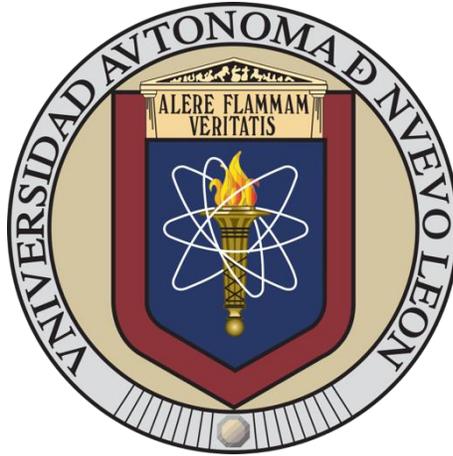


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS IscU y HscA CON LA
FOSFATASA BPTpA de *Burkholderia cenocepacia***

Presentado Por:

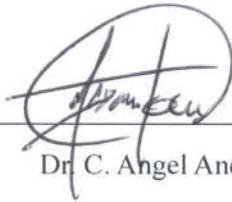
L.B.G. OSCAR MANUEL ALONSO AMBRIZ

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

Noviembre 2024

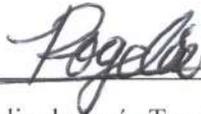
**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS IscU y HscA CON LA
FOSFATASA BtpA de *Burkholderia cenocepacia***

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Angel Andrade Torres

Director



Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel

Co-Director



Dr. C. Miguel Ángel Becerril García

Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS IscU Y HscA CON LA
FOSFATASA B_{PtpA} DE *Burkholderia cenocepacia***

Presentado por:

L.B.G. Oscar Manuel Alonso Ambriz

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 CONAHCYT, Ciencia de Frontera [FORDECYT-PRONACES/40760/2020].

**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS IScU Y HscA CON LA
FOSFATASA BtpA DE *Burkholderia cenocepacia***

L.B.G. Oscar Manuel Alonso Ambriz fue becario del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) con el número de registro 1146782

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Angel Andrade Torres, por su liderazgo, por su orientación y especialmente por su paciencia. Muchas gracias por compartir sus conocimientos conmigo.

A mi comisión de tesis, el Dr. Rogelio de Jesús Treviño Rangel y al Dr. Miguel Ángel Becerril García, por ser excelentes profesores y formar parte de mi formación.

A la Dra. Gloria María González González, muchas gracias por permitirme ser parte del departamento de Microbiología Médica. Muchas gracias por sus clases de micología que tanto disfrutaba.

A todos los doctores del Departamento de Microbiología, muchas gracias por sus enseñanzas, he aprendido mucho de sus clases. Especialmente al Dr. Becerril y al Dr. Gerardo González García por sus aportaciones en los seminarios departamentales, he aprendido mucho de ustedes.

A mis compañeros del posgrado, Sergio, Joan, Lizeth, Brenda, Octavio, Anita y Bere. Muchas gracias por todos los momentos compartidos, sus aportaciones, sus ideas y las pláticas.

A mis compañeros del laboratorio, Lizzy, Carlitos, Fer, Yana y Sam. Ustedes fueron como una segunda familia, considerando todo el tiempo que pasábamos en el laboratorio. Gracias por la gran familia que formamos, los quiero mucho.

A mi familia, por apoyarme siempre, especialmente a mi mamá Verónica. Tu eres mi pilar y mi fuerza.

A mi esposo Jorge Ramos, gracias por acompañarme a lo largo de este proceso. Gracias por echarme porras, tenerme paciencia y creer en mí, te amo.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Modificaciones postraduccionales en bacterias	1
1.2 Fosforilación de tirosinas en bacterias	2
1.2.1 Cinasas de tirosina bacterianas.....	3
1.2.2 Tirosina-fosfatasas de bajo peso molecular.....	5
1.2.3. Implicaciones de la fosforilación de tirosina en la fisiología bacteriana.....	7
1.3. Centros hierro-azufre en bacterias.....	9
1.3.1 Sistema ISC.....	10
1.4 Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	12
1.4.1 Historia e identificación del complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	12
1.4.2 Microbiología, taxonomía y ecología del Bcc.....	13
1.5 <i>Burkholderia cenocepacia</i>	16
1.5.1 Relevancia clínica	17
1.5.2 Patogénesis y factores de virulencia.....	20
2. ANTECEDENTES.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 Cepas bacterianas	30
6.2 Purificación de proteínas IscU, HscA y BtpA.....	31
6.3 Cuantificación de proteínas recombinantes.....	33
6.4 Electroforesis de proteínas en gel poliacrilamida.....	33
6.5 Inmunodetección por Western Blot anti-fosfotirosina.....	34
6.6 Preparación de IscU y HscA para espectrometría de masas.....	34
6.7 Extracción de DNA cromosómico de la cepa de <i>B. cenocepacia</i> K56-2	34
6.8 Amplificación del gen <i>btpA</i> de <i>B. cenocepacia</i> K56-2.....	35
6.9 Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> DH5 α , BL21(DE3) y SU202	36
6.10 Electroporación y extracción del plásmido pMAL-c2X	36
6.11 Clonación del gen <i>btpA</i> en el plásmido pMAL-c2X	37
6.12 Escrutinio de colonias <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con pMAL-c2X- <i>btpA</i>	37
6.13 Evaluación de la construcción generada	38

6.14	Transformación de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) con el plásmido pMAL-c2X- <i>btpA</i>	38
6.15	Purificación de la proteína de fusión MBP-BPtpA y MBP	39
6.16	Ensayo <i>pull-down</i> con MBP y MBP-BPtpA como carnada	40
6.17	Inmunodetección por Western blot anti-FLAG	40
6.18	Ensayo <i>pull-down</i> con BPtpA-His10x como carnada e IscU-FLAG como presa	40
6.19	Ensayo <i>pull-down</i> con HscA-His10x como carnada y BPtpA-His10x-FLAG como presa ..	41
6.20	Co-transformación de <i>E. coli</i> SU202 con las construcciones pSR658 y pSR659	42
6.21	Ensayos de doble híbrido bacteriano	42
6.22	Evaluación <i>in vitro</i> de actividad fosfatasa	43
6.23	Ensayo de desfosforilación de IscU y HscA por BPtpA	44
7.	RESULTADOS	45
7.1	Producción de las proteínas recombinantes IscU, HscA, BPtpA y BPtpA _{D127A}	45
7.2	Inmunodetección de la fosforilación en tirosina de IscU y HscA	46
7.3	Detección de la fosforilación en tirosina de IscU y HscA por espectrometría de masas	47
7.4	Extracción de DNA	48
7.5	Clonación del gen <i>btpA</i> de <i>B. cenocepacia</i> en el plásmido pMAL-c2X	49
7.6	Evaluación del producto de clonación	50
7.7	Producción de proteínas MBP y MBP-BPtpA	51
7.8	Interacción inespecífica de MBP con las proteínas sustrato	52
7.9	BPtpA interactúa con IscU	53
7.10	Co-transformación de la cepa de <i>E. coli</i> SU202	54
7.11	Doble híbrido bacteriano	54
7.12	Evaluación de la actividad fosfatasa de BPtpA <i>in vitro</i>	56
7.13	BPtpA no desfosforila a las proteínas sustrato	57
8.	DISCUSIÓN	58
9.	CONCLUSIONES	64
10.	PERSPECTIVAS	65
11.	BIBLIOGRAFÍA	66

Lista de Figuras

Figura 1. Octámero de la BY-cinasa Wzc de <i>E. coli</i> (PDB:7NHR), representación en superficie..	4
Figura 2. Representación en listones de la LMW-PTP Wzb de <i>E. coli</i> (PDB: 2FEK).	6
Figura 3. Implicaciones de la fosforilación de tirosinas en la biología celular bacteriana.	9
Figura 4. Sistema de ensamblaje y transporte de los centros Fe-S. del sistema ISC.	12
Figura 5. Producción recombinante de IscU, HscA, BPtpA y BPtpA _{D127A} .	45
Figura 6. Evaluación del estado tirosina-fosforilado de las proteínas IscU y HscA por Western blot.	46
Figura 7. Identificación de fosfopéptidos por espectrometría de masas	47
Figura 8. Purificación de DNA cromosómico de <i>B. cenocepacia</i> K56-2 y plásmido pMAL-c2X.	48
Figura 9. Análisis de colonias transformadas.	49
Figura 10. Evaluación del producto de clonación.	50
Figura 11. Producción y purificación de MBP y MBP-BPtpA.	51
Figura 12. Ensayo <i>pull-down</i> con MBP-BPtpA como carnada.	52
Figura 13. Ensayo <i>pull-down</i> con BPtpA-His y HscA-His como carnada.	53
Figura 14. Análisis de las colonias co-transformadas.	54
Figura 15. Evaluación de la interacción entre BPtpA e IscU y BPtpA e IscU _{Y61E} por doble híbrido bacteriano.	55
Figura 16. Actividad fosfatasa in vitro de las diferentes fosfatasas purificadas.	56
Figura 17. Evaluación de la desfosforilación de IscU y HscA.	57
Figura 18. Alineamiento de secuencias de las proteínas IscU de <i>B. cenocepacia</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. flexneri</i> .	59
Figura 19. Interfaz de la interacción entre IscS (verde) e IscU (naranja).	61

Lista de Tablas

Tabla 1. Especies pertenecientes al complejo <i>Burkholderia cepacia</i> descritas hasta el 2024.	15
Tabla 2. Contexto genético del homólogo de <i>btpA</i> en especies del orden <i>Burkholderiales</i>	26
Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.	30
Tabla 4. Condiciones de PCR para amplificar el gen <i>btpA</i> de <i>B. cenocepacia</i> K56-2.	35
Tabla 5. Condiciones de PCR para el escrutinio de la transformación con la construcción en pMAL-c2X.	38
Tabla 6. Condiciones de PCR para el escrutinio de la transformación con las construcciones en pSR658 y pSR659.	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Modificaciones postraduccionales en bacterias

La homeostasis puede ser definida como la propiedad de los organismos biológicos de mantener un ambiente interno normal ante perturbaciones, con el fin de continuar con el funcionamiento correcto del organismo (1).

Para alcanzar la homeostasis, las bacterias utilizan sistemas de retroalimentación, que consisten en moléculas receptoras de estímulos que sensan cambios en el ambiente y que activan moléculas mensajeras que transmiten el mensaje a distintos niveles de regulación para que se pueda montar una respuesta apropiada. A través de estos mecanismos, una bacteria puede ajustar respuestas ante cambios en su entorno y lograr adaptarse a él.

Debido a que la mayoría de las moléculas que reciben los estímulos y transfieren el mensaje son proteínas, las modificaciones postraduccionales (MPT) juegan un rol importante en la respuesta homeostática. Las MPT son cambios químicos que ocurren en las proteínas después de ser sintetizadas. La mayoría de estos cambios consiste en añadir un grupo funcional de manera covalente a la cadena lateral de algún residuo en el péptido (2). Estas modificaciones afectan la carga, conformación, localización, interacciones y función de las proteínas. Por lo tanto, funcionan como reguladores de estas.

