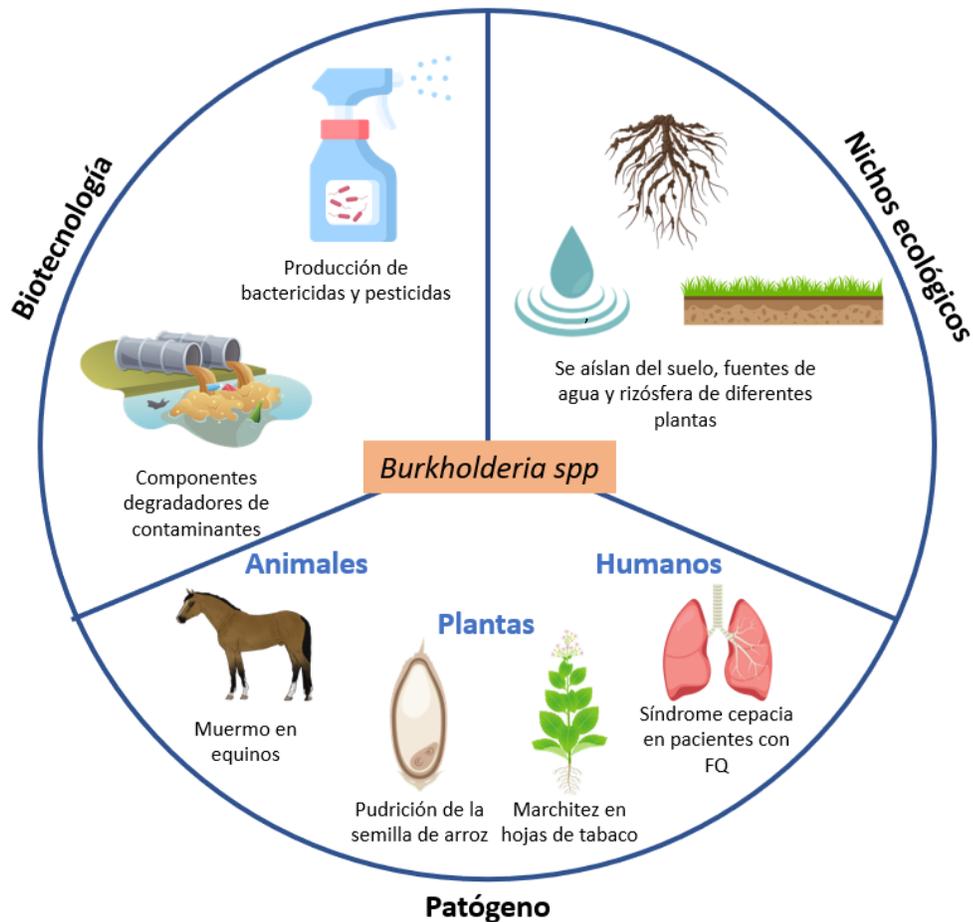
Como microorganismos fitopatógenos dentro del género *Burkholderia* se encuentran *B. glumae* y *B. gladioli*, causantes de la alteración de las hojas de tabaco, marchitez y pudrición de las semillas de arroz [13]. *B. fungorum* se ha aislado del hongo de la podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium*, que puede inducir enfermedades en los árboles [14]. Por su parte, *B. caryophylli* induce marchitez en varias especies de plantas, incluida la genciana de la pradera de Russel en Japón [15].

El muermo es una enfermedad zoonótica poco común ocasionada por *B. mallei*, que infecta a solípedos como caballos, mulas y burros. Cursa con la proliferación de nódulos y ulceraciones en el tracto respiratorio superior y en los pulmones, existe también una forma cutánea. El muermo es raro en humanos, pero aquellos que están en contacto cercano con solípedos infectados pueden infectarse. Las bacterias entran por los ojos, la nariz, la boca o heridas en la piel [16-18].

La melioidosis es una enfermedad infecciosa causada por *B. pseudomallei* y, dentro de su espectro clínico, incluye neumonía, septicemia e infección localizada de varios órganos. Este tipo de infecciones se han reportado tanto en vacas, terneros y ovinos, así como en otros animales alrededor del mundo [19, 20]. Al igual que *B. mallei*, la melioidosis puede infectar a humanos, principalmente aquellos con factores de riesgo subyacentes, como diabetes, enfermedad renal, abuso de alcohol y talasemia, aunque los individuos sanos también pueden contraer la enfermedad [21, 22].

De manera importante la especie *B. cepacia* comenzó a aislarse de las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística (FQ) con una frecuencia cada vez mayor a partir de 1980 y, en la actualidad, se reconoce como un patógeno oportunista tanto en pacientes

con FQ como con enfermedad granulomatosa crónica (EGC). Éstas infecciones se asocian con una rápida propagación comunitaria y son inusualmente agresivas, asociándose con elevadas tasas de mortalidad [23, 24].



**Figura 1. Género *Burkholderia* participa en funciones ambientales y como patógeno en diversos nichos.** Diversas especies del género *Burkholderia* promueven el crecimiento de plantas, secretando sustancias antifúngicas y antibacterianas, contribuyen al flujo de nutrientes en suelo y rizósfera. En este género existen especies patógenas para diversas plantas y semillas, causando enfermedades a cultivos como cebollas, tabaco, arroz, etc. En animales, algunas especies pueden ocasionar distintas enfermedades (p. ej. muermo, melioidosis e infecciones en vías respiratorias).

## 2.2 Complejo *Burkholderia cepacia*

A partir del análisis molecular de diferentes aislamientos (similitud de los genes 16S rARN *recA*, espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), análisis de secuencias multilocus (MLST), identidades de nucleótidos promedio *average nucleotide identities* [ANI]), perfiles de ácidos grasos y caracterizaciones bioquímicas [25-28]), se han agrupado 24 especies genéticamente relacionadas, pertenecientes al denominado complejo *B. cepacia* o Bcc (*B. cepacia* complex). Éste se conforma por las especies *B. aenigmatica*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. arboris*, *B. catarinensis*, *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. contaminans*, *B. diffusa*, *B. dolosa*, *B. lata*, *B. latens*, *B. metallica*, *B. multivorans*, *B. paludis*, *B. pseudomultivorans*, *B. puraquae*, *B. pyrrocinia*, *B. seminalis*, *B. stabilis*, *B. stagnalis*, *B. territorii*, *B. ubonensis* y *B. vietnamiensis* (Tabla 1).

Dichas especies forman parte de un grupo muy semejante dentro del género *Burkholderia*, el cuál cuando se analiza filogenéticamente presenta hasta el 78% de sus genes en común. En general, las especies del Bcc presentan genomas de gran tamaño (hasta 9 Mpb) divididos en 2-5 replicones, dispuestos en tres cromosomas y un gran plásmido, esta característica aporta una gran versatilidad metabólica [29]. Estas especies cuentan con una morfología de bacilos rectos, oxidasa y catalasa positivos. Son bacterias móviles con un flagelo polar único o bien con un penacho de flagelos polares según las especies. También son mesófilos y no esporulados. Su metabolismo es aerobio y como sustancia de reserva pueden utilizar el polihidroxibutirato [30].

**Tabla 1.** Especies pertenecientes al complejo *B. cepacia*.

No.	Especie	Ambiente natural	Ambiente clínico	Ref.
1	<i>B. aenigmatica</i>	Ambiente	FQ	[31]
2	<i>B. ambifaria</i>	Rizósfera, suelo, maíz, rizósfera de guisantes y pastos y hojas	FQ	[32]
3	<i>B. anthina</i>	Rizósfera, caña de azúcar	FQ, ambiente hospitalario	[33]
4	<i>B. arboris</i>	Rizósfera, suelo, agua, palma aceitera	FQ, IN	[34]
5	<i>B. catarinensis</i>	Suelo	NR	[35]
6	<i>B. cenocepacia</i>	Rizósfera, suelo, plantas, agua, animales	FQ, IN, SM	[36]
7	<i>B. cepacia</i>	Rizósfera, suelo, agua, cebolla podrida	FQ, IN, SM	[37]
8	<i>B. contaminans</i>	Plantas, animales	FQ, IN	[38] [39]
9	<i>B. diffusa</i>	Suelo, ambiente	FQ, IN, EH	[40]
10	<i>B. dolosa</i>	Suelo, nódulo de <i>Alysicarpus glumaceus</i>	FQ	[41]
11	<i>B. lata</i>	Suelo, agua, flores	FQ, IN, SM	[42]
12	<i>B. latens</i>	NR	FQ	[43]
13	<i>B. metallica</i>	Rizósfera	FQ	[44]
14	<i>B. multivorans</i>	Suelo, insectos	FQ, IN, EH	[45]
15	<i>B. paludis</i>	Suelo de pantano		[46]
16	<i>B. pseudomultivorans</i>	Rizósfera	FQ, IN	[47]
17	<i>B. puraquae</i>	Suelo	FQ, SM	[48] [25]
18	<i>B. pyrrocinia</i>	Rizósfera, suelo, sedimento	NR	[49, 50]
19	<i>B. seminalis</i>	Semilla de arroz, caña de azúcar	FQ, IN	[51]
20	<i>B. stabilis</i>	NR	FQ, IN, EH	[52] [53]
21	<i>B. stagnalis</i>	Suelo	FQ, IN	[27]
22	<i>B. territorii</i>	Agua, suelo, plantas	NR	[54] [55]
23	<i>B. ubonensis</i>	Suelo	IN	[56] [57]
24	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizósfera, plantas, suelo, agua, animales	FQ, IN	[58] [59]

FQ: muestras de pacientes con fibrosis quística; IN: muestras de pacientes con infecciones nosocomiales; EH: muestras de equipo de hospitales; SM: muestras de soluciones de uso médico; NR: no reportada. Tabla tomada y modificada de Ludovic y Chapalain, 2011 [60].

### **2.3 *Burkholderia cenocepacia***

Como se mencionó anteriormente, *B. cenocepacia* pertenece al Bcc, es una bacteria ubicua que puede aislarse a partir de diferentes nichos ecológicos, como en plantas, suelos y agua. Puede comportarse como patógeno oportunista en humanos, causando infecciones sistémicas graves que amenazan la vida en individuos inmunocomprometidos, incluidos pacientes con FQ [61]. Posiblemente estas diversas interacciones biológicas ejercen una presión selectiva, dando lugar a bacterias altamente adaptables. Esta capacidad adaptativa a diferentes condiciones podría contribuir a la resistencia a los antibióticos y a la patogenicidad de *B. cenocepacia* [62].

Con base en la secuenciación y análisis de material genético de las 24 especies que se encuentran actualmente dentro del Bcc, *B. cenocepacia* es la especie mayormente asilada, seguida de *B. multivorans* [63] [64] [65]. *B. cenocepacia* se pueden subdividir en cuatro linajes distintos, IIIA, IIIB, IIIC y IIID [66]. Algunas cepas de *B. cenocepacia* son altamente transmisibles y resistentes a un gran número de antibióticos. Aproximadamente un tercio de los pacientes con FQ infectados con *B. cenocepacia* desarrollan el fatal síndrome cepacia [67].

*B. cenocepacia* y las especies pertenecientes a este género tienen uno de los genomas bacterianos más grandes y complejos [68]. *B. cenocepacia* contiene un genoma de más de 8 Mbp con un alto porcentaje de G+C, tres cromosomas circulares y un plásmido; caracterizado por una estructura multirreplícón, además, posee numerosas duplicaciones de genes, secuencias de inserción y elementos móviles [69]. Este genoma también puede mutar con rapidez, cuando la bacteria se encuentra en condiciones de estrés durante las infecciones o *in vitro* [70].

### **2.4 Determinantes de la virulencia de *B. cenocepacia***

Mediante mutagénesis etiquetada con firma (STM, por sus siglas en Inglés) se identificaron 102 genes de *B. cenocepacia* necesarios para su supervivencia en un modelo de rata. Estas mutaciones están involucradas en la regulación global, la

replicación y reparación del ADN, el metabolismo celular, así como algunos que codifican proteínas transmembranales y polisacáridos de la pared celular[71].

Diferentes estudios han destacado el papel clave de las bombas de eflujo de la familia de división de nodulación de resistencia (RND) de *B. cenocepacia* en la resistencia a los fármacos. El análisis de mutantes RND confirmó que algunos transportadores de eflujo participan en la eliminación de clorhexidina durante el crecimiento planctónico (RND-1 y RND-4), mientras que otros (RND-3 y RND-9) durante el crecimiento sésil [72]. Por otra parte, se han identificado diferentes  $\beta$ -lactamasas en *B. cenocepacia*, tales como AmpC, hidrolizante de cefalosporinas de espectro extendido; AmpD, una enzima de reciclaje de la pared celular [73] y PenB, una penicilinasas de clase A extremadamente conservada en el Bcc [74].

*B. cenocepacia* también tiene la capacidad de secretar proteínas degradativas, una de ellas es la metaloproteasa de zinc extracelular, llamada ZmpB. Ratas infectadas con una cepa mutante en *zmpB* presentaron una menor inflamación del tejido pulmonar en comparación con la cepa silvestre. También se ha demostrado que ZmpB puede degradar el inhibidor de proteinasa  $\alpha$ -1, la  $\alpha$ 2-macroglobulina, el colágeno tipo IV, la fibronectina, la lactoferrina, la transferrina y las inmunoglobulinas [75].