Históricamente, las MPT en bacterias se describieron años después que en eucariontes, ya que no se identifican con la misma facilidad (3). Lo anterior se debe a que las MPT en bacterias son menos abundantes, a que los niveles de MPT en bacterias son subestequiométricos y a que los algoritmos empleados para identificar MPT no eran los adecuados para muestras bacterianas (4).

Sin embargo, gracias al avance en los instrumentos de análisis y el conocimiento sobre la biología molecular de bacterias, actualmente ha sido posible reconocer múltiples MPT en estos microorganismos. Hoy en día sabemos que similar a los organismos eucariontes, las bacterias llevan a cabo glucosilación, acetilación, y fosforilación de proteínas, entre otras (4), activación de proteínas a través de corte proteolítico (5) e incluso marcaje de proteínas con otras proteínas para su degradación (6).

Las MPT se han asociado a diferentes aspectos de la fisiología bacteriana, como; regulación del ciclo celular, regulación del metabolismo, respuesta al estrés, señal de quórum, esporulación, patogenicidad, entre otros (4). Además, es común encontrar un péptido con múltiples modificaciones, lo que indica una coordinación entre éstas (4).

La mayoría de estas MPT son dinámicas y reversibles y son catalizadas por enzimas especializadas que agregan los grupos funcionales y en contraparte, otro grupo de enzimas se encarga de removerlos. Estas enzimas están bien reguladas, y por su capacidad de modificar múltiples aspectos de sus sustratos, son las encargadas de mediar la transducción de señales (4).

1.2 Fosforilación de tirosinas en bacterias

La fosforilación en residuos de tirosina consiste en añadir un grupo fosfato (PO_4) a un grupo hidroxilo libre en la cadena lateral de un residuo de tirosina en una proteína (7). Esta MPT fue inadvertida en procariontes por varias décadas e incluso se pensaba que se encontraba restringida a organismos eucariontes, en los cuales se describió desde la década de 1950 como una MPT importante en la señalización celular (8,9).

En la década de 1970 se identificaron los primeros péptidos bacterianos con aminoácidos fosforilados (10), y hasta 1986 los primeros conteniendo tirosinas fosforiladas, a partir de muestras de *Escherichia coli* (11). Posteriormente, para la década de 1990, se había comprobado que las bacterias también incorporaban la fosforilación de proteínas como parte de la transducción de señales. Sin embargo, ésta ocurría predominantemente en histidina y aspartato, formando parte de los bien descritos sistemas de dos componentes (12). A inicios de esa misma década, se descubrieron en bacterias genes homólogos a las cinasas eucariontes de serina/treonina (STPK), e incluso se caracterizaron algunas de estas proteínas (13,14). Finalmente, en 1997, Grangeasse y colaboradores describieron una enzima de *Acinetobacter johnsonii* capaz de autofosforilarse en residuos de tirosina, denominada Ptk (15). A partir del descubrimiento y caracterización de Ptk, se han descrito genes homólogos a *ptk* en la mayoría de los genomas bacterianos secuenciados (16). Actualmente, con mejores procesamientos de muestras y la tecnología de espectrometría de masas se ha descrito que fracciones

significativas de proteomas bacterianos incorporan fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina (4). De hecho, se ha desarrollado una base de datos de sitios de fosforilación en procariontes, dbPSP, por sus siglas en inglés: <http://dbpsp.biocuckoo.cn> (17). De manera general, la fosforilación de tirosinas “activa” a las proteínas, en consecuencia, modifican su actividad enzimática su localización intracelular o su interacción con otras proteínas. Por otro lado, normalmente la remoción del grupo fosfato (desfosforilación) restaura el sistema para prepararlo ante un nuevo estímulo (18). Por lo tanto, las enzimas, que llevan a cabo esta MPT funcionan como “interruptores moleculares”.

1.2.1 Cinasas de tirosina bacterianas

A partir del reporte de la cinasa Ptk, se han identificado proteínas homólogas a ésta en diferentes bacterias y se ha confirmado su actividad de tirosina cinasa. Sin embargo, no se han encontrado proteínas homólogas a Ptk en eucariontes ni en arqueas (19). Además, la estructura y el mecanismo catalítico de Ptk y sus homólogos difieren de las cinasas eucariontes (20). Por lo anterior, éstas proteínas se unificaron bajo una misma familia, denominada cinasas de tirosina bacteriana o BY-cinasas (del inglés, *Bacterial tyrosine-kinase*) (21).

Las BY-cinasas constan de 3 regiones principales: 1) el dominio N-terminal compuesto por dos dominios transmembranales entre los cuales se forma un asa que sobresale hacia el periplasma en Proteobacteria o hacia el espacio extracelular en Firmicutes y la que probablemente participe en la recepción de un estímulo (22). 2) El dominio C-terminal se encuentra en el citoplasma, contiene el sitio catalítico y los dominios que unen al ATP: Walker A (A/Gx₅GK[S/T]) y Walker B (hhhhDxxP), donde x corresponde a cualquier residuo y h a un residuo hidrofóbico; así como un dominio Walker A' (hhhDxDxR) necesario para unir el Mg⁺². 3) El clúster de tirosinas (YC), comprende los últimos residuos (10-20 aminoácidos) del extremo C-terminal y contiene un grupo de 3 a 7 tirosinas, todas sustrato a autofosforilación (20).

Algo que llama la atención es el hecho de que generalmente, el dominio transmembranal y citosólico se encuentran codificados por un solo gen en Proteobacteria, mientras que en Firmicutes estos dominios son codificados por genes diferentes. No obstante, la interacción

de ambos péptidos es necesaria para su funcionalidad. Además, los genes que codifican para las BY-cinasas suelen encontrarse en operones asociados a la síntesis y exportación de exopolisacáridos (EPS) (21).

En cuestión evolutiva, las proteínas más relacionadas con las BY-cinasas son las ATPasas de arsenito (ArsA) y MinD. Estudios filogenéticos sugieren que estos tres tipos de enzimas se originaron a partir de una ATPasa bacteriana común, ya que comparten los motivos Walker y la actividad ATPasa (20).

El mecanismo catalítico de las BY-cinasas propuesto involucra un octámero, en el que las tirosinas del YC de cada subunidad se encuentran unidas al sitio activo de las subunidades vecinas, por lo que se llevaría a cabo una trans-autofosforilación (Figura 1) (23–25). Los residuos conservados de lisina y arginina en el motivo Walker A y los aspartatos de los motivos Walker B y A' funcionarían para la unión del ATP y del cofactor Mg^{+2} (22). Se propone que los grupos hidroxilo de los anillos aromáticos de las tirosinas interaccionarían con el segundo aspartato del motivo Walker A' de la subunidad adyacente, que sirve como catalizador ácido de la trans-autofosforilación (20).

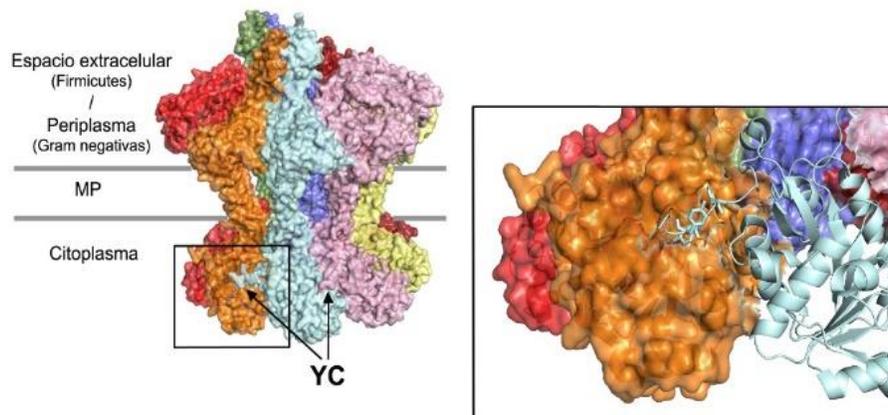


Figura 1. Octámero de la BY-cinasa Wzc de *E. coli* (PDB:7NHR), representación en superficie. Cada subunidad del octámero se encuentra en diferente color. Las flechas indican el YC de dos subunidades. Izquierda, ampliación del recuadro marcado. Se retiró la superficie de la subunidad (celeste) para observar el YC en el sitio catalítico de la subunidad adyacente (naranja). Tomado de (18).

A diferencia de las cinasas eucariontes que se suelen activar por la fosforilación de un residuo específico, las BY-cinasas suelen fosforilarse en varias tirosinas de su YC (26). De hecho, se propone que la fosforilación de múltiples tirosinas en el YC de las subunidades del octámero promueve su disociación y esto conlleva a la transferencia del grupo fosfato a otros sustratos (27,28) y/o su desfosforilación por alguna tirosina fosfatasa específica (24). Cuando los YC de las BY-cinasas se encuentran desfosforilados se promueve su oligomerización y reinicia el ciclo (28).

1.2.2 Tirosina-fosfatasas de bajo peso molecular

Por otro lado, las enzimas que “apagan” el sistema son las que llevan a cabo la remoción del grupo fosfato. Estas son las proteínas tirosina fosfatasas (PTP por sus siglas en inglés). En bacterias, se han identificado numerosas PTP, de las cuales la mayoría son homólogas a las eucariontes (29). Existen distintos tipos de PTP en procariontes: las PTP de tipo eucariota y fosfatasas de doble especificidad (DSP por sus siglas en inglés) con especificidad por serina/treonina y tirosina, las fosfatasas polimerasa-histidinol (PHP por sus siglas en inglés) y las PTP de bajo peso molecular (LMW-PTP). De estas, las PHP son más frecuentes en Firmicutes, mientras que las LMW-PTP en Proteobacteria (30).

Las LMW-PTP son fosfatasas ubicuas, con presencia en los tres dominios (31). Evolucionaron de un gen ancestral que también dio lugar a las reductasas de arsenito (32). En Proteobacteria, los genes que codifican para las LMW-PTP normalmente se encuentran adyacentes a los que codifican a las BY-cinasas dentro de operones asociados al metabolismo de EPS (20). De ahí que las primeras funciones asociadas a estas enzimas fuera la producción de EPS.

La estructura de las LMW-PTP consiste en 3 regiones principales: 1) Un asa P, en donde se encuentra el motivo conservado C(X)₅R y que contiene la cisteína catalítica. 2) Un asa D, que contiene un residuo de aspartato conservado importante para la actividad fosfatasa y 3) el asa W que contiene un residuo triptófano importante para el reconocimiento de sustrato (Figura 2) (30).

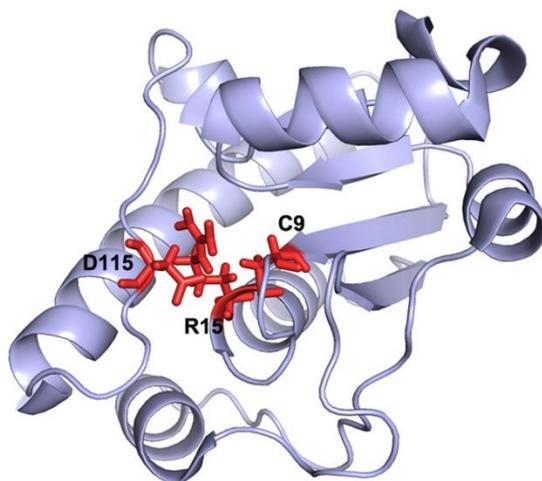


Figura 2. Representación en listones de la LMW-PTP Wzb de *E. coli* (PDB: 2FEK). Se muestran los residuos catalíticos en barras rojas. Tomado de (18).