El antígeno O del LPS de *B. cenocepacia* K56-2 estimula la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos murinos mediada por TLR4 y caspasa-1, ocasionando una importante inflamación de las vías respiratorias, daño tisular y muerte celular piroptótica [76].

Las cepas *B. cenocepacia* K56-2 o BC7 provocan una mayor expresión de IL-8 en las células epiteliales primarias de las vías respiratorias de los pacientes con fibrosis quística (FQ) que otros aislados de *B. cenocepacia* examinados, lo que sugiere que, además del LPS, otros factores pro-inflamatorios también pueden contribuir a la estimulación excesiva de citosinas inducida por *B. cenocepacia* [77].

Las células fagocíticas producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en Inglés) para la eliminación de bacterias y, en *B. cenocepacia*, se han reportado numerosos mecanismos para resistir el estrés oxidativo. Diferentes aislados de *B. cenocepacia* poseen resistencia *in vitro* frente a catalasa, peroxidasa y superóxido

dismutasa [78]. Se describió que la bacteria oportunista *B. cenocepacia* C5424 codifica dos genes de catalasa/peroxidasa, *kata* y *katB*. La proteína KatA es una catalasa/peroxidasa especializada que tiene una función novedosa al contribuir en el mantenimiento de la actividad normal del ciclo TCA, mientras que KatB representa la principal catalasa/peroxidasa y tiene un papel global, ya que se expresa bajo estrés y da protección celular en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [79].

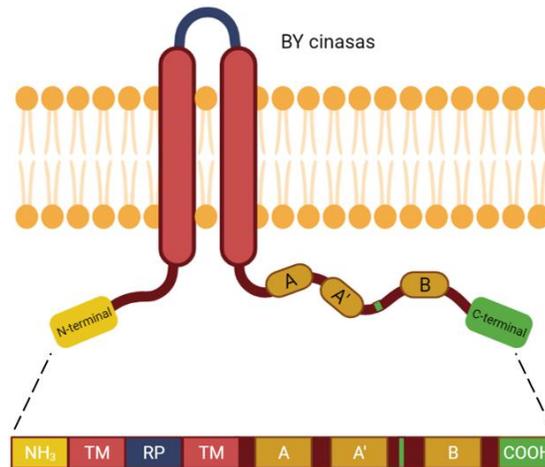
Las biopelículas se han asociado a algunas enfermedades humanas como la FQ [30]. Las cepas de *B. cenocepacia* que expresan los pili de cable (Cbl), como la adhesina de 22 kDa, se unen fuertemente a la citoqueratina 13 (CK13), son más persistentes en la capa de moco apical al formar microcolonias en las células epiteliales de las vías respiratorias de las personas con FQ [77]. También se ha reportado que la eliminación de genes codificantes de enzimas asociadas a la fosforilación de tirosinas impacta en la formación de biopelícula de *B. cenocepacia* K56-2 [80].

## **2.5 Sistemas de fosforilación en residuos de tirosina**

La regulación de la actividad de las proteínas por medio de modificaciones postraduccionales, como la fosforilación y la desfosforilación, cumple una función importante en determinantes críticos del crecimiento y desarrollo celular normal. La fosforilación de tirosinas en bacterias se relacionó, en primer lugar, con la síntesis y exportación de polisacáridos asociados con la producción de lipopolisacáridos y cápsulas. Las proteínas involucradas en la fosforilación de tirosinas están muy extendidas en los proteomas bacterianos, y ahora se sabe que cumplen diversas funciones celulares [81].

Las proteínas responsables de realizar la fosforilación de tirosinas en bacterias difieren de sus contrapartes eucariontes por lo que se han agrupado en una nueva familia denominada tirosina cinasas bacterianas (*BY-kinases*, por sus siglas en Inglés). Éstas comprenden el grupo principal de enzimas bacterianas con actividad de tirosina cinasa. En la mayoría de los casos, las BY cinasas poseen un dominio transmembranal que puede funcionar como ancla y sensor, así como un dominio catalítico intracelular

(Fig. 2). Las BY cinasas se autofosforilan en su extremo C-terminal, en una región rica en residuos de tirosina, utilizan ATP como fuente de fosfato [82]. El dominio catalítico se define por la presencia de motivos canónicos Walker A (P-loop) y Walker B, y la presencia de un motivo especial Walker A' (presente en cinasas que fosforilan sustratos de bajo peso molecular).



**Figura 2. Estructura representativa de una BY-cinasa en Proteobacterias.** Región N-terminal citoplasmática (Amarillo). RP: región periplásmica (Azul). TM: Transmembranal (Rojo). Dominio catalítico que contiene motivos Walker A, B y A' (Amarillo oscuro). Región rica en tirosina que contiene sitios de fosforilación presentes tanto en el extremo C-terminal, como en la región interna entre el motivo Walker A' y B (verde).

Las BY-cinasas de Proteobacterias además poseen una tirosina interna que es susceptible a autofosforilación (entre el motivo Walker A' y Walker B). A pesar de que el dominio Walker A' puede estar ausente en algunas BY-cinasas, en todas las enzimas de esta familia estudiadas a la fecha se ha descrito su autofosforilación en tirosinas situadas en el extremo C-terminal [83] [82].

La reversibilidad de la reacción se efectúa mediante tres clases principales de proteína-tirosina fosfatasas: una incluye fosfatasas de tipo eucariota convencionales (PTP) y fosfatasas de doble especificidad (DUSPs), otra comprende las enzimas menos frecuentes del tipo polimerasa-histinol fosfatasa (PHP) y, una tercera clase, llamadas

proteína tirosina fosfatasa de bajo peso molecular (LMW-PTP). Estas tirosinas fosfatasas catalizan la desfosforilación de las proteínas fosforiladas en tirosina, lo que da como resultado la propagación o la inhibición de la señalización dependiente de fosfato [84].

Las proteínas pertenecientes a las familias PTP, DUSPs y LMW-PTP utilizan un mecanismo catalítico en común, el cual involucra la firma conservada C(X)<sub>5</sub>R en el bucle de unión al fosfato, donde la cisteína funciona como nucleófilo y ataca el átomo de fósforo del residuo de fosfotirosina del sustrato. Las PHP contienen un dominio característico que consta de 4 regiones centrales conservadas (motivos I-IV) y, requieren rasgos indispensables para su actividad, como la presencia de histidinas y aspartatos conservados, dos cationes metálicos coordinados, usualmente Mn<sup>2+</sup> y un pH básico [85].

## **2.6 Proteínas tirosina fosfatasa de bajo peso molecular (LMW-PTP)**

Una característica de las enzimas LMW-PTP es una segunda cisteína conservada en el motivo del bucle P (CX<sub>4</sub>CR); mientras que la primera cisteína es el nucleófilo catalítico, la segunda cisteína está implicada en la regulación fisiológica por ROS.

Estas enzimas realizan en tres pasos su reacción catalítica. En primer lugar, coordinando el grupo fosfato con ayuda de un residuo de arginina, para situarlo cerca al residuo de cisteína catalítico. Posteriormente, ocurre un cambio conformacional en el bucle D, donde el residuo de aspartato se localiza en el sitio activo y actúa como ácido en la reacción. En un segundo paso, la cisteína ataca al fosfato de la proteína fosforilada en tirosina y se forma un intermediario fosfocisteína que desplaza a la proteína desfosforilada. Por último, una molécula de agua sustituye el lugar de la proteína desfosforilada e hidroliza la cisteína fosforilada, liberando fosfato inorgánico y regenerando a la enzima [86-88]. Se ha propuesto que la especificidad del sustrato en las LMW-PTP está determinada principalmente por los residuos que recubren el sitio activo.

Algunas LMW-PTP procariotas se consideran factores de virulencia pues actúan sobre sustratos eucariotas [89], un ejemplo de ello son las LMW-PTP de *Mycobacterium tuberculosis* (mPTPA y mPTPB) liberadas al medio extracelular. Éstas alteran directamente la señalización del huésped para evadir funciones antimicrobianas, promoviendo la supervivencia de *M. tuberculosis* dentro de los macrófagos [90].

En un inicio, por su contexto genético, las LMW-PTP se asociaban con el control de la biosíntesis de polisacáridos capsulares y extracelulares [91]. Hoy en día se conocen otras funciones asociadas, por ejemplo en *B. subtilis* la LMW-PTP YwqE participa en la biosíntesis de polisacáridos, así como en el metabolismo y respuesta al daño del ADN bacteriano [92].

La evidencia proporcionada a la fecha pone de manifiesto la similitud entre las secuencias, estructuras y mecanismos de acción de las LMW-PTP; no obstante, realizan funciones diversas dependiendo del microorganismo, por lo que la identificación de las proteínas con las que interaccionan estas enzimas nos proporcionará un mejor entendimiento de su papel y función en la fisiología procariota.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Proteínas involucradas en la fosforilación de tirosina en *B. cenocepacia*

Realizando estudios de secuencias del genoma de la cepa *B. cenocepacia* K56-2, se identificaron genes involucrados en la fosforilación de tirosinas. Entre éstos, cuatro genes codificantes de LMW-PTP (BCAM0208, BCAM0628, *bceD* y BCAL2200). De acuerdo con lo anterior, se demostró que el gen *dpm* (BCAM0628) codifica una enzima inactiva como fosfatasa que puede ser secretada. Además, se describió que Dpm contribuye a la capacidad de detener la maduración de las vacuolas fagocíticas en los macrófagos, mediante un mecanismo independiente de su actividad de fosfatasa. [93].

Adicionalmente, *B. cenocepacia* K56-2 codifica dos BY-cinasas, BCAM1331 y BceF (BCAM0859). La caracterización inicial de estas proteínas evidenció que las BY-cinasas BceF, BCAM1331 y la LMW-PTP BCAL2200 (ahora denominada BPtpA) se fosforilan *in vivo* y que las LMW-PTP BceD y BCAM0208 pueden desfosforilar a BceF *in vitro*. Adicionalmente, se demostró que la eliminación de BCAM1331, *bceF*, BCAM0208 y *bceD* reduce la formación de biopelículas, resultado esperado, ya que estos genes se encuentran en regiones relacionadas con la biosíntesis de exopolisacáridos (EPS).

En el caso del gen que codifica BPtpA (fosfatasa no relacionada con la formación de biopelículas), se evidenció que su actividad enzimática es necesaria para el crecimiento de *B. cenocepacia* en medio mínimo, sugiriendo que su función se asocia con la capacidad de respuesta a condiciones limitantes de nutrientes. BPtpA se encuentra codificada en una región altamente conservada en el género *Burkholderia*, que presuntamente es responsable de la biosíntesis de los centros hierro-azufre [Fe-S].

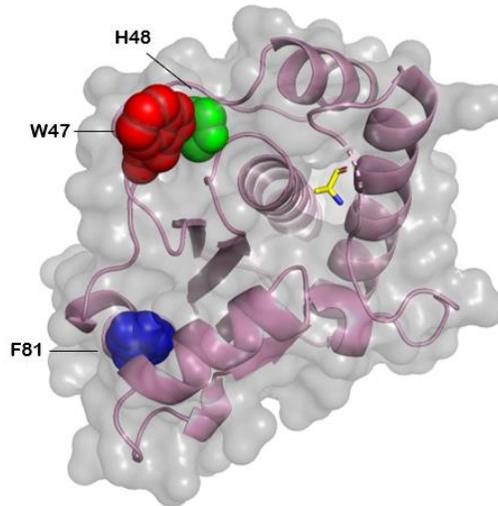
Estudios previos indican que las tres LMW-PTP de *B. cenocepacia* no son funcionalmente homólogas. Para aclarar las diferencias funcionales entre dichas enzimas, las secuencias de aminoácidos se alinearon con múltiples enzimas PTP de clase II basadas en Cys, utilizando la transformada rápida de Fourier. Este análisis evidenció que BPtpA se agrupa junto con LMW-PTP de eucariotas, mientras que BceD

y BCAM0208 se encuentran filogenéticamente relacionadas con enzimas procariotas. De acuerdo con lo anterior, se propuso una nueva categorización de las enzimas LMW-PTP: clase II.I y clase II.II [94].

En un estudio reciente, utilizando como modelo de la clase II.I de las enzimas LMW-PTP, a la proteína BPtpA, se identificaron dos residuos conservados en la hélice  $\alpha 3$ : D80 y F81), los cuales contribuyen a la estabilidad de la proteína, mientras que dos residuos conservados en el bucle W (W47 y H48) probablemente desempeñan un papel en el reconocimiento del sustrato (Figura 3) [94].

Debido a la diferencia entre las implicaciones que tienen las 3 fosfatasa en los fenotipos de *B. cenocepacia*, conocer los posibles sustratos de estas LMW-PTP ayudarían a dilucidar su función.

De acuerdo con el contexto genético de *bptpA*, se hipotetiza que los productos del operón ISC, elementos necesarios para la biosíntesis de los centros hierro-azufre [Fe-S], representan potenciales sustratos a fosforilación en tirosinas y de BPtpA. La identificación de sustratos putativos de BPtpA, mediante el uso de una mutante catalítica de esta fosfatasa, es una estrategia que puede permitir dilucidar las vías celulares reguladas por la LMW-PTP y su contribución a mecanismos asociados a la virulencia de *B. cenocepacia*.



**Figura 3. Modelo tridimensional de BPTpA.** La proteína se representa en listones y se incluye la superficie. En esferas se muestran los residuos importantes para la complementación del crecimiento en medio mínimo de nutrientes (Rojo: W47, Verde: H48, Azul: F81) y en barra se representa el aspartato catalítico sustituido por alanina (D127A: amarillo). Se utilizo como templado a la proteína VcLMWPTP-1 de *V. cholerae* (4LRQ).

#### **4. HIPOTESIS**

La LMW-PTP BPTpA de *Burkholderia cenocepacia* interacciona y desfosforila diferentes sustratos que permiten a la bacteria contender condiciones de estrés.

La implementación de una versión mutante catalítica de BPTpA permitirá la interacción y la co-purificación de sus proteínas sustrato.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Buscar proteínas que interactúen con la LMW-PTP BtpA de *Burkholderia cenocepacia* y evaluar su posible estado fosforilado.

### Objetivos específicos

1. Analizar secuencias de proteínas fosforiladas en tirosina y comparar con proteínas de *Burkholderia cenocepacia*.
2. Realizar ensayos de co-purificación *in vivo* utilizando una versión de BtpA mutante catalítica.
3. Evaluar el estado fosforilado de las proteínas co-purificadas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Alineamiento de secuencias de proteínas fosforiladas en tirosina

De acuerdo con lo reportado en la base de datos dbPSP (database of Phosphorylation Sites in Prokaryotes) 2.0 [95], se seleccionaron las proteínas reportadas que pertenecieran al filo de las Proteobacterias y que tuvieran al menos un residuo de tirosina fosforilado. Las secuencias registradas se alinearon con BioEdit 7.2.5 [96] y Uniprot UGENE [97]. Al encontrar homologías en los sitios donde ocurría la fosforilación de residuos de tirosina (secuencia de 15 aminoácidos), se prosiguió a introducir estas semillas en BLAST [98] e identificar si alguna de estas secuencias era homóloga con alguna proteína dentro de la secuencia completa de *B. cenocepacia* K56-2 [99].

Utilizando MEME (Multiple Expectation maximizations for Motif Elicitation) [100] se realizó la búsqueda de motivos conservados entre las secuencias de las proteínas mencionadas anteriormente.

### 6.2 Cepas bacterianas

Los organismos utilizados en este estudio se enlistan en la Tabla 2. Las bacterias se cultivaron en medio LB (10 g peptona, 5 g extracto de levadura y 10 g de NaCl) o en medio mínimo M9 (Difco, México) suplementado con 0.4% de glucosa, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y 100 mM de CaCl<sub>2</sub> y se incubaron a 37°C. Cuando se requirió, el medio se suplementó con tetraciclina [25 µg ml<sup>-1</sup>], trimetoprim [100 µg ml<sup>-1</sup>], ampicilina [150 µg ml<sup>-1</sup>], kanamicina [50 µg ml<sup>-1</sup>] y polimixina B [25 µg ml<sup>-1</sup>] (Sigma-Aldrich, México).

**Tabla 2. Cepas bacterianas empleadas en este estudio.**

Cepa	Descripción	Fuente/referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	F - $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17(rK_mK+) supE44 thi-1 $\Delta$ gyrA96 relA1	Stock de laboratorio
<i>Burkholderia cenocepacia</i>		
K56-2	Clon ET12 relacionado con J2315, aislado clínico, Gmr	[101]
$\Delta$ <i>btpA</i>	K56-2 conteniendo una eliminación de <i>btpA</i>	[80]
$\Delta$ <i>iscR</i>	K56-2 conteniendo una eliminación de <i>iscR</i>	No publicado
Plásmidos		
pAT52	<i>btpA</i> D127A con etiqueta 10XHis de <i>B. cenocepacia</i> clonado en pSCRhaB2	No publicado
pDA17C10A	<i>btpA</i> C10A y D127A con etiqueta 6XHis clonado en pDA17	No publicado
pRK2013	oricolE1, derivado RK2, Kanr mob+ tra+	[102]
pSCRhaB2	oripBBR1 rhaR, rhaS, PrhaB Tpr mob+	[103]
pDA17	Vector de expresión para <i>Burkholderia</i> , oripBBR1 Tetr mob Pdhfr epitopo FLAG	No publicado

### 6.3 Conjugación triparental

Las cepas donadoras que contenían el plásmido pAT52 y pSCRhaB2 se incubaron toda la noche a 37°C en caldo LB. Posteriormente, se movilizaron los plásmidos a las cepas de *B. cenocepacia*  $\Delta$ *btpA* y  $\Delta$ *iscR* mediante conjugación triparental, utilizando como cepa movilizadora a *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  portadora del plásmido pRK2013. Un

mililitro de cultivo de la cepa receptora se centrifugó durante 2 minutos a 16,200 g, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 800 µl de la cepa donadora. A continuación, se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 µl de la cepa movilizadora. La mezcla se centrifugó nuevamente y la pastilla resultante se resuspendió con 100 µl de caldo LB. La suspensión celular se colocó en el centro de una placa de agar LB y se incubó durante 6 horas a 37 °C. Las colonias resultantes se colectaron y resuspendieron. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 100 µl de cada dilución en agar LB suplementado con antibióticos trimetoprim [100 µg ml<sup>-1</sup>], ampicilina [200 µg ml<sup>-1</sup>] y polimixina B [12 µg ml<sup>-1</sup>] (Sigma-Aldrich, México).

#### **6.4 Escrutinio de las células $\Delta btpA$ -BPtpA<sub>D127A</sub> y $\Delta iscR$ -BPtpA<sub>D127A</sub> transformadas**

Las colonias resultantes de la conjugación triparental se analizaron mediante PCR de colonia utilizando los pares de oligonucleótidos: 7581 (5' TTTCATATGTCTTACAGCAACAAGG 3') y 7582 (5' TTTTCTAGAGGCTGCTGCCTGATCGC 3'). Como control positivo se utilizó la cepa de *B. cenocepacia* K56-2. Los productos de las reacciones de PCR se separaron en geles de agarosa al 1.2 %.

#### **6.5 Expresión de la proteína BPtpA-10XHis en medio rico en nutrientes y estandarización de condiciones óptimas de inducción**

La cepa transconjugante de *B. cenocepacia*  $\Delta btpA$ -BPtpA<sub>D127A</sub> se inoculó en 4 ml de caldo LB suplementado con sus respectivos antibióticos y se incubó a 37°C en agitación a 1200 rpm por toda la noche. Posteriormente, se tomó 1 ml del cultivo y se inoculó en 250 ml de medio LB, el cual se incubó a 37°C en agitación a 1200 rpm. Luego, se midió la DO<sub>595nm</sub> hasta llegar a 0.4-0.6 y se añadió ramnosa (0.2% y 0.4%, concentración final) y después se procedió a recolectar 1 ml de lisados celulares de cada medio a diferentes tiempos (0, 4, 6 y 24 horas). Para evidenciar la presencia de la proteína BPtpA, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% de las muestras, seguida de una tinción con azul de Coomassie.

## 6.6 Expresión de la proteína BPtpA en condiciones limitantes de nutrientes

Las cepas transconjugantes de *B. cenocepacia*  $\Delta btpA$  y  $\Delta iscR$  portadoras del plásmido pAT52 se inocularon en 4 ml de caldo LB suplementado con sus respectivos antibióticos y se incubaron a 37°C en agitación a 1200 rpm por toda la noche. Se tomó 1 ml de cada cultivo y se centrifugó a 13.3 rpm por 1 minuto. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 1 ml de agua estéril, repitiendo este procedimiento dos veces, a continuación, se resuspendió la pastilla en 100 ml de medio M9 (M9 1X, glucosa 0.4%, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y 100 mM de CaCl<sub>2</sub>) y, cuando el medio alcanzó una DO<sub>595nm</sub> de 0.4-0.6, se indujo el crecimiento celular con ramnosa 0.2% y 1 ml de cada suspensión se reservó a las 0, 4, 6 y 24 horas. Por último, las pastillas celulares se resuspendieron con SDS 1X de acuerdo con su DO<sub>595</sub> y se almacenaron a -20°C. Para evidenciar la presencia de la proteína BPtpA, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, seguida de una tinción con azul de Coomassie.

## 6.7 Ensayo *in vitro* de captura de sustrato

Las cepas transconjugantes de *B. cenocepacia*  $\Delta btpA$ -BPtpA<sub>D127A</sub> y  $\Delta iscR$ -BPtpA<sub>D127A</sub>, así como las cepas control *B. cenocepacia*  $\Delta btpA$ -pSCrhaB2 y  $\Delta iscR$ -pSCrhaB2 se inocularon en 250 ml de caldo LB y se incubaron a 37°C en agitación (1200 rpm). Una vez alcanzada una DO<sub>595nm</sub> de 0.5 se añadió ramnosa a una concentración final de 0.2% y se continuó incubando por 4 horas más a 37°C en agitación a 1200 rpm. La suspensión celular se centrifugó a 7800 rpm por 20 minutos y la pastilla resultante se resuspendió en 14 ml de amortiguador de unión BB (Binding Buffer) (20 mM de Tris-HCl y 200mM NaCl a pH 8,). Posteriormente, las células se lisaron mediante sonicación (SONIFIER 250, Branson) y se centrifugaron a 16,200 g por 1 hora a 4°C. Se lavaron y se equilibraron con amortiguador BB, 700 µl de esferas de agarosa (Ni-NTA Agarosa), se transfirieron al sobrenadante del lisado por sonicación y, se incubaron durante 1 hora a 4°C con agitación a 1200 rpm. La

solución se transfirió a una columna cromatográfica de polipropileno 1.5 x 14 cm, con una base de polietileno de porosidad de 30 mm fijado en la salida de la columna y, se realizaron 4 lavados. Primero con 5 ml de amortiguador BB, seguidos de 10 ml de amortiguador BB con 20 mM de imidazol, 10 ml de amortiguador BB con 40 mM de imidazol y 5 ml de amortiguador BB con 40 mM de imidazol. Finalmente, las proteínas co-purificadas se eluyeron con 300  $\mu$ l de amortiguador BB con 300 mM de imidazol y se almacenaron a -20°C. Las fracciones de proteínas co-purificadas se sometieron a SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 15% y se tiñeron con azul de Coomassie.

## **6.8 Cuantificación de proteínas co-purificadas**

Utilizando el método colorimétrico de Bradford (Bradford ULTRA Reagent®), en una placa de 96 pozos, se colocaron por duplicado 50  $\mu$ l de cada una de las proteínas, se añadieron 50  $\mu$ l del reactivo de Bradford en cada pozo y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595nm en un lector de placas (iMark™ BIORAD).

## **6.9 Inmunodetección tipo Western Blot**

Utilizando las eluciones obtenidas en el ensayo de captura de sustrato, se cargaron cantidades iguales de proteína en los pocillos del gel de poliacrilamida al 15%. Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se corrieron durante 3 horas a 75 V. Las membranas fueron bloqueadas toda la noche utilizando una solución de leche semidescremada al 5% en PBS-Tween (PBS 10X, 1% Tween® 20 SIGMA). Posteriormente, las membranas fueron lavadas 4 veces con PBS-Tween 1X, con una duración de 10 minutos cada lavado, y se incubaron con anticuerpos anti-fosfotirosina, diluido 1:4,000 o anticuerpos anti-His Peroxidasa (HRP), diluido 1:5,000 en PBS-Tween 1X durante 4 horas a 4°C con agitación a 1200 rpm. Las muestras incubadas con anticuerpos anti-fosfotirosina se incubaron posteriormente con anticuerpos anti-GAM-HRP diluido 1:10,000 en 1X TBS-Tween durante 4 horas a 4 °C. Se realizaron 4 lavados, de una duración de 10 minutos cada uno. Para la detección de la señal se

siguieron las recomendaciones del fabricante del kit comercial (MILIPORE Immobilon Western®).