El mecanismo de acción consiste en el acomodo del grupo fosfato por el residuo de arginina del motivo C(X)₅R cerca del residuo cisteína catalítico del mismo motivo. La cisteína lleva a cabo un ataque nucleofílico hacia el átomo de fósforo, lo que provoca la ruptura del enlace éster. Esto genera un cambio conformacional en la proteína que acerca el aspartato del asa D al sitio activo y este se comporta como un catalizador ácido, lo que permite la liberación del sustrato desfosforilado y de un fosfato inorgánico (33).

La estructura y mecanismo catalítico de las LMW-PTP bacterianas y eucariontes son similares: ambas pueden desfosforilar el *p*-nitrofenol fosfato (PNPP) y fosfotirosina, son inhibidas por el molibdato de amonio y el ortovanadato de sodio, son reguladas por la oxidación reversible de las dos cisteínas del sitio activo y no tienen efecto sobre residuos de serina o treonina fosforilados (31). A pesar de las similitudes, algunos grupos de investigación han sugerido que las LMW-PTP de bacterias y eucariontes pueden separarse en dos clases, esto debido a estudios estructurales, filogenéticos y funcionales (30,31,34). Estas diferencias podrían explotarse en la investigación y diseño de inhibidores de LMW-PTP bacterianas, ya que estas enzimas son bien reconocidas por ser factores de virulencia por su rol en la biosíntesis de EPS (35).

1.2.3. Implicaciones de la fosforilación de tirosina en la fisiología bacteriana

Actualmente se reconoce la fosforilación de tirosinas como un mecanismo regulador importante que impacta distintos aspectos de la biología bacteriana (7). Sin embargo, identificar los sustratos de esta modificación sigue siendo desafiante (4).

Los primeros estudios que atribuyeron alguna función a esta MPT corresponden a trabajos relacionados a la biogénesis de los polisacáridos capsulares (PC) (36,37). Esto se debe a que como ya se mencionó, la mayoría de los genes que codifican para las BY-cinasas y las PTP se encuentran en operones asociados a esta vía fisiológica. En estos trabajos se describe la importancia de las BY-cinasas y de las PTP en el proceso de la síntesis y exportación de estos polisacáridos (Figura 3). De manera general, se cree que es necesario alternar entre los estados fosforilados y desfosforilados de las BY-cinasas en distintas partes del proceso, ya que se propone que el octámero conforma una plataforma para la unión de la flipasa y polimerasa que realizan la traslocación y polimerización de los PC, respectivamente (23). De hecho, las BY-cinasas que participan en este proceso se denominan PCP-2A (del inglés *polysaccharide co-polymerase class 2A*) (38). Adicionalmente, la UDP-glucosa deshidrogenasa (Ugd) de *E. coli* se ha reportado como sustrato de las BY-cinasas Wzc y Etk. La fosforilación de Ugd modifica su actividad enzimática, lo que impacta en la cantidad de PC de la bacteria (39).

En *Streptococcus pneumoniae* se ha reportado que la delección de la BY-cinasa CpsCD provoca la acumulación intracelular de PC y genera un efecto letal al secuestrar precursores de peptidoglucano (27). Por otro lado, se ha evidenciado que CpsD interactúa con ParB (asociada a la segregación cromosómica), y que es necesaria para una correcta división celular (Figura 3). Se cree que la síntesis de la cápsula y la segregación del cromosoma están regulados por la fosforilación de CpsD (40,41). Otro efecto de la fosforilación de tirosinas relacionado a la división celular se ha encontrado en *Shigella flexneri*, en donde se ha reportado que esta MPT podría impactar en la formación del septo, al regular la interacción entre FtsA y FtsZ (42).

Por otra parte, la fosforilación de tirosinas también parece tener un efecto en la expresión genética, al modular la actividad de reguladores transcripcionales (Figura 3). En *Bacillus subtilis* se ha identificado el represor transcripcional SalaA como fosforilado en tirosina. Su fosforilación conlleva un cambio conformacional que lo vuelve más afín a sus secuencias de unión (43). En *S. flexneri* se ha reportado que el regulador transcripcional VirB es sustrato de esta MPT y se cree que pudiera afectar en la expresión de genes de virulencia (42). En *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) se ha evidenciado que el regulador transcripcional Cra es fosforilado en tirosina. Este regulador se comporta como un represor de genes asociados a virulencia. Su fosforilación inhibe su unión al ADN, lo que permite la expresión de estos genes (44). De otro modo, en *Porphyromonas gingivalis* se ha observado que la desfosforilación del regulador transcripcional CdhR por la LMW-PTP Ltp1 permite la expresión de la fimbria Mfa1, esencial para la formación de biopelícula (45).

La fosforilación de tirosinas en bacterias también contribuye en la respuesta al estrés (Figura 3). Se ha descrito que la chaperona DnaK de *B. subtilis* es sustrato de fosforilación en tirosina y que esta MPT regula su actividad. Shi y colaboradores reportaron que la tirosina sustrato a fosforilación de DnaK era necesaria para la interacción con sus co-chaperonas y en la consecuente respuesta al estrés térmico (46). También en *B. subtilis* se encontró que la proteína de unión a cadena sencilla, SSB, incrementa su afinidad por el ADN cuando se encuentra fosforilada en tirosina. Se propone que esta MPT regula su unión al ADN y a la vez, la actividad de la proteína reparadora de daño RecA. Cuando SSB se desfosforila, permite que RecA inicie su función reparadora (47). En el caso de *Deinococcus radiodurans* se ha visto que la fosforilación de RecA en tirosina y treonina aumenta su afinidad por el ADN (48).

Adicionalmente, se reportó que mutar la BY-cinasa BceF en *Burkholderia contaminans* disminuye la tasa de recuperación ante estrés por radiación (49), mientras que eliminar la LMW-PTP BPtpA en *B. cenocepacia* afecta negativamente su capacidad de crecimiento ante estrés nutricional (50). Estos datos sugieren un papel de la fosforilación de tirosinas en la respuesta ante diferentes tipos de estrés en bacterias.

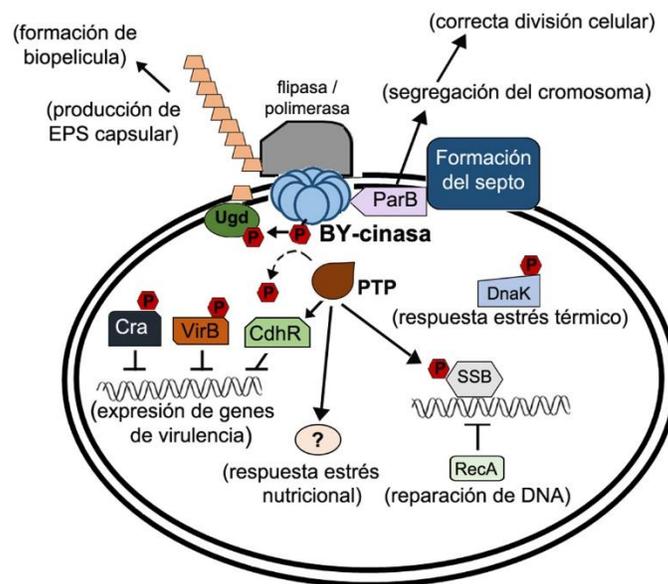


Figura 3. Implicaciones de la fosforilación de tirosinas en la biología celular bacteriana. Octómero de BY-cinasa en azul. Tirosina-fosfatasa (PTP) en café. Tomado de (18).

1.3. Centros hierro-azufre en bacterias

Los centros hierro-azufre (Fe-S) funcionan como cofactores para múltiples enzimas. Estos cofactores son de los más antiguos en la evolución celular y de hecho un estudio filogenético encontró que éstos eran los segundos cofactores más frecuentes en las proteínas del último ancestro común universal (LUCA por sus siglas en inglés) (51). Se encuentran en prácticamente todos los organismos, se componen por sulfuro inorgánico y de ion ferroso (Fe^{+2}) o ion férrico (Fe^{+3}) (52). Son esenciales para el funcionamiento correcto de proteínas involucradas en procesos fundamentales como la respiración celular, fotosíntesis, fijación de nitrógeno, entre otros (53).

Estos centros se ensamblan preferentemente en forma de rombo [$2\text{Fe}-2\text{S}$] o de cubo [$4\text{Fe}-4\text{S}$]. Normalmente, se unen a las proteínas en residuos de cisteína a través de sus átomos de azufre (52). Sin embargo, se han encontrado también unidos a residuos de histidina, arginina, glutamato, aspartato y tirosina (52,54).

El hierro y el azufre libres son altamente tóxicos y reactivos, por lo que las células requieren de sistemas bien controlados que ensamblen estos reactivos en los centros Fe-S (53). En

bacterias se han identificado 3 sistemas de biosíntesis de centros Fe-S: 1) el sistema NIF fue el primero en ser descrito, su función se relaciona principalmente con el ensamblaje de centros Fe-S requeridos para el proceso de fijación de nitrógeno en organismos diazótrofos (52). 2) El sistema ISC, es el más conservado en bacterias y se propone que opera de manera constitutiva (53). Genes homólogos del sistema ISC están conservados en arqueas y en mitocondrias. 3) El sistema SUF fue el último en ser descrito, se encuentra mayormente en cianobacterias, en éstas representa el principal sistema para la síntesis de los centros Fe-S. El sistema SUF también se encuentra conservado en otras bacterias, como *E. coli*, en donde se activa como respuesta a estrés oxidativo (55). Similar al caso de ISC, homólogos a este sistema se encuentran en arqueas y en los cloroplastos de plantas (56).

1.3.1 Sistema ISC

El sistema ISC (del inglés *Iron Sulfur Cluster*) es el más conservado en bacterias, se considera de función “*housekeeping*” (o basal) y, por lo tanto, es esencial en organismos que solo cuentan con este sistema. Está compuesto por 8 genes codificados en un operón, cuyos productos participan en la biosíntesis de los centros Fe-S (53). De manera general, el sistema contiene los siguientes elementos: una fuente de azufre, una fuente de hierro, una fuente de electrones, una proteína andamio y proteínas transportadoras del cofactor (Figura 4).

La fuente de azufre (S) es normalmente una cisteína libre. IscS tiene actividad enzimática de cisteína desulfurasa, cataliza la conversión de cisteína en alanina por un mecanismo dependiente de piridoxal fosfato (PLP). El azufre queda unido a una cisteína de la desulfurasa como persulfuro (57). De acuerdo con la estructura atómica de IscS, la cisteína catalítica se encuentra en un bucle que se extiende hacia afuera del sitio activo, y se cree que esta conformación es importante para la transferencia del azufre a la proteína andamio (52).

Seguido de esto, se transfiere el azufre, el hierro y electrones a la proteína andamio, IscU, en donde se ensambla el centro Fe-S. Se propone que la fuente de electrones es Fdx, mientras que la fuente de hierro se desconoce (52). IscU coordina la unión del azufre a una de sus cisteínas conservadas (Cys37, Cys63 y Cys106 en *E. coli*), se ha propuesto que un residuo de histidina (His105 en IscU de *E. coli*) pudiera operar como el aceptor del hierro, lo anterior no se ha confirmado, sin embargo se sabe que dicho residuo es esencial (52). Un estudio

reciente identificó la tirosina 3 en IscU de *E. coli* como esencial para su interacción con IscS y, por lo tanto, esta contribuye en la transferencia del azufre a IscU (58).

IscU forma un dímero en solución y se propone que en cada subunidad se forma un centro en forma de rombo, [2Fe-2S]. A partir de estos, se forma el centro cúbico [4Fe-4S]. En presencia de oxígeno, éste regresa a los dos centros rombos, por lo que hay un equilibrio dinámico entre ambas formas (53).

Otro dato interesante de IscU es que se ha encontrado en dos conformaciones, una desordenada (D) correspondiente a su estado apo (sin centro Fe-S) y una ordenada (S) (con Fe-S). Esto sugiere que ocurren cambios conformacionales durante el ensamblaje y la transferencia del cofactor (52).

A la fecha se desconoce la fuente del hierro, se propone a la proteína IscA como un candidato, debido a que es capaz de unir centros Fe-S y también hierro mononuclear a través de tres cisteínas conservadas (59). Por esta razón, también se propone como posible proteína transportadora. Adicionalmente, las proteínas IscX y CyaY (que no es codificada por el operón ISC) también se han propuesto como posibles proteínas donadoras del hierro (60,61).

Por otra parte, el principal candidato a ser el donador de electrones es la proteína Fdx, una ferredoxina, debido a que ya se ha reportado dicha función para estas proteínas (62), y a que Fdx es esencial en el sistema, al igual que IscS e IscU (63).

Las cochaperonas HscA y HscB son las principales proteínas transportadoras de los Fe-S ensamblados de IscU a las apo-enzimas. HscA es una proteína con actividad ATPasa, cuya interacción con IscU está regulada por HscB. De manera general, se cree que HscB tiene afinidad por holo-IscU, Se propone que HscA-ATP se une al complejo HscB-IscU-[Fe-S] para formar HscA-ATP-HscB-IscU-[2Fe-2S]. Cuando entra en contacto un aceptor del centro Fe-S, HscA hidroliza el ATP, lo que cataliza la transferencia del cofactor, se libera HscB e IscU pasa a su forma desordenada y se mantiene unida a HscA. Cuando HscA se une a otra molécula de ATP, se libera apo-IscU y ésta puede funcionar nuevamente como andamio (64).

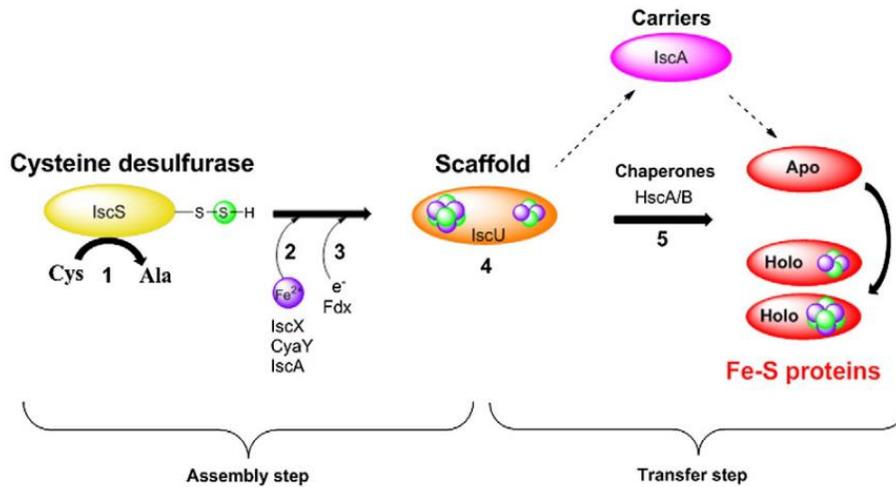


Figura 4. Sistema de ensamblaje y transporte de los centros Fe-S. del sistema ISC. Tomado de (51).

1.4 Complejo *Burkholderia cepacia*

1.4.1 Historia e identificación del complejo *Burkholderia cepacia*

En 1949 Walter H. Burkholder logró aislar una bacteria fitopatógena causante de la podredumbre de la cebolla. A esta bacteria se le llamó *Pseudomonas cepacia*. En la década de 1990, gracias a la secuenciación del gen del ARN ribosomal 16s, homología ADN-ADN y características fenotípicas, esta especie y otras se establecieron dentro de un nuevo género denominado *Burkholderia* (65).

Posteriormente en 1997, se realizó un estudio taxonómico polifásico de distintas cepas de *B. cepacia*, que incluía electroforesis de proteínas totales, análisis de ésteres metílicos de ácido graso e hibridaciones ADN-ADN, entre otras. Los resultados de este estudio, conducido por Vandamme y colaboradores, indicaron que las distintas cepas evaluadas pertenecían al menos a 5 especies genómicas (o genomovares) diferentes que no podían ser diferenciadas por los métodos fenotípicos comunes. Estos 5 genomovares conformaron los primeros miembros del complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc por sus siglas en inglés) y se distinguieron con números romanos (I-V) (66) .

La identificación específica de las especies del complejo Bcc ha sido difícil. Inicialmente se utilizaba el gen del ARN ribosomal 16s, así como análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) de su secuencia (67,68). Luego, en el año 2000 se propuso utilizar el gen *recA* y RFLP de su secuencia, ya que se comprobó que funcionaba mejor para distinguir entre los genomovares del complejo (69). Esta última metodología determinó que el genomovar III se encontraba compuesto por cuatro subgrupos; IIIA, IIIB, IIIC y IIID (70).

Otro método que se ha utilizado para la clasificación específica del Bcc es el análisis multilocus de secuencias (MLSA por sus siglas en inglés) (71). Actualmente, este método es utilizado en conjunto con otros en estudios de identificación y taxonomía del género *Burkholderia* (72–76). Sin embargo, últimamente se han reportado limitantes de este, siendo la más importante el hecho de que muchas secuencias tipo (ST por sus siglas en inglés) no han sido reportadas debido a la gran heterogeneidad genética del Bcc (77).

Más recientemente se han propuesto métodos como la espectrometría de masas y el uso de genomas completos para la identificación y estudios filogenéticos de las especies del complejo Bcc (78–80). No obstante, estas nuevas metodologías no han logrado ser estandarizadas y presentan sus propias limitantes (81).

1.4.2 Microbiología, taxonomía y ecología del Bcc

Como su nombre lo indica, las especies que conforman el complejo *Burkholderia cepacia* pertenecen al género *Burkholderia*. Este género pertenece al orden *Burkholderiales*, el cual está dentro de la clase Betaproteobacteria. Las especies del Bcc son bacterias Gram negativas con forma de bacilo, no fermentadoras, móviles, catalasa positivas y consideradas ubicuas (70,82). En el ambiente, se han encontrado asociadas a plantas, animales, cuerpos de agua y en el suelo (83). Interesantemente se han encontrado en la rizosfera de varias plantas, incluyendo maíz, arroz, chícharo y algodón (84,85). Algunas cepas del complejo presentan actividad como promotoras de crecimiento de plantas ya que producen fitohormonas y/o fijan

el nitrógeno (86), mientras que otras se comportan como biocontrol de plagas ya que producen antimicrobianos (87).

A pesar de esto, algunas cepas son fitopatógenos, como la especie tipo *B. cepacia*, que causa la podredumbre de la cebolla. Otras especies que se han reportado como fitopatógenos son *B. cenocepacia* que puede causar la pudrición suave del dedo del plátano (88) y un genotipo aún no caracterizado que causa la podredumbre suave del durazno (89).

Por otro lado, se han descrito cepas del Bcc con potencial en el área de biorremediación, capaces de degradar compuestos tóxicos variados (90). Esto va ligado a su habilidad de utilizar múltiples fuentes de carbono, como compuestos halogenados, aromáticos y clorados como el tricloroetileno (85). No obstante, debido al peligro que estas cepas representan como patógenos oportunistas de humano, en Estados Unidos se puso un moratorio a los productos que contuvieran a estos microorganismos (91).

En el ambiente urbano, se han encontrado en parques, campos deportivos, jardines, fábricas y hospitales. En estos últimos se han encontrado en soluciones desinfectantes, dispositivos médicos, productos farmacéuticos y superficies contaminadas (83).

La capacidad de estas bacterias de adaptarse a diferentes ambientes y nichos ecológicos y utilizar distintos compuestos como fuentes de carbono se debe a su gran diversidad metabólica, conferida por su genoma tan amplio, de 6 a 9 Mb (92).

Actualmente, el Bcc es un complejo conformado por más de 20 especies (Tabla 1) (93). Las especies de este complejo tienen la característica de poder comportarse como patógenos oportunistas en humanos. Los sujetos principalmente afectados son individuos inmunosuprimidos, como pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (EGC) y de manera importante, pacientes con fibrosis quística (FQ) (83). En estos últimos, las especies con mayor prevalencia son *B. cenocepacia* y *B. multivorans* (94–96).

Tabla 1. Especies pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* descritas hasta el 2024.

Especie	Genomovar	Fuente de aislamiento	Referencia
<i>B. aenigmatica</i>		Humano (FQ y otros), contaminante industrial y de aguas.	(97)
<i>B. alpina</i>		Suelo	(98)
<i>B. ambifaria</i>	VII	Humano (FQ y otros), suelo y rizósfera.	(99)
<i>B. anthina</i>	VIII	Humano (FQ), ambiente hospitalario, suelo, rizósfera, ríos, plantas.	(100)
<i>B. arboris</i>		Humano (FQ y otros), suelo, rizósfera, ríos, contaminante industrial.	(101)
<i>B. catarinensis</i>		Suelo	(73)
<i>B. cenocepacia</i>	III	Humano (FQ y otros), suelo, rizósfera, ríos, plantas y contaminante industrial.	(66,70)
<i>B. cepacia</i>	I	Humano (FQ y otros), suelo, rizósfera, ríos, plantas.	(65,102)
<i>B. contaminans</i>		Humano (FQ y otros), ovejas, plantas.	(79)
<i>B. diffusa</i>		Humano (FQ y otros), suelo.	(101)
<i>B. dolosa</i>	VI	Humano (FQ), plantas, rizósfera.	(103,104)
<i>B. lata</i>		Humano (FQ y otros), suelo, rizósfera, ríos, plantas y contaminante industrial.	(79)
<i>B. latens</i>		Humano (FQ)	(101)
<i>B. metallica</i>		Humano (FQ)	(101)
<i>B. multivorans</i>	II	Humano (FQ y otros), suelo, rizósfera y ríos.	(66)
<i>B. orbicola</i>		Plantas	(105)
<i>B. paludis*</i>		Pantano	(106)
<i>B. pseudomultivorans</i>		Rizósfera	(72)
<i>B. puraquae</i>		Humano (FQ y otros) y suelo	(74)
<i>B. pyrrocinia</i>	IX	Humano (FQ y otros), suelo, rizósfera y ríos.	(100)
<i>B. semiarida*</i>		Plantas	(107)
<i>B. seminalis</i>		Humano (FQ y otros), suelo, rizósfera y plantas.	(101)
<i>B. sola*</i>		Plantas	(107)
<i>B. stabilis</i>	IV	Humano (FQ y otros), ambiente hospitalario y plantas.	(108)
<i>B. stagnalis</i>		Humano (FQ y otros) y suelo	(109)
<i>B. territorii</i>		Agua del subsuelo	(109)
<i>B. ubonensis</i>		Humano (otros) y suelo	(110)
<i>B. vietnamiensis</i>	V	Humano (FQ y otros), suelo, rizósfera, ríos, plantas y contaminante industrial.	(111)

* Estas especies no cuentan con un nombre validado por el Código Internacional de Nomenclatura de Procariontes (ICNP por sus siglas en inglés).