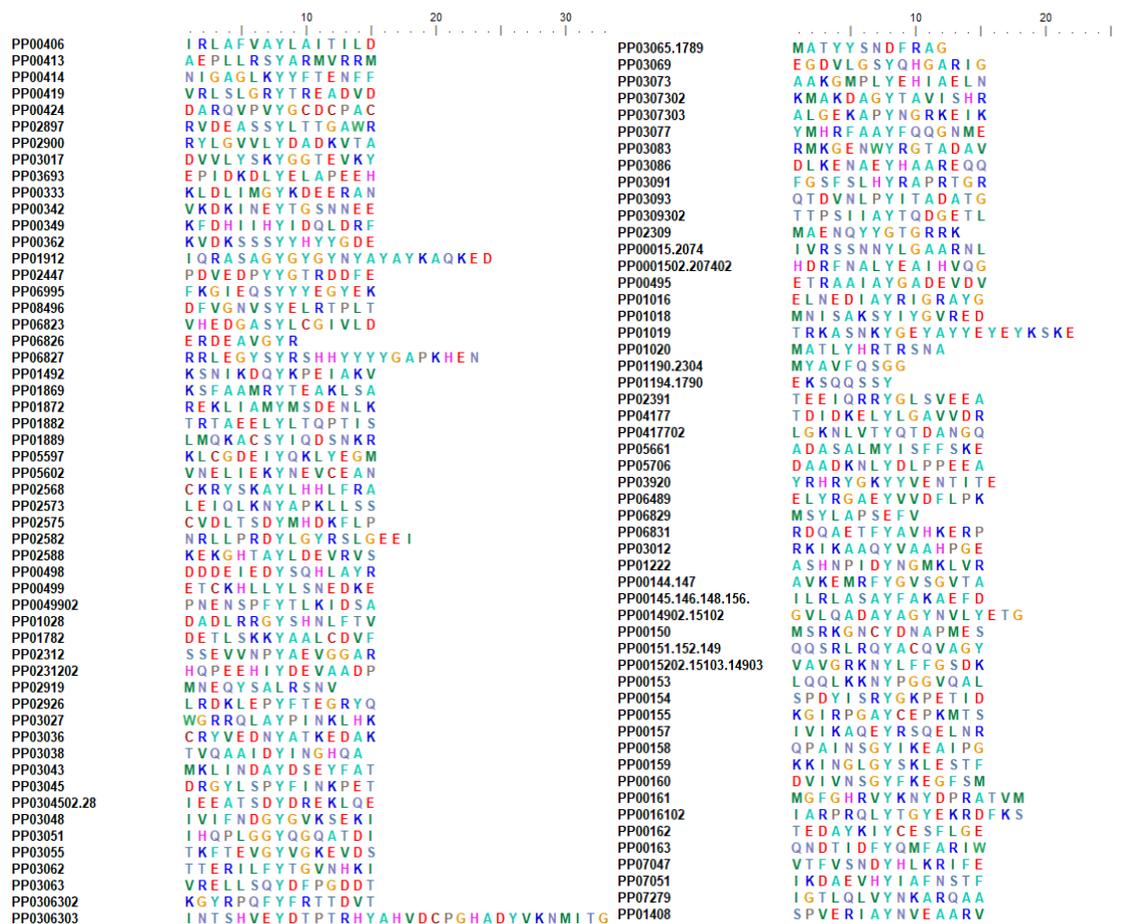
### **6.10 Identificación de péptidos por espectrometría de masas**

Las bandas que resultaron reactivas al anticuerpo anti-P-Tyr se enviaron al servicio de identificación de proteínas por medio de la técnica Huella Peptídica e Identificación por LCMS (Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, por sus siglas en Inglés), del Laboratorio Universitario de Proteómica (LUP) del Instituto de Biotecnología, UNAM.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Identificación de motivos consenso en sitios reportados con residuos de tirosina fosforilados

Al realizar la búsqueda de proteínas reportadas fosforiladas en tirosina de las bacterias filogenéticamente relacionadas con *B. cenocepacia*, solo se recolectó el sitio donde ocurría esta modificación, que corresponde a secuencias de 15 aminoácidos (ej. IRLAFVAYLAITILD) pertenecientes a 27 especies bacterianas diferentes, tales como: *Streptomyces coelicolor*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium smegmatis*, *Neisseria meningitidis*, *Caulobacter vibrioides*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Citrobacter koseri*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Rhizobium meliloti*, *Salmonella agona*, *S. typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Sinorhizobium meliloti*, *Vibrio vulnificus*, *Xanthomonas axonopodis* y *Yersinia enterocolitica*. Se alineó un total de 162 secuencias de proteínas que tenían reportado un residuo de tirosina fosforilada, utilizando BioEdit y UGENE. Se evidenció que existían proteínas idénticas que se reportaban más de una vez, pero en diferentes bacterias. Posteriormente, se realizó un escrutinio de secuencias para descartar las proteínas que se encontraran repetidas y se obtuvo un total de 107 registros (Figura 4).



**Figura 4. Alineamiento de secuencias múltiples.** Alineamiento de las proteínas reportadas fosforiladas en residuos de tirosina en la base de datos dbPSP, pertenecientes a especies representativas del filo Proteobacterias (análisis realizado con el programa UGENE).

Una vez generada la base de datos de 107 secuencias no repetidas, se realizó un BLAST [98] para comparar las secuencias con proteínas pertenecientes a *Burkholderia cenocepacia* K56-2 (GenBank: CP053300.1) y observar si existían residuos conservados. Se obtuvo un total de 6 secuencias de proteínas con una homología del 100% con proteínas de *B. cenocepacia* (Tabla 3). Es importante señalar que las proteínas que tuvieron una homología del 100% codificadas en las diferentes bacterias representativas corresponden a la misma proteína en *B. cenocepacia* K56-2.

**Tabla 3.** Proteínas con homología del 100% con los sitios donde ocurre la fosforilación en tirosina.

dbPSP ID	Nombre de proteína	Especie	Peso (kDa)	Función
PP06828	<b>Factor de elongación Tu</b>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	<b>43.33</b>	Unión de aminoacil-tRNA dependiente de GTP al sitio A de los ribosomas durante la biosíntesis de proteínas.
PP06489	<b>Nitrogen regulatory protein P-II</b>	<i>Rhizobium meliloti</i>	<b>12</b>	Desadenilación de la glutamina sintetasa (GS), activando así la enzima.
PP03062	<b>Elongation factor G</b>	<i>Escherichia coli</i>	<b>77.58</b>	Translocación ribosómica dependiente de GTP
PP03063	<b>Elongation factor Tu</b>	<i>Escherichia coli</i>	<b>43.31</b>	Unión de aminoacil-tRNA dependiente de GTP al sitio A de los ribosomas durante la biosíntesis de proteínas
PP05706	<b>Glutamine synthetase</b>	<i>Pseudomonas taetrolens</i>	<b>51.76</b>	Formación de glutamina a partir de glutamato y amoníaco.
PP03073	<b>Enolasa</b>	<i>Escherichia coli</i>	<b>45.65</b>	Conversión reversible de 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato.

Posteriormente, la base de datos de 107 secuencias de 15 aminoácidos se procesó en la herramienta MEME [100], con el fin de identificar alguna semilla característica entre las secuencias. Esta herramienta arrojó un total de 92 motivos totales, de los cuales 54 contenían homologías en los residuos de tirosina y solo 34 motivos contenían secuencias medianamente conservadas. No se encontraron motivos con más de tres secuencias, evidenciando que los péptidos fosforilados en tirosina reportados en la base de datos dbPSP no comparten una secuencia consenso. Estos 34 motivos de entre 6-10 aminoácidos se utilizaron para realizar un BLAST [98] contra la secuencia completa de *B. cenocepacia* K56-2, donde se encontraron otras 6 secuencias homólogas (Tabla 4).

**Tabla 4.** Proteínas homólogas con las secuencias arrojadas por The MEME suite.

dbPSP ID	Nombre de proteína	Especie	Peso (kDa)	Función
PP03693	Glutamina sintetasa	<i>Streptomyces coelicolor</i>	52.56	Biosíntesis de glutamina dependiente de ATP a partir de glutamato y amoníaco.
PP04177	Succinato - CoA ligasa [formadora de ADP] subunidad beta	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41.54	Acopla la hidrólisis de succinil-CoA a la síntesis de ATP o GTP y.
PP00150	Transposasa de la familia IS3	<i>Shigella flexneri</i>	28.44	Transposición eficaz del ADN.
PP00342	Proteína no caracterizada	<i>Staphylococcus aureus</i>	5.65	-
PP00155	Aconitato hidratasa B	<i>Shigella flexneri</i>	93.5	Cataliza la isomerización estereoespecífica de citrato a isocitrato a través de cis-aconitato en el ciclo de Krebs
PP02582	Proteína no caracterizada	<i>Helicobacter pylori</i>	27.14	-

## 7.2 Identificación de motivos consenso en proteínas completas reportadas con residuos de tirosina fosforilados

Se continuó con la búsqueda de motivos conservados en el sitio de fosforilación en tirosina (secuencia de 15 aminoácidos) utilizando las secuencias completas de las 107 proteínas obtenidas con anterioridad. Para encontrar residuos conservados y comparar las similitudes con proteínas pertenecientes a *B. cenocepacia* K56-2 se realizó un BLAST. Se obtuvo un total de 26 proteínas con una homología >50% con proteínas codificadas en *B. cenocepacia* K56-2. Se establecieron criterios de exclusión, descartando aquellas proteínas reportadas en el análisis anterior y las proteínas que no tenían conservada la tirosina reportada fosforilada en la base de datos dbPSP. Se registró un total de 13 proteínas (Tabla 5).

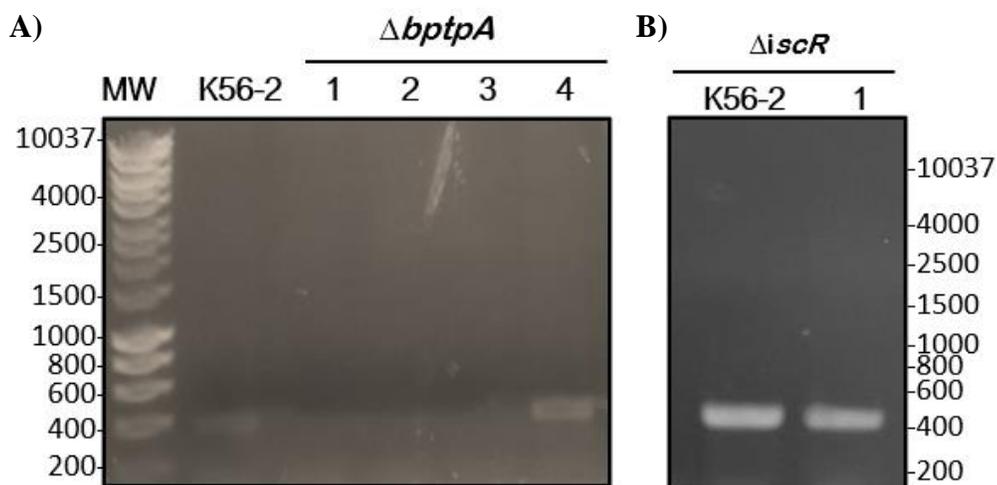
Al utilizar MEME, se buscaron motivos conservados entre las secuencias completas de las proteínas reportadas fosforiladas en tirosina, pero no se encontró una firma identificable. Se obtuvo un total de 432 motivos totales, pero no había motivos con más de 3 secuencias homólogas.

**Tabla 5.** Proteínas completas con homología >50% con proteínas de *B. cenocepacia*.

dbPSP ID	Nombre de proteína	(kDa)	%Identities	Función
PP00028 PP03045	Chaperonina	57.67	69-75	Previene el mal plegado y promueve el ensamblaje de los polipéptidos desplegados generados en condiciones de estrés
PP03027	Proteína ribosomal 30S S6	15.18	66	Implicado en la unión del ARNt al ARNm
PP03038	Proteína transportadora de acilo	8.64	74	Transportador de la cadena creciente de ácidos grasos
PP03048	Co-chaperonina GroES	10.38	54	Ayudar al plegamiento de proteínas
PP03055	Proteasa subunidad HslUV	49.59	65	Descomponen las proteínas expresadas en respuesta a estrés celular
PP03086	Factor elongación GreA	17.64	59	Necesario para la elongación eficiente de la transcripción de la ARN pol
PP03093	Proteína chaperona DnaK	69.11	75	Pliega proteínas nacientes y de proteínas desnaturalizadas por estrés.
PP06829	Transportador de formiatos/nitratos	30.13	74	Generar ATP por fosforilación oxidativa
PP06831	Nucleósido difosfato quinasa	15.21	65	Síntesis de trifosfatos de nucleósidos distintos del ATP
PP03012	Alquilo hidropéroxido reductasa C	20.74	67	Protege en estrés celular oxidativo, catalizando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e hidropéroxidos
PP00161	Citrato sintasa	48.07	66	Cataliza la reacción de condensación tipo aldólica del acetato
PP01408	Subunidad alfa de la ARN pol	36.59	60	Cataliza la transcripción del ADN en ARN
PP03431 PP03430	IscU	13.84	80	Involucrada regulación de la actividad enzimática, catálisis redox, replicación y reparación de ADN, regulación de la expresión genética
PP07176	Proteína chaperona homóloga a la HscA	65.74	60	Maduración de las proteínas que contienen clusters de hierro y azufre

### 7.3 Escrutinio de las células $\Delta bptpA$ -BPtpA<sub>D127A</sub> y $\Delta iscR$ - BPtpA<sub>D127A</sub> transformadas

Las colonias resultantes de la transformación de las cepas *B. cenocepacia*  $\Delta bptpA$ -BPtpA<sub>D127A</sub> y  $\Delta iscR$ -BPtpA<sub>D127A</sub> se analizaron mediante PCR, amplificando el gen *iscU* y utilizando como control positivo la cepa *B. cenocepacia* K56-2. Las colonias transformadas correspondientes a *B. cenocepacia*  $\Delta bptpA$ -BPtpA<sub>D127A</sub> amplificaron un fragmento de tamaño similar (aproximadamente 420 pb) al del control positivo (Figura 5-A, Carril 4). De manera similar, la colonia recuperada de la transformación de la cepa correspondiente a la transformación de *B. cenocepacia*  $\Delta iscR$ -BPtpA<sub>D127A</sub> (Figura 5-B, Carril 1) amplificó el fragmento de tamaño similar al control positivo.