1.5 *Burkholderia cenocepacia*

En el 2003, Vandamme y colaboradores realizaron análisis filogenéticos y ensayos de hibridación ADN-ADN con diferentes cepas de los distintos subgrupos del genomovar III. Estos estudios confirmaron que los cuatro subgrupos de este genomovar pertenecían a una misma especie y a su vez, que esta especie era diferente a *B. cepacia* (genomovar I). A esta nueva especie se le dio el nombre de *B. cenocepacia* (el prefijo “ceno” significa nuevo) (70).

Las células de *Burkholderia cenocepacia* miden de 1.0 a 2.0 μm de largo y de 0.6 a 0.9 μm de ancho. Crece a temperatura ambiente y a 37°C, algunas cepas pueden crecer a 42°C y producir un pigmento amarillo. La mayoría de las cepas crecen en agar MacConkey, no fermentan lactosa ni glucosa y no presentan alfa o beta hemólisis (70).

El genoma de estas bacterias tiene un tamaño de 8 a 9 Mb y está organizado en 3 cromosomas y un plásmido. Todos los cromosomas tienen genes esenciales. El genoma tiene un contenido GC de aproximadamente 67% y cuenta con duplicaciones génicas, secuencias de inserción, elementos móviles e islas genómicas lo que le proporciona plasticidad y una amplia versatilidad metabólica (82,90). Estas características hacen que esta especie sea adaptable a diferentes entornos (83).

La cepa tipo es la cepa J2315 que se aisló en 1989 a partir del esputo de un paciente con fibrosis quística en el Reino Unido (112). La mayoría de los estudios de *B. cenocepacia* utilizan esta cepa o la cepa K56-2, una cepa relacionada clonalmente a la cepa tipo y que también fue aislada de un paciente con fibrosis quística (113). Interesantemente, la cepa K56-2 presenta mayor susceptibilidad a los antibióticos, lo que facilita su manipulación y por lo que es más frecuentemente usada en estudios *in vitro* (82).

1.5.1 Relevancia clínica

Como se mencionó anteriormente, las especies del complejo Bcc tienen la capacidad de comportarse como patógenos oportunistas de humanos. Los individuos más susceptibles a infecciones por estas bacterias son aquellos con fibrosis quística (FQ), enfermedad granulomatosa crónica (EGC) y otros individuos inmunosuprimidos (90).

Los pacientes con EGC tienen una versión defectuosa de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa. Esto afecta en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de los fagocitos del paciente, lo que causa que estos no puedan destruir a los organismos fagocitados (114). El primer reporte de una infección por *Pseudomonas cepacia* en un paciente con esta enfermedad es del año de 1968 (115). A lo largo de las siguientes décadas se publicaron más reportes de infección por este microorganismo en pacientes con EGC. En la mayoría de los casos, el sitio de infección es el tracto respiratorio con una manifestación clínica de neumonía (116–118).

En el 2009, los resultados de un estudio retrospectivo en Estados Unidos de pacientes con EGC infectados con un miembro del Bcc indicaron que la especie más frecuentemente aislada es *B. multivorans*, seguida por *B. cenocepacia*. Además, se observó que las infecciones respiratorias por Bcc en estos pacientes se deben principalmente a reinfecciones que pueden ser por distintas cepas, mientras que en los pacientes con FQ, la infección por Bcc es en la mayoría de los casos, debido a la persistencia de la misma cepa (114). En otro estudio retrospectivo de Estados Unidos que abarcó 4 décadas (1969 – 2012), se reportó a las especies del Bcc como el segundo patógeno con mayor incidencia en pacientes con EGC y el segundo patógeno con mayor mortalidad, en ambos casos precedido sólo por *Aspergillus* spp. (119).

Los pacientes con FQ tienen alguna mutación en el gen *cfr*, lo que hace que el producto de dicho gen no sea funcional. Estos pacientes desarrollan una enfermedad pulmonar crónica, caracterizada por una obstrucción pulmonar progresiva y con infecciones recurrentes que culminan en la muerte temprana del paciente (120).

El primer reporte de una infección por *P. cepacia* en un paciente con FQ es de 1972 (121). En los siguientes años se publicaron más estudios donde se reportaba el aislamiento de esta especie en este tipo de pacientes (122,123). En 1984 Isles y colaboradores del Hospital for Sick Children de Toronto reportaron el primer estudio longitudinal de infecciones por *P. cepacia* en pacientes con FQ. En este estudio observaron que la prevalencia de *P. cepacia* en estos pacientes había aumentado de un 10% en 1971 hasta un 18% en 1981. Un año después, en Estados Unidos, Thomassen y colaboradores de la universidad Case Western en Ohio reportaron un aumento de la prevalencia de *P. cepacia* en pacientes con FQ de un 7% en 1978 a un 15% en 1982. En estos dos estudios se reportó que los pacientes infectados con *P. cepacia* tienen un deterioro más rápido de la función pulmonar que los pacientes infectados con *P. aeruginosa*. También en estos artículos se reporta por primera vez el “síndrome cepacia”, caracterizado por fiebre, deterioro del funcionamiento pulmonar y bacteriemia (124,125).

Las epidemias de las décadas de 1980 y 1990 en Norteamérica y el Reino Unido impulsaron más estudios epidemiológicos, en donde se confirmó una asociación fuerte entre *P. cepacia* y la FQ (126,127). Así como también que los pacientes con FQ colonizados con *P. cepacia* presentaban un peor pronóstico en comparación con los que no lo estaban (120). Un estudio retrospectivo de Estados Unidos, reportó que el 31% de las infecciones causadas por *P. cepacia* de 1980 a 1985 eran del tracto respiratorio inferior y que en el 80% de los casos la infección había causado o contribuido a la muerte del paciente (128).

En la década de 1990 se confirmó que el microorganismo puede ser transmitido de persona a persona o por contacto con superficies o soluciones contaminadas (112). Algunos estudios han indicado que pacientes se han infectado en el ambiente hospitalario debido a soluciones o superficies contaminadas, como desinfectantes, viales de heparina, nebulizadores, ventiladores mecánicos, agua corriente, entre otros (129–133).

En esa misma década se implementaron planes para disminuir la transmisión de *P. cepacia* en los pacientes con FQ. Uno de éstos fue el crear cohortes de pacientes con FQ colonizados con el microorganismo y separarlos de los que no lo estaban. Otra medida fue cancelar los

campamentos de verano que se organizaban para los pacientes con FQ. Estas medidas fueron un golpe para los pacientes colonizados, ya que se sintieron aislados de su comunidad (112,134). Sin embargo, la evidencia indica que estas estrategias lograron disminuir la prevalencia e incidencia de pacientes con esta bacteria (135,136).

En el 2003 se agruparon a las cepas que habían causado las epidemias en Canadá, Estados Unidos y el Reino Unido bajo la especie *B. cenocepacia* (antes conocido como genomovar III) (70). Cabe mencionar que la cepa epidémica de Canadá y el Reino Unido pertenecía al subgrupo IIIA, mientras que las cepas epidémicas de Estados Unidos pertenecían al subgrupo IIIB (69).

En los últimos 20 años los estudios epidemiológicos han indicado un cambio en la frecuencia de las especies del Bcc en pacientes FQ. De manera general, ha habido una disminución en la incidencia y prevalencia de *B. cenocepacia* y un aumento en la incidencia y prevalencia de otras especies del Bcc. Este cambio se debe a las estrategias tomadas en los 1990s para controlar la transmisión de las cepas epidémicas de *B. cenocepacia* (94). A pesar de que las medidas fueron exitosas, la prevalencia de infecciones por el complejo Bcc se ha mantenido debido a cepas únicas, no clonales, adquiridas del ambiente (94,96). En España y Argentina, *B. contaminans* es ahora la principal especie aislada en estos pacientes (137,138). En Portugal se ha reportado a *B. cepacia* como la especie más frecuente (139). Por otro lado, *B. multivorans* es ahora la especie con mayor incidencia y prevalencia en Canadá, Reino Unido y Estados Unidos (96,140,141).

A comparación de las infecciones con *B. multivorans*, las infecciones con *B. cenocepacia* suelen ser crónicas en lugar de transitorias y presentan mayor mortalidad (142). Además, una infección con *B. cenocepacia* se asocia a un mal pronóstico post-trasplante de pulmón por lo que algunos centros utilizan esto como un criterio de exclusión (143,144). Finalmente, un estudio reportó que los pacientes infectados con *B. cenocepacia* tienen una supervivencia más corta que los pacientes infectados con *P. aeruginosa*, pero no hubo una diferencia significativa entre la supervivencia de pacientes infectados con *B. multivorans* y los infectados con *P. aeruginosa* (145).

Cabe mencionar que no todos los pacientes FQ infectados con *B. cenocepacia* desarrollan el síndrome cepacia. El curso de la enfermedad puede ser diferente incluso en pacientes infectados con la misma cepa. Mientras que un paciente pudiera desarrollar el síndrome cepacia, otro pudiera tener una infección asintomática. Esto indica que el resultado clínico depende no solamente de la cepa, sino también del sistema inmune propio del paciente (124,135).

Adicionalmente, las infecciones con *B. cenocepacia* son difíciles de tratar debido a que la bacteria presenta resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos utilizados en la práctica clínica (146). El microorganismo tiene un LPS modificado que dificulta las interacciones con los antibióticos catiónicos. Además, presenta porinas que aumentan la impermeabilidad de la membrana, así como bombas de eflujo que eliminan los antibióticos que hayan entrado. También se ha documentado la modificación de las proteínas blanco y la expresión de enzimas que degradan los antimicrobianos, como β -lactamasas (90,147).

1.5.2 Patogénesis y factores de virulencia

B. cenocepacia no es un comensal humano, por lo que su adquisición en el hospital suele ser por contacto directo con personas infectadas, inhalación de los aerosoles generados por estas personas o contacto con superficies o soluciones contaminadas (112,133). Fuera del hospital, *B. cenocepacia* se ha encontrado en el suelo, animales, plantas y cuerpos de agua por lo que cualquiera de estos puede funcionar como reservorio para adquirir el microorganismo (148).