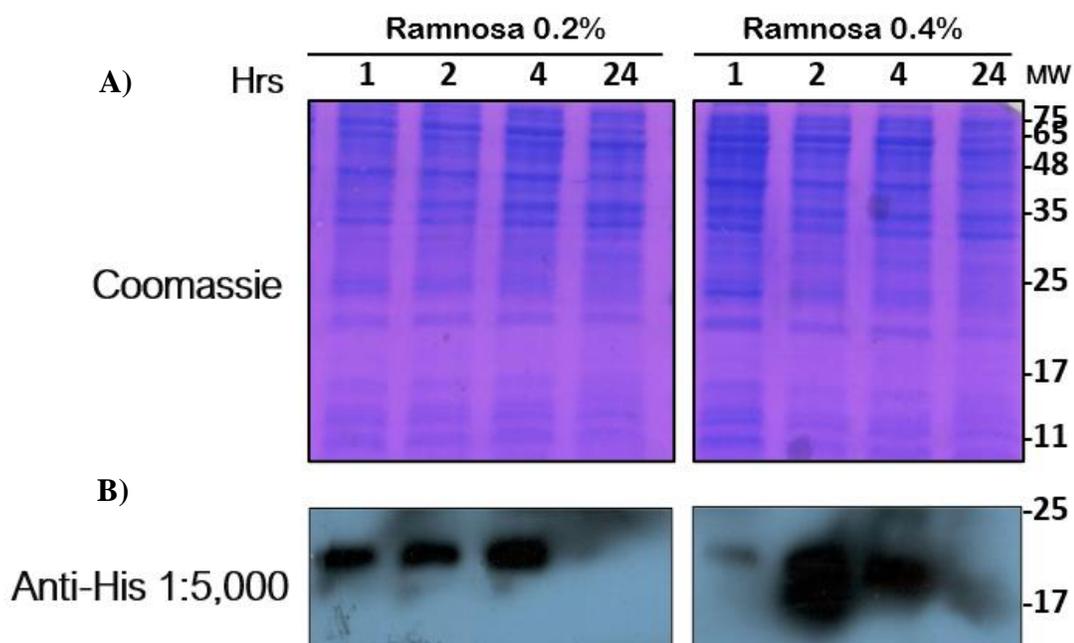


**Figura 5. Análisis de colonias transformadas correspondientes a *B. cenocepacia*.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Se utilizó marcador de peso molecular (MW) de 1Kb. El tamaño de las diferentes bandas se indica en pares de bases (pb). A) PCR de colonias correspondientes de la transformación de *B. cenocepacia*  $\Delta bptpA$ -BPtpA<sub>D127A</sub>, B) PCR de colonias correspondientes de la transformación de *B. cenocepacia*  $\Delta iscR$ -BPtpA<sub>D127A</sub>.

#### 7.4 Condiciones óptimas para la expresión de la proteína recombinante BPtpA

La inducción de BPtpA se realizó en la cepa *B. cenocepacia*  $\Delta btpA/pAT52$ , utilizando dos concentraciones de ramnosa (0.4% y 0.2%). Se tomaron muestras tras 1, 2, 4, y 24 horas de incubación. Los extractos se sometieron a los procedimientos previamente descritos en material y métodos (6.5).

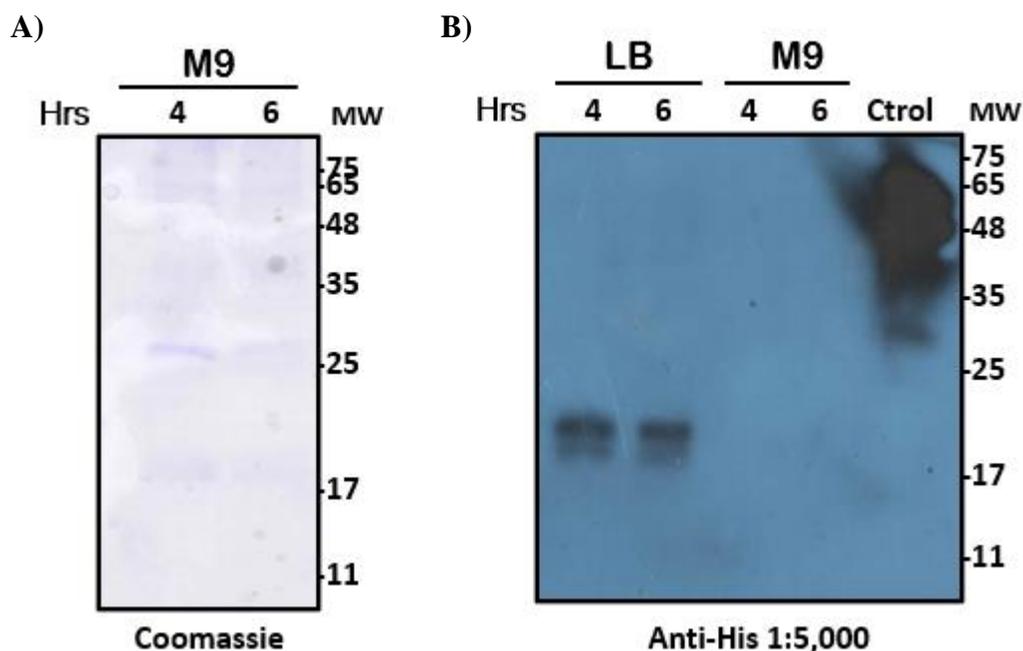
La expresión de la proteína se evidenció empleando un anticuerpo específico para la etiqueta de histidinas. Se observó una banda de aproximadamente 19 kDa (Figura 6-B), correspondiente al peso molecular de BPtpA, con las dos concentraciones de ramnosa utilizados y, en los tiempos de 1, 2 y 4 horas de inducción.



**Figura 6. Expresión de la proteína recombinante BPtpA<sub>D127A</sub>X10His.** Se muestran los lisados celulares de las muestras de *B. cenocepacia*  $\Delta btpA$ -BPtpA<sub>D127A</sub> tomados a la 1, 2, 4 y 24 horas de inducción con concentraciones de 0.2% y 0.4% de ramnosa. MW: Marcador de peso molecular (kDa). A) Análisis mediante SDS-PAGE, B) Confirmación por medio de Western blot con anticuerpo anti-His.

### 7.5 Medio LB favorece una mayor producción de BPtpA

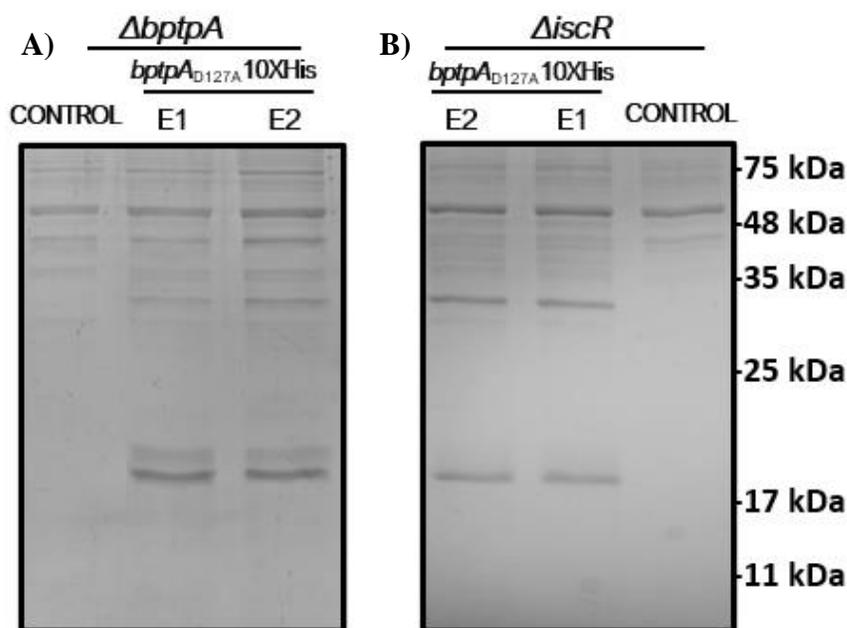
Las cepas de *B. cenocepacia*  $\Delta btpA$  y  $\Delta iscR$  portadoras de pAT52 se inocularon en medio LB y M9. En medio mínimo M9 no se detectó la presencia de BPtpA (Figura 7), mientras que, al utilizar medio LB para la expresión de la proteína, se obtuvo una banda del peso correspondiente a BPtpA (Figura 7-B, carril 1-2). Por lo anterior, se decidió continuar con los experimentos de co-purificación utilizando solamente medio LB y una concentración final de ramnosa de 0.2%.



**Figura 7. Evaluación del medio óptimo para la inducción de la proteína recombinante BPtpA.** A) SDS-PAGE con un gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie de la inducción de BPtpA en medio limitado de nutrientes. MW: Marcador molecular (kDa), B) Inmunoreconocimiento de la fosfatasa BPtpA mutante catalítica en medio limitado de nutrientes y medio enriquecido a diferentes tiempos de inducción.

## 7.6 Co-purificación de proteínas posibles sustratos de BPtpA

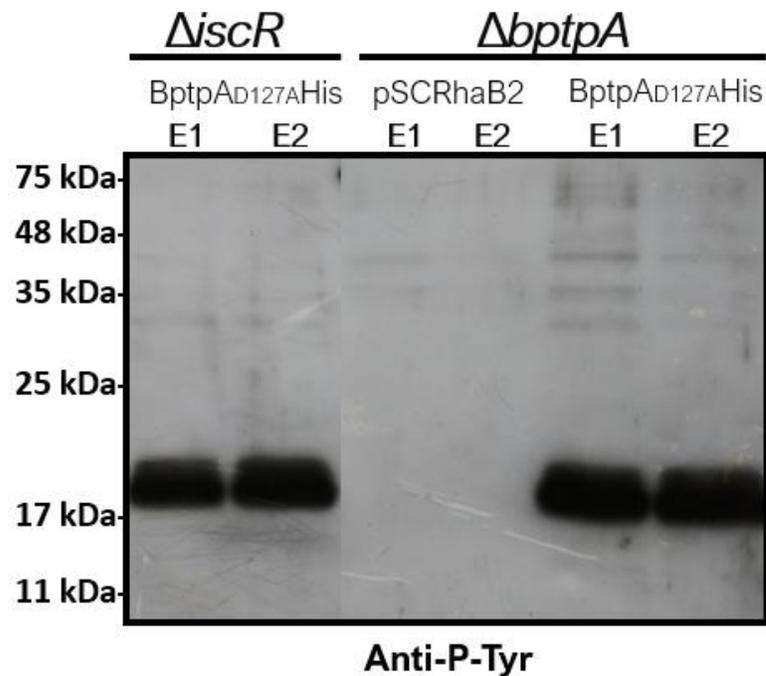
Para la co-purificación de las posibles proteínas que interaccionan con la fosfatasa, se utilizó BPtpA mutante catalítica como cebo. Se emplearon las células transformadas *B. cenocepacia*  $\Delta bptpA$ -BPtpA<sub>D127A</sub> y  $\Delta iscR$ -BPtpA<sub>D127A</sub>, así como los controles negativos *B. cenocepacia*  $\Delta bptpA$ -pSCrhaB2 y  $\Delta iscR$ -pSCrhaB2. Se puede observar que las bandas y posibles sustratos de BPtpA poseen tamaños semejantes en ambos fondos genéticos utilizados (Figura 8A-B, carriles E1 y E2), así como también se observa una banda de 19 kDa correspondiente a BPtpA.



**Figura 8. Comparación de proteínas co-purificadas con BPtpA con los fondos genéticos de *B. cenocepacia*  $\Delta bptpA$  y  $\Delta iscR$ .** Las líneas E1 y E2 corresponden a las dos eluciones con una concentración de 400Mm de imidazol. Control: corresponde a las cepas *B. cenocepacia*  $\Delta bptpA$  y  $\Delta iscR$  con el plásmido pSCrhaB2 vacío. A) Eluciones 1 y 2 de la co-purificación correspondiente al fondo genético *B. cenocepacia*  $\Delta bptpA$ -pSCrhaB2, B) Eluciones 1 y 2 de la co-purificación correspondiente al fondo genético *B. cenocepacia*  $\Delta iscR$ - pSCrhaB2.

Para evaluar el posible estado fosforilado de las proteínas co-purificadas se realizó un Western blot. La señal identificada utilizando el anticuerpo anti-P-Tyr demostró que la banda correspondiente a BPtpA y la banda de aproximadamente 30 kDa fueron

reactivas al anticuerpo anti-P-Tyr, sugiriendo que se encuentran fosforiladas. (Figura 9).



**Figura 9. Evaluación de las proteínas co-purificadas mediante Western blot.** Inmunoreconocimiento de BPTpA y proteínas que interactuaron con BPTpA mutante catalítica, transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpo anti-P-Tyr (1:4,000).

### 7.7 Las proteínas contenidas en la banda de 30 kDa contienen dos posibles sustratos de BPTpA

Los sustratos putativos contenidos en la banda de aproximadamente 30 kDa se identificaron realizando un análisis por espectrometría de masas, encontrándose a la proteína 30S ribosomal S2 y a la proteína acetil-glutamato cinasa, las cuales participan en funciones diferentes en la bacteria (Tabla 6).

**Tabla 6.** Proteínas sustrato putativas identificadas por espectrometría de masas. Se incluyeron candidatos de la banda ~30 kDa (Figura 9, carril E1 y E2, de  $\Delta$ *iscR*-BPTpA<sub>D127A</sub> y  $\Delta$ *bptpA*-BPTpA<sub>D127A</sub>).

Uniprot Accession	Description	Molecular mass kDa	Location	Peptides	Theoretical Peptides	Coverage (%)	Protein ID
RS2_BURCC	30S ribosomal protein S2 OS <i>Burkholderia cenocepacia</i> strain MCO 3 OX 406425 GN rpsB PE 3 SV 1	27.101	~33 kDa band	9	23	35.3659	84104
ARGB_BURCH	Acetylglutamate kinase OS <i>Burkholderia cenocepacia</i> strain HI2424 OX 331272 GN argB PE 3 SV 2	32.089	~33 kDa band	5	26	31.4381	84506

## 8. DISCUSIÓN

*Burkholderia cenocepacia*, así como las especies pertenecientes al Bcc, se encuentran distribuidas de manera diversa en la naturaleza, colonizando diferentes nichos y contribuyendo al crecimiento de diversas plantas. Sin embargo, estas bacterias pueden comportarse como patógenos oportunistas en pacientes con FQ e inmunocomprometidas. Dentro del grupo de especies que componen el Bcc, *B. cenocepacia* representa la especie más comúnmente aislada. Las infecciones por esta bacteria suelen cursar como cuadros pulmonares agudos, denominados síndrome cepacia. Su tratamiento es complicado debido a su resistencia intrínseca a diversos antibióticos de uso clínico [68, 101] y su gran capacidad de adaptación.

Entre sus características de adaptación se encuentra la producción de EPS y la respuesta a condiciones de estrés. De las LMW-PTP de *B. cenocepacia*, BPtpA es la única que se ha asociado con la respuesta al estrés nutricional. Las bases moleculares de su especificidad de sustrato han sido estudiadas previamente en nuestro equipo de trabajo [80, 94]. Este proyecto se enfocó en identificar proteínas que interactúan con BPtpA, con el objetivo de comprender de mejor manera el papel de las enzimas que realizan la fosforilación de tirosinas en la fisiología procarionte.

La búsqueda *in silico* de posibles proteínas fosforiladas de *B. cenocepacia* utilizando la base de datos dbPSP arrojó que 6 sitios de 4 microorganismos diferentes se conservaban en *B. cenocepacia*. Estos 6 sitios pertenecían a las siguientes proteínas: factor de elongación Tu (*Rhodopseudomonas palustris* y *Escherichia coli*) (Figura 10), proteína reguladora del nitrógeno P-II (*Rhizobium meliloti*), factor de elongación G (*Escherichia coli*), glutamina sintetasa (*Pseudomonas taetrolens*) y enolasa (*Escherichia coli*).

Entre las funciones descritas de estas proteínas se puede destacar el factor de elongación Tu (EF-Tu). La fosforilación de EF-Tu se identificó en *E. coli* y *Rhodopseudomonas palustris* (Figura 10), pero también se ha descrito en otras bacterias como *Thermus thermophiles* [102], *B. subtilis* [103], *Corynebacterium glutamicum* [104], *Streptomyces collinus* [105], *Thiobacillus ferrooxidans* [106], *S. pneumoniae* [107], *M. genitalium* [108] y *M. pneumoniae* [108]. Mientras que la

fosforilación de EF-Tu reduce su afinidad de unión a GTP, reduciendo así la síntesis de proteínas, esta modificación post-traducciona también inhibe la unión del antibiótico kirromicina, un inhibidor específico de EF-Tu [109]. Además, la disminución del crecimiento bacteriano asociada a la fosforilación de EF-Tu se ha implicado como una medida de aclimatación a las condiciones de estrés durante la infección [110].

Por otra parte, la glutamina sintetasa (GS) cataliza la condensación dependiente de ATP de amonio y L -glutamato, formando así L -glutamina, ADP, fosfato y un protón. En *M. tuberculosis* su función es esencial para el crecimiento de la bacteria tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que afecta la modulación del pH en los fagosomas, previniendo la fusión fagosoma-lisosoma, además resulta importante en la biosíntesis de la pared celular [111].

De acuerdo con lo anterior, las proteínas descritas resultan posibles candidatos a fosforilación en *B. cenocepacia* y sustrato de BPTpA.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
<i>Elongation_factor_Tu_R_palustris_E_coli</i>	[81	D	C	P	G	H	A	D	Y	V	K	N	M	I	T	G	95]
<i>Elongation_factor_Tu_Burkholderia</i>	[81	D	C	P	G	H	A	D	Y	V	K	N	M	I	T	G	95]

**Figura 10. Alineamiento de secuencia de la proteína factor de elongación Tu.**

Alineamiento del sitio donde se ha reportado fosforilación en tirosina en la proteína factor de elongación Tu en *Rhodopseudomonas palustris* y *E. coli*, con la proteína ortóloga de *B. cenocepacia*.

Al intentar identificar un motivo conservado entre los sitios donde ocurría la fosforilación en tirosina encontramos 34 motivos que contenían secuencias medianamente conservadas. Un resultado semejante se obtuvo al utilizar la secuencia completa de las proteínas reportadas fosforiladas en tirosina. No obstante, no se observaron motivos con una homología en más de tres o cinco secuencias,

respectivamente. Lo anterior, puede deberse a que el sitio donde ocurre la fosforilación no es el reconocido por las BY-cinasas o las fosfatasa, es decir que no hay una firma identificable asociada al sitio de fosforilación.

El alineamiento de las proteínas identificadas con la secuencia completa de *B. cenocepacia* arrojó un total de 14 proteínas con una homología >50%. Entre estas proteínas se encuentra la subunidad HslUV (Figura 11), de una proteasa dependiente de ATP de dos componentes que desempeña funciones importantes en el control de calidad de las proteínas, a menudo eliminando las proteínas dañadas por el calor u otras tensiones desestabilizadoras [112]. En *E. coli* la expresión de las enzimas HslU y HslV aumenta a altas temperaturas y la proteólisis de HslUV es sustancialmente más rápida a temperaturas altas que a temperaturas bajas *in vitro* [112]. En el caso de *Leptospira interrogans*, el proteosoma HslUV contribuye a su supervivencia intracelular al degradar los agregomas que se generan durante la infección de las células huésped [113]. Además de las funciones de HslUV bajo estrés térmico, esta proteasa también cumplen una función importante en la respuesta al estrés en un ambiente ácido [114]. Otra proteína de interés como posible sustrato para BPtpA, fue la proteína ribosomal 30S S6. Después de un choque osmótico en *Listeria monocytogenes* se vió alterada la expresión de varias proteínas, incluida la proteína ribosomal 30S S6, la cual se sobreexpresó al someterse a este estrés [115].

Por otra parte, de los productos codificados por el operón ISC (localizado río abajo de *bptpA*), la proteína de andamio IscU se encuentra implicada en el ensamblaje de grupos de hierro-azufre (Fe-S), un grupo prostético implicado en una amplia variedad de funciones biológicas, desde el transporte de electrones hasta funciones estructurales y de catálisis [116, 117]. En el análisis de alineamiento, IscU de *S. flexneri* y *E. coli* se encontraron reportadas fosforiladas en tirosina. La evidencia proporcionada por el análisis *in silico* coloca a estas proteínas como posibles sustratos para BPtpA por su importancia al participar en procesos indispensables en la bacteria y responder a diferentes señales externas, como lo es el estrés por calor o por un ambiente ácido.

MULTISPECIES: ATP-dependent protease ATPase subunit HslU [Burkholderia]						
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
575 bits(1481)	0.0	Compositional matrix adjust.	289/447(65%)	362/447(80%)	4/447(0%)	
Query 1	MSEHTPREIVSELDKHIIGQDNAKRSVAIALRNRWRRMQLNEELRHEVTPKNILMIGPTG					60
Sbjct 1	MS MTP EIVSELDKHIIGQ AK++VA+ALRNRWRR Q+ + LR E+TPKNILMIGPTG					60
Query 61	VGKTEIARRLAKLANAPFIKVEATKFTVEGVYGVKEVDSIIRDLTDAVKMVRVQAIKRN					120
Sbjct 61	VGKTEIARRLAKLADAPFIKIEATKFTVEGVYGRDVSIVRDLIEISVKQTRAEEMRKVR					120
Query 121	YRAEELAEERILDVLIIP-PAKNNWGTQEQ--QEPSAARQAFRKKLREGLDKKEIEIDL					177
Sbjct 121	+A + AE+RILD+L+P P +G + + +A RQ FRK+LREGLDKKE+E+DL					180
Query 178	AAAPMGVEIMAPPGMEEMTSQLOSMFQNLGGQKQARKLKIKDAMKLLIEEAAKLVNPE					237
Sbjct 181	+G++IMAPPGMEEMT Q++SMF NLG K++ RK+KIK+A+KLL +EEAAK++N E					240
Query 238	ELKQDAIDAVEQHGIVFIDEIDKICKRG-ESSGPDVSREGVQRDLLPLVEGCTVSTKHGM					296
Sbjct 241	E+K A+ VEQ+GIVF+DEIDKI R E SG +VSR+GVQRDLLPLVEG TV+TK+GM					300
Query 297	VKTDHILFIASGAFQIAKPSDLIPELQGRPIRVELQALTTSDFERILTEPNASITVQYK					356
Sbjct 301	VKTDHILFIASGAFHLAKPSDLIPELQGRFPIRVELDSLVDLFEALVATDASLVKQYQ					360
Query 357	ALMATEGVNIETDSGIKRIAEAAWQVNESTENIGARRLHTVLERLMEEISYDASLSGQ					416
Sbjct 361	AL+ATE V +EF D GI+R+AE A+ VNE TENIGARRL+TV+E+L+EE+S+ A + +G+					420
Query 417	NITIDADYVSKHLDALVADELSRFIL 443					
Sbjct 421	+TIDA YV + L + DEDLSR++L 447					

**Figura 11. Alineamiento de la subunidad HslUV de una proteasa dependiente de ATP.** Alineamiento de la secuencia completa de la subunidad HslUV, con una homología del 65% con la proteasa subunidad HslU de *B. cenocepacia*.

Adicionalmente, se analizó la interacción *in vitro* de BPTpA con sus posibles sustratos, así como el estado fosforilado de los mismos. En *E. histolytica*, para identificar sustratos de su LMW-PTP (GenBank: XP\_656359) se realizó una mutante en la cisteína catalítica de su sitio activo, lo que permitió identificar 5 proteínas que desempeñaban papeles importantes en la virulencia de la ameba. Una en la eritrofagocitosis, una en la motilidad y la eritrofagocitosis, dos en el metabolismo y una en la transducción de señales, esclareciendo las vías en las que participa esta fosfatasa [118].

Por otra parte, se decidió utilizar una cepa *B. cenocepacia*  $\Delta$ iscR, ya que IscR es un regulador transcripcional negativo del operón ISC [119] y así se favorecería la disponibilidad de las proteínas ISC y su posible interacción con BPTpA.

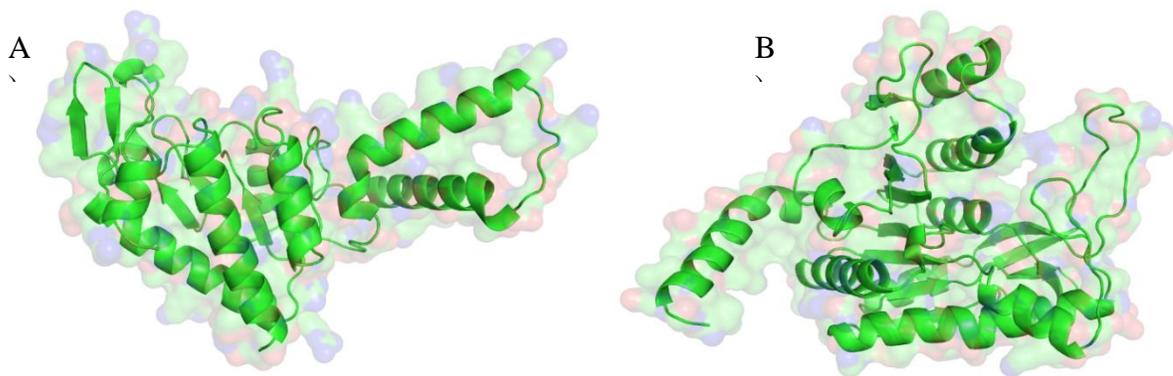
Para optimizar la expresión de BPTpA se realizaron ensayos con diferentes concentraciones finales de ramnosa (0.2 y 0.4%), de acuerdo con lo reportado por Cardona y colaboradores, quienes establecieron que el promotor *rha* responde a bajas

concentraciones de ramnosa (0.2%) [120]. La expresión de BPtpA se observó a partir de esta concentración. Posteriormente, con la finalidad de evaluar y comparar la expresión de nuestra proteína de interés en condiciones óptimas y de estrés en el crecimiento, se realizaron inducciones en dos medios de cultivo distintos, uno rico en nutrientes (LB) y un medio mínimo (M9). La producción de BPtpA se evidenció mediante inmunoreconocimiento con anticuerpos contra la etiqueta de histidinas. La expresión de la proteína sólo se observó en medio rico LB (Figura 7-B). Esto sugiere que el medio mínimo M9 no favorece la transcripción del gen, la activación del promotor en ramnosa o bien la agregación de la proteína codificada como cuerpos de inclusión [121].

A partir de los ensayos de co-purificación se destacó una banda de aproximadamente 30 kDa en los dos fondos genéticos utilizados, la cual podría contener proteínas sustrato de BPtpA.

Previamente se demostró que BPtpA es reactiva al anticuerpo anti-P-Tyr [80]. Los resultados de este trabajo confirman dicha observación (Figura 9, carril 1, 2, 5 y 6, banda 19 kDa). Además, la banda de aproximadamente 30 kDa también resultó reactiva al mismo anticuerpo, sugiriendo que dicha proteína se encuentra fosforilada y representando un sustrato de BPtpA (Figura 9). No obstante, cabe mencionar que se han reportado sustratos de PTP que interactúan con otros dominios de la enzima (lejos del sitio activo), previo a la reacción de desfosforilación [122].