La bacteria logra colonizar el tracto respiratorio gracias a distintas estructuras en su superficie que le permiten adherirse a este. Principalmente, la presencia de un pili denominado pili tipo cable en conjunto con una adhesina de 22 kDa llamada AdhA. Esta adhesina se encuentra a lo largo del pili, y permite a la bacteria adherirse a las mucinas y a la citoqueratina 13 del epitelio respiratorio (149–152). Cabe mencionar que este complejo no es necesario para establecer una infección, pero las cepas que lo expresan se asocian a infecciones crónicas y mayor transmisibilidad (153,154). Además, la citoqueratina 13 se ve sobreexpresada en FQ,

por lo que esto podría explicar por qué la bacteria tiene facilidad de infectar pacientes FQ a comparación de individuos sanos (150).

Posterior a la adhesión, el microorganismo es capaz de infectar a las células epiteliales y a los macrófagos y sobrevivir dentro de estos (155,156). Se ha reportado que el flagelo, los sistemas de secreción y algunas proteínas son factores de virulencia que juegan un papel importante en la invasión de las células y en atravesar la barrera epitelial (157–159). Un estudio reportó que la interrupción de los genes *fliG* y *fliI* produce una bacteria sin motilidad y con una menor capacidad de invasión de células del epitelio respiratorio (157). En otro estudio se reportó que una cepa mutante para la producción de flagelina es menos letal que la cepa silvestre en un modelo de ratón. Se demostró que esto se debe en parte a que la flagelina interactúa con el receptor tipo Toll 5, lo que culmina en la secreción de citocinas proinflamatorias relacionadas a la severidad de la infección (160).

Una vez dentro del fagosoma, el patógeno utiliza el sistema de secreción tipo VI (SST6) y el efector TecA para desactivar las Rho GTPasas, lo que causa una despolimerización de los filamentos de actina y ocasiona la interrupción del tráfico celular (161,162). Esto retrasa la maduración del fagosoma y resulta en la inhibición del ensamblaje de la NADPH oxidasa (163). El patógeno sobrevive y utiliza el SST6 para romper la membrana del fagosoma y escapar al citosol, donde se replica (164,165). Adicionalmente, el rompimiento del fagosoma libera los efectores del sistema de secreción tipo II (SST2), ZmpA y ZmpB hacia el citoplasma. Estas metaloproteasas en conjunto con la inactivación de RhoA, inducen el ensamblaje del inflammasoma, lo que provoca la secreción de citocinas proinflamatorias (161,164).

Importantemente, *B. cenocepacia* puede atravesar la barrera epitelial y llegar a la circulación. Varios autores han reportado que el patógeno logra esto al modificar la expresión de las proteínas que forman parte de las uniones estrechas (166). Duff y colaboradores reportaron que *B. cenocepacia* redujo la cantidad de ZO-1 en células Calu-3 (167). Por otra parte, Kim y colaboradores indicaron que *B. cenocepacia* causó una reducción en la cantidad de ocludina en las uniones estrechas de una monocapa de células 16HBE, derivado de la desfosforilación de la ocludina lo que promueve el desensamble de las uniones estrechas (168).

Interesantemente, en *B. contaminans* se ha reportado que la ausencia de la fosfatasa BceD y de la BY-cinasa BceF reduce su capacidad de traslocarse en una monocapa de CFBE41o (49). Por otro lado, ZmpA y ZmpB pueden degradar lactoferrina, inmunoglobulinas y péptidos antimicrobianos (169–171). Otros efectores del SST2 de *B. cenocepacia* son la fosfolipasa C, hemolisina y lipasa. De estos, la lipasa se ha asociado a la evasión del sistema inmune y la invasión del epitelio. En este sentido, se reportó que la incubación de macrófagos de rata con lipasa de Bcc reduce su capacidad fagocítica (172). Otro trabajo reportó que el pretratamiento de células epiteliales con lipasa de *B. cepacia* incrementa en 50% la invasión celular de *B. cenocepacia* (173).

B. cenocepacia también posee el sistema de secreción tipo III (SST3). Se ha encontrado que este sistema es importante para la supervivencia en un modelo murino. En este estudio, una cepa de *B. cenocepacia* mutante en el gen *bcsN* (ATPasa del SST3) tuvo una virulencia reducida en comparación con la cepa silvestre, el número promedio de CFU de la mutante en pulmón y bazo fue 2 y 3 unidades logarítmicas menor, respectivamente (174).

Además de los sistemas de secreción, *B. cenocepacia* expresa varias enzimas que ayudan a su supervivencia en el hospedero. Entre estas, están las enzimas que le confieren resistencia contra el daño oxidativo. *B. cenocepacia* expresa las catalasas/peroxidasas KatA y KatB que protegen a la bacteria contra el peróxido de hidrógeno, mientras que la superóxido dismutasa SodC confiere resistencia contra el superóxido extracelular (158,175). KatA y KatB son necesarias para la supervivencia de células persistentes en biopelículas, lo que indica la importancia de la protección contra ROS en el mantenimiento de células persistentes (176).

B. cenocepacia produce ornibactina, pioquelina y otros sideróforos que le permiten obtener hierro en el ambiente del hospedero. Se ha demostrado que la ornibactina es importante para la virulencia en los modelos de rata, *Galleria mellonella* y *Caenorhabditis elegans* (177,178). Además, en el modelo de ratón, la ornibactina es esencial, ya que puede compensar la ausencia de pioquelina, pero esta última no puede compensar la ausencia de ornibactina (179).

El lipopolisacárido (LPS) es una estructura que se compone de tres partes: el lípido A, el núcleo y el antígeno O. Esta estructura se encuentra en la membrana externa de las bacterias Gram negativas y es importante en la supervivencia y patogénesis bacteriana. El LPS de *B. cenocepacia* tiene los grupos 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (Ara4N) unidos al lípido A. Además, tiene un menor número de grupos fosfato a comparación de otras bacterias. Se ha reportado que estas características reducen la carga aniónica del LPS y por lo tanto están implicadas en la resistencia a los péptidos antimicrobianos y polimixinas (180,181). Importantemente, se ha descubierto que el LPS de *B. cenocepacia* es inductor fuerte de la respuesta inmune, lo que aumenta la inmunopatología de la infección. Se ha documentado que el LPS de esta bacteria es hasta 4 y 8 veces más potente en estimular la expresión de TNF- α que el LPS de *P. aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*, respectivamente (182). De manera similar, Reddi y colaboradores describieron que la secreción de IL-8 inducida por el LPS de *B. cenocepacia* es significativamente más potente que la inducida por el LPS de *P. aeruginosa* (183).

Los exopolisacáridos (EPS) son subunidades ramificadas de polisacáridos que los microorganismos sintetizan. Los EPS bacterianos pueden dividirse en dos tipos: polisacáridos capsulares y polisacáridos extracelulares (184). Los primeros se mantienen unidos a la membrana externa de las bacterias Gram negativas, mientras que los segundos son excretados al medio alrededor de la bacteria (185,186). En *B. cenocepacia*, la producción de EPS se ha asociado a la evasión del sistema inmune a través de la reducción del reconocimiento de la bacteria por parte de macrófagos y neutrófilos (187). Aunado a esto, se ha reportado que el EPS de *B. cenocepacia* inhibe la quimiotaxis y la producción de ROS por parte de los neutrófilos (188). Cabe mencionar que la producción de EPS es dependiente de la cepa y que en las cepas que lo producen este aumenta la persistencia y virulencia de la bacteria. Sin embargo, su producción no es necesaria para el establecimiento de una infección (95,189).

B. cenocepacia puede formar biopelícula, la cual está ligada a la producción de los polisacáridos extracelulares (186). Las biopelículas son comunidades de microorganismos que se encuentran embebidos en una matriz extracelular, la cual suele estar fija a una

superficie y brinda protección a las células que la habitan (190). *B. cenocepacia* forma biopelícula en superficies bióticas como células epiteliales, y se considera que habita de esta forma en los pulmones de los pacientes infectados (82,191). Se ha demostrado que las células de *B. cenocepacia* en biopelícula están protegidas del reconocimiento del sistema inmune del hospedero y tienen mayor resistencia a los antibióticos que las células planctónicas (192–194). Por estas razones, la formación de biopelícula se asocia a la cronicidad de las infecciones (195).

Los sistemas *Quorum Sensing* (QS) se encargan de regular la expresión de genes en respuesta a la densidad poblacional (196). Estos sistemas están compuestos de dos partes, una sintasa que sintetiza un autoinductor y un regulador transcripcional, que responde a esta señal (197). Todas las cepas de *B. cenocepacia* tienen un sistema QS denominado CepIR, mientras que algunas cepas tienen un segundo sistema, denominado CciIR (198–200). El sistema de QS de *B. cenocepacia* es importante porque regula muchos de los factores de virulencia mencionados. Entre estos, se encuentran los sistemas de secreción, sideróforos, proteasas, flagelo y motilidad y formación de biopelícula (82,200). Múltiples estudios han indicado que los sistemas de QS son necesarios para la virulencia completa en distintos modelos de infección (199–202). Debido a su impacto sobre otros factores de virulencia, los sistemas de QS pueden ser un buen blanco terapéutico. Varios estudios han evaluado que los inhibidores de QS incrementan la sensibilidad de la bacteria a los antibióticos, por lo que la combinación de inhibidores de QS y antibióticos puede ser un método terapéutico efectivo (200,203,204).

2. ANTECEDENTES

A través de un análisis del genoma de *B. cenocepacia* K56-2 se identificaron genes codificantes para BY-cinasas y LMW-PTP. Y se observó que la LMW-PTP, BPtpA se encuentra codificada río arriba del operón ISC (50). Un escrutinio de los genomas de dos representantes de cada una de las seis familias que componen el orden *Burkholderiales* indica que, en cuatro de estas familias, la región en donde está codificada esta fosfatasa se encuentra conservada (Tabla 2). Este contexto genético es interesante debido a que, en bacterias, los genes que codifican para estas proteínas normalmente se encuentran en operones asociados al metabolismo de EPS.

Las otras fosfatasas identificadas, BCAM0208 y BceD se encuentran codificadas en operones que participan en la síntesis de EPS. Los análisis realizados indicaron que estas fosfatasas contribuyen en la formación de biopelícula y son capaces de desfosforilar la BY-cinasa BceF.

Por otro lado, BPtpA no fue necesaria para la formación de biopelícula y tampoco logró desfosforilar a BceF. Sin embargo, fue la única fosfatasa importante para el crecimiento óptimo en medio mínimo, lo que sugiere una función relacionada a la adaptación en concentraciones limitantes de nutrientes. Estos resultados indican que BPtpA tiene funciones y sustratos específicos diferentes a BCAM0208 y BceD.

Un estudio más reciente se enfocó en entender las diferencias moleculares que dictan la especificidad de sustrato en BPtpA. En este estudio se propone que las LMW-PTP clase II pueden dividirse en dos grupos distintos, denominados clase II.I y clase II.II con base en los residuos presentes en los bucles W y D (30).