La identificación de las proteínas en la banda de aproximadamente 30 kDa mediante espectrometría de masas derivó en la identificación de la proteína 30S ribosomal S2 y la acetil-glutamato cinasa (Tabla 5). La confirmación de estas proteínas como sustratos de BPtpA daría lugar al acercamiento para determinar la función de BPtpA en diferentes vías celulares importantes para *B. cenocepacia*.



**Figura 12. Estructura tridimensional de los sustratos putativos de BTPtA.** A) Proteína ribosomal 30S S6, B) Proteína acetil glutamato cinasa.

Nuestro estudio *in silico* logró identificar la proteína ribosomal 30S S6, dicha proteína fue reportada fosforilada en tirosina en *E. coli* y cuenta con un homólogo en *B. cenocepacia*. Mediante espectrometría de masas se identificó la proteína ribosomal 30 S2 como proteína co-purificada por BTPtA. La proteína ribosomal S2 está involucrada en la formación del complejo de iniciación de la traducción, donde podría entrar en contacto con el ARN mensajero y varios componentes del ribosoma [123]. Ensayos de captación de sustrato utilizando a la LMW-PTP, Spd1837 de *S. pneumoniae* identificaron a la proteína ribosomal 30 S3 como posible sustrato [124]. Los resultados obtenidos apuntan a que diferentes subunidades de la proteína ribosomal 30S, en especial la subunidad S6, podrían ser sustratos a fosforilación en tirosinas y, por consiguiente, interactuar con BTPtA.

Por otra parte, la proteína *N*-acetil-L glutamato cinasa (NAGK) cataliza el segundo paso en la síntesis de L-arginina, la cual a su vez forma parte de la biosíntesis de aminoácidos y realiza la fosforilación de *N*-acetil-L-glutamato (NAG) para dar *N*-acetil-L-glutamato-5-fosfato [125]. En el caso de las bacterias que no utilizan la ruta lineal de biosíntesis de arginina, esta enzima puede ser inhibida, promoviendo la coordinación de actividades catalíticas y con ello la supervivencia de la bacteria en medio limitado de nutrientes [126]. La alteración en la actividad de esta proteína (por medio de la fosforilación y desfosforilación de tirosina) puede tener implicaciones en la capacidad de *B. cenocepacia* para su respuesta al estrés nutricional.

## 9. CONCLUSIONES

- Por medio de un análisis *in silico* se identificaron 24 proteínas reportadas fosforiladas en residuos de tirosina en la base de datos dbPSP, fueron homólogas con proteínas de *B. cenocepacia*. Entre las funciones de estas proteínas se encuentra la respuesta a diferentes tipos de estrés y privación de nutrientes.
- El uso de una mutante catalítica de BPtpA permitió la interacción de al menos dos proteínas que co-purificaron con la fosfatasa.
- Las proteínas co-purificadas con BPtpA<sub>D127A</sub> en las cepas de *B. cenocepacia*  $\Delta btpA$  y  $\Delta iscR$  fueron semejantes.
- Las inmunotransferencias con un anticuerpo anti-P-Tyr sugieren que las proteínas co-purificadas están fosforiladas.
- El análisis *in silico* predijo una de las proteínas que co-purificaron en el ensayo *in vitro* con BPtpA<sub>D127A</sub>.
- Las proteínas identificadas por LC-MS/MS dentro de la banda de aproximadamente 30 kDa co-purificada con la cepa *B. cenocepacia*  $\Delta iscR$  corresponden a la proteína 30S ribosomal S2 y a la acetil glutamato cinasa.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Burkholder, W.H., *Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs*. Phytopathology, 1950. **40**(1).
2. 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.
3. Yabuuchi, E., et al., *Proposal of Burkholderia gen. nov. and Transfer of Seven Species of the Genus Pseudomonas Homology Group II to the New Genus, with the Type Species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov.* Microbiology and Immunology, 1992. **36**(12): p. 1251-1275.
4. Kersters, K., et al., *Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview*. Systematic and Applied Microbiology, 1996. **19**(4): p. 465-477.
5. Ursing, J., et al., *Taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1995. **45**(3): p. 604-604.
6. Estrada-De Los Santos, P., et al., *To split or not to split: an opinion on dividing the genus Burkholderia*. Annals of Microbiology, 2016. **66**(3): p. 1303-1314.
7. Araujo, W.L., et al., *Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks*. Can J Microbiol, 2001. **47**(3): p. 229-36.
8. da Silva Chaves, J., et al., *Stylosanthes spp. from Amazon savanna harbour diverse and potentially effective rhizobia*. Applied soil ecology, 2016. **108**: p. 54-61.
9. Depoorter, E., et al., *Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers*. Applied microbiology and biotechnology, 2016. **100**(12): p. 5215-5229.
10. Lee, E.Y., *Continuous treatment of gas-phase trichloroethylene by Burkholderia cepacia G4 in a two-stage continuous stirred tank reactor/trickling biofilter system*. J Biosci Bioeng, 2003. **96**(6): p. 572-4.
11. Cauduro, G.P., et al., *New benzo(a)pyrene-degrading strains of the Burkholderia cepacia complex prospected from activated sludge in a petrochemical wastewater treatment plant*. Environ Monit Assess, 2021. **193**(4): p. 163.
12. Vandamme, P., et al., *Burkholderia bryophila sp. nov. and Burkholderia megapolitana sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties*. Int J Syst Evol Microbiol, 2007. **57**(Pt 10): p. 2228-2235.
13. Furuya, N., et al., *Reaction of tobacco and rice leaf tissue infiltrated with Burkholderia glumae or B. gladioli*. Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 1997. **42**(1): p. 43-51.
14. Coenye, T., et al., *Burkholderia fungorum sp. nov. and Burkholderia caledonica sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001. **51**(3): p. 1099-1107.
15. Furuya, N., et al., *Bacterial wilt of russell prairie gentian caused by Burkholderia caryophylli*. Journal of General Plant Pathology, 2000. **66**(4): p. 316-322.
16. Wilkinson, L., *Glanders: medicine and veterinary medicine in common pursuit of a contagious disease*. Med Hist, 1981. **25**(4): p. 363-84.
17. Erdemsurakh, O., et al., *Seroprevalence of equine glanders in horses in the central and eastern parts of Mongolia*. J Vet Med Sci, 2020. **82**(9): p. 1247-1252.

18. Ngamdee, W., et al., *Competition between Burkholderia pseudomallei and B. thailandensis*. BMC Microbiol, 2015. **15**: p. 56.
19. Ketterer, P.J., B. Donald, and R.J. Rogers, *Bovine melioidosis in South-Eastern Queensland*. Aust Vet J, 1975. **51**(8): p. 395-8.
20. Barbour, E.K., et al., *Bacterial identity and characteristics in healthy and unhealthy respiratory tracts of sheep and calves*. Vet Res Commun, 1997. **21**(6): p. 421-30.
21. Nguyen, H.V.N., M.E. Smith, and M.A. Hayoun, *Glanders And Melioidosis*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
22. Dance, D.A., *Ecology of Burkholderia pseudomallei and the interactions between environmental Burkholderia spp. and human-animal hosts*. Acta Trop, 2000. **74**(2-3): p. 159-68.
23. Marrs, E.C.L., A. Perry, and J.D. Perry, *Evaluation of Three Culture Media for Isolation of Burkholderia cepacia Complex from Respiratory Samples of Patients with Cystic Fibrosis*. Microorganisms, 2021. **9**(12).
24. Bylund, J., et al., *Burkholderia cenocepacia induces neutrophil necrosis in chronic granulomatous disease*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(6): p. 3562-3569.
25. Martina, P., et al., *Burkholderia puraquae sp. nov., a novel species of the Burkholderia cepacia complex isolated from hospital settings and agricultural soils*. Int J Syst Evol Microbiol, 2018. **68**(1): p. 14-20.
26. Ong, K.S., et al., *Burkholderia paludis sp. nov., an Antibiotic-Siderophore Producing Novel Burkholderia cepacia Complex Species, Isolated from Malaysian Tropical Peat Swamp Soil*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 2046.
27. De Smet, B., et al., *Burkholderia stagnalis sp. nov. and Burkholderia territorii sp. nov., two novel Burkholderia cepacia complex species from environmental and human sources*. Int J Syst Evol Microbiol, 2015. **65**(7): p. 2265-2271.
28. Weber, C.F. and G.M. King, *Volcanic Soils as Sources of Novel CO-Oxidizing Paraburkholderia and Burkholderia: Paraburkholderia hiiakae sp. nov., Paraburkholderia metrosideri sp. nov., Paraburkholderia paradisi sp. nov., Paraburkholderia peleae sp. nov., and Burkholderia alpina sp. nov. a Member of the Burkholderia cepacia Complex*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 207.
29. Rojas-Rojas, F.U., et al., *[The controversial Burkholderia cepacia complex, a group of plant growth promoting species and plant, animals and human pathogens]*. Rev Argent Microbiol, 2019. **51**(1): p. 84-92.
30. Madigan, M.T., M.T. Madigan, and T.D. Brock, *Brock biology of microorganisms*. 12th ed. 2009, San Francisco, CA: Pearson/Benjamin Cummings. xxviii, 1061 p.
31. Depoorter, E., et al., *Burkholderia cepacia complex taxon K: where to split?* Frontiers in microbiology, 2020: p. 1594.
32. Mullins, A.J., et al., *Genome mining identifies cepacin as a plant-protective metabolite of the biopesticidal bacterium Burkholderia ambifaria*. Nat Microbiol, 2019. **4**(6): p. 996-1005.
33. Malviya, M.K., et al., *Comparative analysis of sugarcane root transcriptome in response to the plant growth-promoting Burkholderia anthina MYSP113*. PLoS One, 2020. **15**(4): p. e0231206.
34. Fajar Irawan, A., et al., *Isolation and Solubilisation of Inorganic Phosphate by *Burkholderia* spp. from the Rhizosphere of Oil Palm*. Pak J Biol Sci, 2020. **23**(5): p. 667-673.
35. Bach, E., et al., *Pangenome inventory of Burkholderia sensu lato, Burkholderia sensu stricto, and the Burkholderia cepacia complex reveals the uniqueness of Burkholderia catarinensis*. Genomics, 2022. **114**(1): p. 398-408.
36. Peled, O., et al., *Contamination of hypertonic saline solutions in use by cystic fibrosis patients in Israel*. J Cyst Fibros, 2014. **13**(5): p. 550-6.

37. Angrup, A., et al., *Systematic review of ultrasound gel associated Burkholderia cepacia complex outbreaks: Clinical presentation, sources and control of outbreak*. Am J Infect Control, 2022.
38. Murugesan, M., et al., *Diagnostic methods and identification challenges experienced in a Burkholderia contaminans outbreak occurred in a tertiary care centre*. Indian J Med Microbiol, 2021. **39**(2): p. 192-195.
39. Savi, D., et al., *Impact of clonally-related Burkholderia contaminans strains in two patients attending an Italian cystic fibrosis centre: a case report*. BMC Pulm Med, 2019. **19**(1): p. 164.
40. Vanlaere, E., et al., *Burkholderia latens sp. nov., Burkholderia diffusa sp. nov., Burkholderia arboris sp. nov., Burkholderia seminalis sp. nov. and Burkholderia metallica sp. nov., novel species within the Burkholderia cepacia complex*. Int J Syst Evol Microbiol, 2008. **58**(Pt 7): p. 1580-90.
41. Wang, R., et al., *Survival after lung transplantation of cystic fibrosis patients infected with Burkholderia dolosa (genomovar VI)*. Clin Transplant, 2018. **32**(5): p. e13236.
42. Leong, L.E.X., et al., *Burkholderia lata Infections from Intrinsically Contaminated Chlorhexidine Mouthwash, Australia, 2016*. Emerg Infect Dis, 2018. **24**(11): p. 2109-2111.
43. Horsley, A., et al., *Burkholderia latens infection in cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2011. **10**(4): p. 291-2.
44. Laha, A., et al., *Investigation of arsenic-resistant, arsenite-oxidizing bacteria for plant growth promoting traits isolated from arsenic contaminated soils*. Arch Microbiol, 2021. **203**(7): p. 4677-4692.
45. Peta, V. and J.E. Pietri, *Experimental infection of bed bugs (Cimex lectularius L.) with Burkholderia multivorans*. Med Vet Entomol, 2021. **35**(3): p. 507-512.
46. Ong, K.S., Y.L. Cheow, and S.M. Lee, *The role of reactive oxygen species in the antimicrobial activity of pyochelin*. J Adv Res, 2017. **8**(4): p. 393-398.
47. Modapathi, S.R., et al., *Comparative analysis of different methods used for molecular characterization of Burkholderia cepacia complex isolated from noncystic fibrosis conditions*. Indian J Med Microbiol, 2022. **40**(1): p. 74-80.
48. Leguizamon, M., et al., *Draft Genome Sequence of Burkholderia puraquae Type Strain CAMPA 1040, Isolated from Hospital Settings in Cordoba, Argentina*. Genome Announc, 2017. **5**(47).
49. Liu, W.H., et al., *Indole-3-Acetic Acid in Burkholderia pyrrocinia JK-SH007: Enzymatic Identification of the Indole-3-Acetamide Synthesis Pathway*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 2559.
50. Savi, D., et al., *Burkholderia pyrrocinia in cystic fibrosis lung transplantation: a case report*. Transplant Proc, 2014. **46**(1): p. 295-7.
51. Hwang, H.H., et al., *A Plant Endophytic Bacterium, Burkholderia seminalis Strain 869T2, Promotes Plant Growth in Arabidopsis, Pak Choi, Chinese Amaranth, Lettuces, and Other Vegetables*. Microorganisms, 2021. **9**(8).
52. Otag, F., et al., *Nosocomial bloodstream infections with Burkholderia stabilis*. J Hosp Infect, 2005. **59**(1): p. 46-52.
53. Liu, J., et al., *Assessment of active bacteria metabolizing phenolic acids in the peanut (Arachis hypogaea L.) rhizosphere*. Microbiol Res, 2017. **205**: p. 118-124.
54. Putra, L., et al., *Isolation, Cloning and Co-Expression of Lipase and Foldase Genes of Burkholderia territorii GP3 from Mount Papandayan Soil*. J Microbiol Biotechnol, 2019. **29**(6): p. 944-951.
55. Lau, E.T., et al., *Plant growth-promoting bacteria as potential bio-inoculants and biocontrol agents to promote black pepper plant cultivation*. Microbiol Res, 2020. **240**: p. 126549.