En dicho estudio, se reveló que los residuos W47 y H48 del bucle W son necesarios para la actividad fosfatasa *in vivo* y se sugiere que estos residuos juegan un papel importante en regular la entrada de sustratos fosforilados al sitio activo de la enzima.

De manera interesante, varios estudios en diferentes bacterias han reportado que algunas proteínas del sistema ISC se encuentran fosforiladas en residuos de tirosina (42,205,206). Esto, en conjunto con el contexto genético de *bptpA* y su función relacionada a la respuesta a estrés, pueden sugerir que esta fosfatasa interactúa con las proteínas del sistema ISC para regular la biosíntesis de los centros Fe-S.

Tabla 2. Contexto genético del homólogo de *btpA* en especies del orden *Burkholderiales*.

Familia	Representante	Contexto genético del homólogo de <i>btpA</i>
<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Igual que en <i>B. cenocepacia</i>
	<i>Bordetella pertussis</i>	Igual que en <i>B. cenocepacia</i>
<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Igual que en <i>B. cenocepacia</i>
	<i>Pandoreae apista</i>	Igual que en <i>B. cenocepacia</i>
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>	Distinto a <i>B. cenocepacia</i>
	<i>Rhodoferax antarcticus</i>	Distinto a <i>B. cenocepacia</i>
<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Oxalobacter formigenes</i>	Distinto a <i>B. cenocepacia</i>
	<i>Undibacterium pigrum</i>	Distinto a <i>B. cenocepacia</i>
<i>Sphaerotilaceae</i>	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	Igual que en <i>B. cenocepacia</i>
	<i>Sphaerotilus natans</i>	Igual que en <i>B. cenocepacia</i>
<i>Sutterellaceae</i>	<i>Parasutterella excrementihominis</i>	Igual que en <i>B. cenocepacia</i>
	<i>Sutterella wadsworthensis</i>	Igual que en <i>B. cenocepacia</i>

3. JUSTIFICACIÓN

En procariontes, la fosforilación de tirosinas es un mecanismo implicado en múltiples procesos celulares. Las principales enzimas que regulan esta modificación son las TYK cinasas y las LMW-PTP. Sin embargo, se conoce poco de los sustratos de estas enzimas y las implicaciones fisiológicas de esta modificación postraduccional.

Las proteínas IscU y HscA de *B. cenocepacia* son esenciales para el ensamblaje de los centros [Fe-S]. La evaluación de la interacción de estas proteínas con la fosfatasa BPTpA brindará un mejor entendimiento de la biosíntesis de los centros [Fe-S] y su posible regulación mediante fosforilación.

4. HIPÓTESIS

Las proteínas IscU y HscA de *Burkholderia cenocepacia* son fosforiladas en residuos de tirosina y son sustrato de la fosfatasa BPtpA.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la interacción de las proteínas IscU y HscA con la fosfatasa BPtpA de *B. cenocepacia*.

Objetivos Específicos

1. Analizar el estado fosforilado de las proteínas IscU y HscA.
2. Evaluar la interacción de IscU y HscA con BPtpA.
3. Determinar la desfosforilación de IscU y HscA por BPtpA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas bacterianas

Todas las cepas utilizadas en este estudio se describen en la Tabla 3. Las bacterias se cultivaron a 37°C en medio Luria Bertani (LB, 10 g peptona, 5 g extracto de levadura y 10 g NaCl). Cuando se requirió, el medio se suplementó con ampicilina [200 µg mL⁻¹], kanamicina [50 µg mL⁻¹], o tetraciclina [120 µg mL⁻¹]. Todas las cepas se conservaron en medio LB con 15% de glicerol a -70°C.

Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas		
Cepa	Descripción	Fuente/Referencia
<i>Cepas de Escherichia coli</i>		
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (λDE3)	Novagen
DH5α	F ⁻ φ 80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 endA1 recA1 hsdR17</i> (rg- mg ⁺) <i>supE44 thi-1 ΔgyrA96 relA1</i>	Stock de laboratorio
SU202	<i>lexA71:Tn 5(Def)sulA211 Δ</i> (<i>lacIPOZYA</i>) <i>169/F/lacIqlacZΔM15Tn9</i>	(207)
<i>Cepas de Burkholderia cenocepacia</i>		
K56-2	Aislado clínico de linaje IIIA, ET12 relacionado a la cepa epidémica J2315	(113)
Δ3PTP	K56-2 conteniendo eliminación de <i>bceD, bptpA, bcam0208</i>	(50)
Plásmidos		
pET28	Vector de expresión que fusiona una etiqueta de 6 histidinas en la región 3', <i>ori</i> pBBR1 Kan ^R <i>PT7</i>	Novagen

pAT44	Gen <i>bptpA</i> clonado en pET28	(50)
pRS7	pAT44 con la sustitución D127A	(30)
pDA17	Vector de expresión para <i>Burkholderia</i> , <i>ori</i> pBBR1 Tetr <i>mob</i> <i>Pdhfr</i> FLAG epitope	Daniel Aubert <i>et al.</i> , no publicado
pDA17- <i>hscA</i>	Gen <i>hscA</i> clonado en el plásmido pDA17	
pDA17- <i>iscU</i>	Gen <i>iscU</i> clonado en el plásmido pDA17	
pMAL-c2X	Vector de expresión que fusiona la proteína de unión a maltosa (MBP) en la región 5', Amp ^r	New England Biolabs
pMAL-c2X- <i>bptpA</i>	Gen <i>bptpA</i> clonado en el plásmido pMAL-c2x	Este estudio
pSR658	Codifica el dominio de unión a DNA de LexA (WT). Origen de replicación ColE1; Tc ^r	(207)
pSR659	Codifica el dominio de unión a DNA de LexA (Mut). Origen de replicación p15A; Amp ^r	(207)
pSR658- <i>bptpA</i>	Gen <i>bptpA</i> clonado en plásmido pSR658	Cruz-Velázquez, 2023
pSR659- <i>iscU</i>	Gen <i>iscU</i> clonado en el plásmido pSR659	Cruz-Velázquez, 2023
pSR659- <i>iscU</i> _{Y61A}	Gen <i>iscU</i> _{Y61A} clonado en el plásmido pSR659	Cruz-Velázquez, 2023

6.2 Purificación de proteínas IscU, HscA y BPTpA

Las proteínas IscU y HscA se purificaron a partir de la cepa de *B. cenocepacia* Δ 3PTP portadora de los plásmidos pDA17-*iscU* o pDA17-*hscA*. Cultivos de 4 mL de medio LB con tetraciclina [120 μ g mL⁻¹] y ampicilina [200 μ g mL⁻¹], se incubaron a 37°C en agitación a

200 rpm durante 15 h. Posteriormente, los cultivos se transfirieron a 400 mL de medio LB fresco con tetraciclina. Los cultivos se incubaron por 15 horas en agitación a 200 rpm en el equipo Incu-Shaker™ 10L (Benchmark), a 37 °C.

La proteína BtpA se purificó a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3) portadora del plásmido pAT44. Cultivos de 4 mL de medio LB con kanamicina [$50 \mu\text{g mL}^{-1}$] se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm *durante 15 h*. Posteriormente, se transfirieron 1.5 mL del cultivo en 150 mL de LB fresco con kanamicina. El cultivo se incubó a 37°C en agitación a 200 rpm y al alcanzar una $\text{DO}_{595\text{nm}}$ de 0.6 se agregó isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.3 mM. Posteriormente el cultivo se incubó a 30°C en agitación por 4 horas.

Los diferentes cultivos bacterianos se colectaron por centrifugación a $6174 \times g$ durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. Las pastillas resultantes de la cepa *B. cenocepacia* $\Delta 3\text{PTP}$ se solubilizaron con 15 mL de amortiguador de lisis 1 (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 M NaCl, 1mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4). La pastilla resultante de la cepa *E. coli* BL21(DE3) se solubilizó con 15 mL de amortiguador de lisis 2 (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 M NaCl, 1mM PMSF). Las células se lisaron por sonicación (SONIFIER 250, Branson). Los lisados se mantuvieron en frío y se centrifugaron durante 20 minutos a $6174 \times g$ a 4 °C. Posteriormente, los sobrenadantes se centrifugaron durante 50 minutos a $18,549 \times g$ a 4°C. Los sobrenadantes resultantes se mezclaron con 500 μL de resina Ni-NTA pre equilibrada con amortiguador de unión (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 M NaCl) e incubaron durante 40 minutos a 4°C en agitación.

Las mezclas de los sobrenadantes con la resina se transfirieron a columnas cromatográficas y se lavaron con amortiguador de unión (BB) (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 1M) adicionado con diferentes concentraciones de imidazol. Se utilizó la siguiente secuencia de lavado para las muestras de la cepa *B. cenocepacia* $\Delta 3\text{PTP}$: 15 mL BB, 10 mM imidazol, 10 mL de BB, 40 mM imidazol, 10 mL de BB, 60 mM imidazol y 8 mL de BB, 80 mM imidazol. Las proteínas recombinantes (IscU y HscA) se eluyeron con 500 μL de BB, 300 mM imidazol. Para la muestra de la cepa *E. coli* BL21(DE3) se siguió la siguiente secuencia de lavado: 20 mL BB, 20 mM de imidazol, 10 mL BB, 40 mM imidazol, 8 mL BB, 60 mM de imidazol y 8 mL BB, 80 mM de imidazol. La proteína BtpA se eluyó con 600 μL de BB, 400 mM

imidazol. Las eluciones conteniendo las proteínas recombinantes purificadas se dializaron en buffer TNED (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT). Posteriormente, se agregó glicerol 10% volumen final y las muestras se conservaron a -20°C.

6.3 Cuantificación de proteínas recombinantes

Se determinó la concentración [$\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$] de las proteínas recombinantes con el método del ensayo del ácido bicinónico (BCA). Se utilizó el estuche PierceTM Rapid Gold BCA Protein Assay Kit. Para obtener una curva de calibración, se prepararon 7 estándares seriados de albúmina sérica bovina (BSA) a concentraciones conocidas (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). El reactivo de trabajo (WR) se preparó mezclando la solución A con la solución B, en una relación 50:1. En una placa de 96 pocillos se colocaron por triplicado los estándares seriados preparados con BSA y por duplicado 20 μL de las proteínas recombinantes purificadas y luego se añadieron 200 μL del WR a muestra. La microplaca se incubó en agitación por 30 segundos y posteriormente se incubó en estado fijo por 5 minutos en oscuridad. Posteriormente, se leyó la absorbancia a una $\text{DO}_{490\text{nm}}$ en un lector de absorbancias de placas (iMARKTM BIORAD). Se realizó una curva de calibración con los estándares seriados de BSA. La concentración de las proteínas recombinantes purificadas se determinó sustituyendo los valores de absorbancia en dicha curva de calibración.

6.4 Electroforesis de proteínas en gel poliacrilamida

Se mezclaron 50 μL de las proteínas purificadas y se agregaron 12 μL de buffer de carga (SDS 4X, β Mercaptoetanol). Las proteínas purificadas (10 μg) se separaron en geles de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) durante 150 minutos a 120 Volts. Se utilizó 1.5 μL del marcador BlueRay Prestained Protein Marker (Jena Bioscience). Cuando fue necesario, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie (0.025%) durante 25 minutos.