56. Price, E.P., et al., *Accurate and rapid identification of the Burkholderia pseudomallei near-neighbour, Burkholderia ubonensis, using real-time PCR*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71647.
57. Price, E.P., et al., *Phylogeographic, genomic, and meropenem susceptibility analysis of Burkholderia ubonensis*. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(9): p. e0005928.
58. Rohit, A., et al., *Burkholderia vietnamiensis causing a non-lactational breast abscess in a non-cystic fibrosis patient in Tamil Nadu, India*. Indian J Med Microbiol, 2020. **38**(3 & 4): p. 496-499.
59. Bhakat, K., A. Chakraborty, and E. Islam, *Characterization of zinc solubilization potential of arsenic tolerant Burkholderia spp. isolated from rice rhizospheric soil*. World J Microbiol Biotechnol, 2021. **37**(3): p. 39.
60. Vial, L., et al., *The various lifestyles of the Burkholderia cepacia complex species: a tribute to adaptation*. Environ Microbiol, 2011. **13**(1): p. 1-12.
61. Estfanous, S., et al., *Gasdermin D restricts Burkholderia cenocepacia infection in vitro and in vivo*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 855.
62. Loutet, S.A. and M.A. Valvano, *A decade of Burkholderia cenocepacia virulence determinant research*. Infect Immun, 2010. **78**(10): p. 4088-100.
63. Drevinek, P. and E. Mahenthiralingam, *Burkholderia cenocepacia in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(7): p. 821-30.
64. Martina, P.F., et al., *Burkholderia cepacia complex: 11 years of surveillance in patients with Cystic Fibrosis in Posadas, Argentina*. Rev Argent Microbiol, 2020. **52**(3): p. 176-182.
65. Baldwin, A., et al., *Environmental Burkholderia cepacia complex isolates in human infections*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(3): p. 458-61.
66. Vandamme, P., et al., *Burkholderia cenocepacia sp. nov.--a new twist to an old story*. Res Microbiol, 2003. **154**(2): p. 91-6.
67. Ganesan, S. and U.S. Sajjan, *Host evasion by Burkholderia cenocepacia*. Front Cell Infect Microbiol, 2011. **1**: p. 25.
68. Mahenthiralingam, E., T.A. Urban, and J.B. Goldberg, *The multifarious, multireplicon Burkholderia cepacia complex*. Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(2): p. 144-156.
69. Lessie, T.G., et al., *Genomic complexity and plasticity of Burkholderia cepacia*. FEMS microbiology letters, 1996. **144**(2-3): p. 117-128.
70. Drevinek, P., et al., *Oxidative stress of Burkholderia cenocepacia induces insertion sequence-mediated genomic rearrangements that interfere with macrorestriction-based genotyping*. Journal of Clinical Microbiology, 2010. **48**(1): p. 34-40.
71. Hunt, T.A., et al., *Identification of Burkholderia cenocepacia genes required for bacterial survival in vivo*. Infect Immun, 2004. **72**(7): p. 4010-22.
72. Coenye, T., et al., *Molecular mechanisms of chlorhexidine tolerance in Burkholderia cenocepacia biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(5): p. 1912-9.
73. 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.
74. Poirel, L., et al., *Naturally occurring Class A ss-lactamases from the Burkholderia cepacia complex*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(3): p. 876-82.
75. Kooi, C., et al., *Burkholderia cenocepacia ZmpB is a broad-specificity zinc metalloprotease involved in virulence*. Infection and immunity, 2006. **74**(7): p. 4083-4093.
76. Kotrange, S., et al., *Burkholderia cenocepacia O polysaccharide chain contributes to caspase-1-dependent IL-1beta production in macrophages*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(3): p. 481-8.

77. Sajjan, U., S. Keshavjee, and J. Forstner, *Responses of well-differentiated airway epithelial cell cultures from healthy donors and patients with cystic fibrosis to Burkholderia cenocepacia infection*. *Infect Immun*, 2004. **72**(7): p. 4188-99.
78. Lefebvre, M. and M. Valvano, *In vitro resistance of Burkholderia cepacia complex isolates to reactive oxygen species in relation to catalase and superoxide dismutase production*. *Microbiology (Reading)*, 2001. **147**(Pt 1): p. 97-109.
79. Lefebvre, M.D., R.S. Flannagan, and M.A. Valvano, *A minor catalase/peroxidase from Burkholderia cenocepacia is required for normal aconitase activity*. *Microbiology (Reading)*, 2005. **151**(Pt 6): p. 1975-1985.
80. 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.
81. Getz, L.J., et al., *Tyrosine Phosphorylation as a Widespread Regulatory Mechanism in Prokaryotes*. *J Bacteriol*, 2019. **201**(19).
82. Whitmore, S.E. and R.J. Lamont, *Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence*. *Int J Oral Sci*, 2012. **4**(1): p. 1-6.
83. Grangeasse, C., et al., *Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology*. *Trends in biochemical sciences*, 2007. **32**(2): p. 86-94.
84. Cozzone, A.J., *Protein phosphorylation in prokaryotes*. *Annual Reviews in Microbiology*, 1988. **42**(1): p. 97-125.
85. Zhang, Z.Y., et al., *The Cys(X)5Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis*. *Biochemistry*, 1994. **33**(51): p. 15266-70.
86. Tautz, L. and E.A. Sergienko, *High-throughput screening for protein tyrosine phosphatase activity modulators*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1053**: p. 223-40.
87. Hansson, T., P. Nordlund, and J. Aqvist, *Energetics of nucleophile activation in a protein tyrosine phosphatase*. *J Mol Biol*, 1997. **265**(2): p. 118-27.
88. Alonso, A., et al., *The Extended Family of Protein Tyrosine Phosphatases*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1447**: p. 1-23.
89. Madhurantakam, C., et al., *Crystal structure of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from Mycobacterium tuberculosis at 1.9-A resolution*. *J Bacteriol*, 2005. **187**(6): p. 2175-81.
90. Ruddraraju, K.V., D. Aggarwal, and Z.Y. Zhang, *Therapeutic Targeting of Protein Tyrosine Phosphatases from Mycobacterium tuberculosis*. *Microorganisms*, 2020. **9**(1).
91. 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.
92. Kim, H.S., et al., *Crystal structures of YwqE from Bacillus subtilis and CpsB from Streptococcus pneumoniae, unique metal-dependent tyrosine phosphatases*. *J Struct Biol*, 2011. **175**(3): p. 442-50.
93. 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 (Reading)*, 2014. **160**(Pt 7): p. 1332-1345.
94. Sanchez-Rodriguez, R., et al., *The BPtpA protein from Burkholderia cenocepacia belongs to a new subclass of low molecular weight protein tyrosine phosphatases*. *Arch Biochem Biophys*, 2020. **681**: p. 108277.
95. Shi, Y., et al., *dbPSP 2.0, an updated database of protein phosphorylation sites in prokaryotes*. *Sci Data*, 2020. **7**(1): p. 164.

96. Hall, T.A. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. in *Nucleic acids symposium series*. 1999. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
97. Okonechnikov, K., et al., *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit*. *Bioinformatics*, 2012. **28**(8): p. 1166-7.
98. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. *J Mol Biol*, 1990. **215**(3): p. 403-10.
99. Garcia-Romero, I. and M.A. Valvano, *Complete Genome Sequence of Burkholderia cenocepacia K56-2, an Opportunistic Pathogen*. *Microbiol Resour Announc*, 2020. **9**(43).
100. Bailey, T.L., et al., *The MEME Suite*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(W1): p. W39-49.
101. Lord, R., A.M. Jones, and A. Horsley, *Antibiotic treatment for Burkholderia cepacia complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020. **4**: p. CD009529.
102. Lippmann, C., et al., *Prokaryotic elongation factor Tu is phosphorylated in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. **268**(1): p. 601-607.
103. Lévine, A., et al., *Analysis of the dynamic Bacillus subtilis Ser/Thr/Tyr phosphoproteome implicated in a wide variety of cellular processes*. *Proteomics*, 2006. **6**(7): p. 2157-2173.
104. Bendt, A.K., et al., *Towards a phosphoproteome map of Corynebacterium glutamicum*. *PROTEOMICS: International Edition*, 2003. **3**(8): p. 1637-1646.
105. Mikulik, K. and E. Zhulanova, *Sequencing of the tuf1 gene and the phosphorylation pattern of EF-Tu1 during development and differentiation in Streptomyces collinus producing kirromycin*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1995. **213**(2): p. 454-461.
106. Seeger, M., G. Osorio, and C.A. Jerez, *Phosphorylation of GroEL, DnaK and other proteins from Thiobacillus ferrooxidans grown under different conditions*. *FEMS microbiology letters*, 1996. **138**(2-3): p. 129-134.
107. Sun, X., et al., *Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium Streptococcus pneumoniae*. *Journal of proteome research*, 2010. **9**(1): p. 275-282.
108. Su, H.-C., C.A. Hutchison, and M.C. Giddings, *Mapping phosphoproteins in Mycoplasma genitalium and Mycoplasma pneumoniae*. *BMC microbiology*, 2007. **7**(1): p. 1-15.
109. Sajid, A., et al., *Interaction of Mycobacterium tuberculosis elongation factor Tu with GTP is regulated by phosphorylation*. *Journal of bacteriology*, 2011. **193**(19): p. 5347-5358.
110. Archambaud, C., et al., *Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology*, 2005. **56**(2): p. 383-396.
111. Mowbray, S.L., et al., *Inhibition of glutamine synthetase: a potential drug target in Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules*, 2014. **19**(9): p. 13161-76.
112. Ropelewska, M., M.H. Gross, and I. Konieczny, *DNA and Polyphosphate in Directed Proteolysis for DNA Replication Control*. *Front Microbiol*, 2020. **11**: p. 585717.
113. Dong, S.L., et al., *A leptospiral AAA+ chaperone-Ntn peptidase complex, HslUV, contributes to the intracellular survival of Leptospira interrogans in hosts and the transmission of leptospirosis*. *Emerg Microbes Infect*, 2017. **6**(11): p. e105.
114. Kannan, G., et al., *Rapid acid treatment of Escherichia coli: transcriptomic response and recovery*. *BMC microbiology*, 2008. **8**(1): p. 1-13.
115. Duche, O., et al., *A proteomic analysis of the salt stress response of Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett*, 2002. **215**(2): p. 183-8.

116. Agar, J.N., et al., *IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU*. *Biochemistry*, 2000. **39**(27): p. 7856-62.
117. Adrover, M., et al., *Anatomy of an iron-sulfur cluster scaffold protein: Understanding the determinants of [2Fe-2S] cluster stability on IscU*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1853**(6): p. 1448-56.
118. Linford, A.S., et al., *Crystal structure and putative substrate identification for the Entamoeba histolytica low molecular weight tyrosine phosphatase*. *Mol Biochem Parasitol*, 2014. **193**(1): p. 33-44.
119. Choi, G., et al., *The transcriptional regulator IscR integrates host-derived nitrosative stress and iron starvation in activation of the vvhBA operon in Vibrio vulnificus*. *J Biol Chem*, 2020. **295**(16): p. 5350-5361.
120. Cardona, S.T. and M.A. Valvano, *An expression vector containing a rhamnose-inducible promoter provides tightly regulated gene expression in Burkholderia cenocepacia*. *Plasmid*, 2005. **54**(3): p. 219-28.
121. Garcia-Fruitos, E., et al., *Bacterial inclusion bodies: making gold from waste*. *Trends Biotechnol*, 2012. **30**(2): p. 65-70.
122. Blanchetot, C., et al., *Substrate-trapping techniques in the identification of cellular PTP targets*. *Methods*, 2005. **35**(1): p. 44-53.
123. Bunner, A.E., et al., *The effect of ribosome assembly cofactors on in vitro 30S subunit reconstitution*. *J Mol Biol*, 2010. **398**(1): p. 1-7.
124. Ahmad, Z., R. Morona, and A.J. Standish, *In vitro characterization and identification of potential substrates of a low molecular weight protein tyrosine phosphatase in Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology (Reading)*, 2018. **164**(4): p. 697-703.
125. McClory, J., et al., *Phosphorylation Mechanism of N-Acetyl-l-glutamate Kinase, a QM/MM Study*. *J Phys Chem B*, 2019. **123**(13): p. 2844-2852.
126. Pauwels, K., et al., *The N-acetylglutamate synthase/N-acetylglutamate kinase metabolon of Saccharomyces cerevisiae allows co-ordinated feedback regulation of the first two steps in arginine biosynthesis*. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(5): p. 1014-24.