6.5 Inmunodetección por Western Blot anti-fosfotirosina

Para la inmunodetección tipo Western blot, posterior al SDS-PAGE el gel se utilizó para la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Immobilon®-P^{SQ}) durante 180 minutos a 90 volts a 4°C. A continuación, la membrana se bloqueó en 20 mL de buffer de bloqueo 1 (1X PBS, 0.1 % Tween, 4% caseína) por 2 horas. Seguido de esto, se lavó la membrana con 1X PBS, 0.1% Tween, realizando 4 lavados de 10 minutos cada uno y se dejó incubando 16 h con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (α -PY) diluido a 1:5,000 en buffer de bloqueo diluido (caseína 1%) a 4°C en agitación. Posteriormente, se lavó la membrana como antes descrito y se incubó con anticuerpo anti-ratón (GAM) acoplado a la peroxidasa de rábano diluido 1:15,000 durante 3 horas en agitación a temperatura ambiente. Por último, se lavó la membrana nuevamente y se realizó la inmunodetección con el estuche MILIPORE-Immobilon Western ® utilizando 300 μ L de las soluciones 1 y 2 y con tiempos de exposición de 7 y 15 minutos.

6.6 Preparación de IscU y HscA para espectrometría de masas

Se purificaron las proteínas IscU y HscA por cromatografía de afinidad como anteriormente descrito con ligeras modificaciones. Brevemente, el último lavado se realizó con 10 mL de BB con 80 mM imidazol y se eluyó con 1 mL de buffer de elución (10 mM (NH₄)₂CO₃, 50 mM NaCl, 300 mM imidazol). Las eluciones conteniendo las proteínas purificadas se dializaron en buffer de carbonato de amonio (10 mM (NH₄)₂CO₃). Posteriormente, las proteínas purificadas y dializadas se liofilizaron con el equipo FreeZone™ 2.5 1 (Labconco™). Finalmente, las proteínas liofilizadas se enviaron al Instituto de Investigación Clínica de Montreal para su evaluación por espectrometría de masas.

6.7 Extracción de DNA cromosómico de la cepa de *B. cenocepacia* K56-2

La cepa de *B. cenocepacia* K56-2 se sembró en 4 mL de LB con ampicilina [200 μ g mL⁻¹] en agitación a 37°C. Al día siguiente, las células se cosecharon por centrifugación 16,200 x g por 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y a partir de la pastilla se extrajo el DNA utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue, siguiendo el protocolo para bacterias Gram

negativas (QIAGEN). El DNA obtenido se analizó por espectrofotometría en el equipo NANODROP 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) para determinar su concentración y evaluar su pureza con el ratio 260/280. La integridad del material genético se evaluó por electroforesis en gel de agarosa (AMRESCO®, Ohio, USA) al 1.2% teñido con bromuro de etidio [10 mg mL⁻¹]. La electroforesis se corrió a 110 volts durante 25 minutos con la fuente de poder EC 300 XL (Thermo Scientific). El gel se visualizó en el transiluminador TFX-35.MC (Vilber Lourmat).

6.8 Amplificación del gen *btpA* de *B. cenocepacia* K56-2

El DNA extraído de la cepa de *B. cenocepacia* K56-2 se utilizó como templado para amplificar mediante PCR el gen *btpA*. El equipo utilizado fue el termociclador C1000 Touch (BIO-RAD). Se utilizó la polimerasa HotStartTaq Plus (QIAGEN) y los oligonucleótidos 363 (5'-TTATAGGATCCATGACCCGCGTTGCGATC-3') y 364 (5'-AAGGGAAGCTTAATACCGTGCGATCAGC-3') que añaden los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente. Las condiciones de la PCR se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de PCR para amplificar el gen *btpA* de *B. cenocepacia* K56-2.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	1 minuto	30 ciclos
Alineamiento	62°C	1 minuto	
Extensión	72°C	40 segundos	

El producto fue purificado con el estuche comercial E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (omega BIO-TEK) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El producto de la reacción de PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% siguiendo las condiciones antes mencionadas y se visualizó en el transiluminador.

6.9 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α , BL21(DE3) y SU202

La cepa DH5 α se sembró en 4 mL de caldo LB y se incubó a 37 °C en agitación *overnight*. Al día siguiente, se sembraron 1.5 mL del cultivo en 150 mL de caldo LB (relación 1:100). El cultivo se incubó a 37°C en agitación a 200 rpm hasta que alcanzara una DO_{595nm} de 0.6. Posteriormente, el cultivo se transfirió a 3 tubos de centrifuga de 50 mL (CORNING™) y se centrifugó a 6,174 x g durante 15 minutos a 4°C para obtener 3 pastillas. Los sobrenadantes fueron desechados en condiciones de esterilidad. En el primer lavado, 2 de las pastillas se resuspendieron en 15 mL de agua destilada (dH₂O) estéril y la tercera pastilla se resuspendió en 20 mL de dH₂O estéril. Los 3 volúmenes con las pastillas solubilizadas se recolectaron en un solo tubo de centrifuga de 50 mL y se sometió a centrifugación a las mismas condiciones mencionadas. Seguido de esto, la pastilla se sometió a 3 lavados más con dH₂O estéril en condiciones de esterilidad y con las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 1 mL de una solución estéril de 20% glicerol frío, se dividió en alícuotas de 80 μ L y estas se almacenaron a -70°C.

Se siguió la misma metodología para preparar las células electrocompetentes de la cepa BL21(DE3) y SU202.

6.10 Electroporación y extracción del plásmido pMAL-c2X

Se adquirió el plásmido pMAL-c2X de New England Biolabs y se transformó por electroporación en células electrocompetentes de la cepa DH5 α de *E. coli* para su propagación. Brevemente, las células electrocompetentes se descongelaron en hielo y se añadió 1 μ L del plásmido pMAL-c2X. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación fría y estéril. Seguido de esto, se aplicó un pulso eléctrico de 1800 V (Eppendorf® Electroporator 2510). Posteriormente, se añadieron 800 μ L de caldo LB estéril y la suspensión se incubó 1 hora a 37°C a 200 rpm. Finalmente, se sembraron 100 μ L de la suspensión en una placa de agar LB suplementada con ampicilina [200 μ g mL⁻¹] y dicha placa se incubó a 37°C por 24 h.

Al día siguiente, se tomó una colonia de las colonias resultantes y se sembró en 4 mL de caldo LB y se incubó a 37°C en agitación *overnight*. Posteriormente, el cultivo se centrifugó

a 16,200 x g para obtener una pastilla. Se desechó el sobrenadante y se extrajo el plásmido a partir de la pastilla con el kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (omega BIO-TEK) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se analizó el DNA purificado para evaluar su concentración y su pureza por espectrofotometría.

6.11 Clonación del gen *btpA* en el plásmido pMAL-c2X

El gen *btpA* purificado y el plásmido pMAL-c2X fueron digeridos con la enzima *BamHI* (Invitrogen™) durante 3 horas a 37 °C. Posteriormente, ambos fueron limpiados con el estuche E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (omega BIO-TEK). Seguido de esto, ambos fueron digeridos con la enzima *HindIII*-HF™ (New England Biolabs) durante 3 horas a 37°C. Los productos de la digestión fueron limpiados nuevamente y se cuantificaron por espectrofotometría. Finalmente, los productos se ligaron utilizando la enzima T4 Ligasa (Invitrogen) en una relación 1:5 (plásmido: inserto) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las reacciones de ligación se dejaron incubando a 16 °C *overnight*.

Al día siguiente, se descongeló una alícuota de las células electrocompetentes *E. coli* DH5α en hielo y se transformó por electroporación utilizando el volumen total de la ligación. La suspensión de células se incubó 1 hora a 37°C en agitación a 200 rpm. Se sembró el volumen total de la suspensión en una placa de agar LB suplementada con ampicilina [200 µg mL⁻¹] y dicha placa se incubó a 37°C por 24 h.

6.12 Escrutinio de colonias *E. coli* DH5α transformadas con pMAL-c2X-*btpA*

Las colonias obtenidas de la transformación con la reacción de ligación se evaluaron por PCR de colonia con los oligonucleótidos 161 (5'-TCTGATTTAATCTGTATCAGG-3') y 365 (5'-GAAGCCCTGAAAGACGCGCAG-3'). Como control negativo se utilizó el plásmido pMAL-c2X. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de PCR para el escrutinio de la transformación con la construcción en pMAL-c2X.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	1 minuto	30 ciclos
Alineamiento	58°C	1 minuto	
Extensión	72°C	40 segundos	

Los productos de la reacción de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron con el transiluminador.

Se dejó un cultivo en 4 mL de caldo LB de las colonias positivas para el plásmido con el inserto. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a 16,200 x g para obtener una pastilla. La pastilla se resuspendió en medio LB con glicerol al 15% y se conservó a -70°C.

6.13 Evaluación de la construcción generada

A partir de un cultivo de la cepa *E. coli* DH5 α / pMAL-c2x-btpA se siguió el procedimiento para la extracción del DNA plasmídico. Este DNA se dividió en dos alícuotas. Una de ellas fue digerida con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III con las condiciones antes mencionadas, con el objetivo de extraer el inserto del plásmido. La digestión fue separada en un gel de agarosa al 1% y el gel se visualizó en el transiluminador.

La segunda alícuota se envió al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica para evaluación de la integración e integridad del clonado en el plásmido por secuenciación tipo Sanger. La secuencia obtenida se comparó con la secuencia reportada por Holden (208).

6.14 Transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pMAL-c2X-btpA

Dos alícuotas de células electrocompetentes BL21 (DE3) se descongelaron en hielo y se transformaron por electroporación. Para una de ellas se utilizaron 2 μ L del plásmido pMAL-c2X-btpA, siguiendo la metodología antes descrita. Después del pulso eléctrico, las células se incubaron por 1 hora a 200 rpm a 37°C. Finalmente, se sembraron 100 μ L de cada

suspensión en placas de agar LB suplementadas con ampicilina [$200 \mu\text{g mL}^{-1}$] y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Al día siguiente, se realizó un escrutinio de las colonias resultantes de la transformación mediante PCR de colonia, siguiendo las mismas condiciones que para las colonias de la transformación de la cepa DH5 α (DE3) con el plásmido pMAL-c2X-*btpA*.

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron en el transiluminador.

6.15 Purificación de la proteína de fusión MBP-BPtpA y MBP

Las cepas de *E. coli* BL21 portadoras de los plásmidos pMAL-C2X y pMAL-c2X-*btpA* se sembraron en 4 mL de caldo LB con ampicilina [$200 \mu\text{g mL}^{-1}$] y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm 16 h. Posteriormente, se sembraron 1 mL de cada una en 100 mL de caldo LB suplementado con 0.1% glucosa y ampicilina a la concentración anterior. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una $\text{DO}_{595\text{nm}}$ de 0.6 se agregó IPTG (SIGMA) a una concentración final de 0.3 mM y se dejaron incubando a 30°C en las mismas condiciones de agitación por 4 horas más.

Los cultivos se centrifugaron a $6174 \times g$ durante 20 minutos. Las pastillas se solubilizaron en 15 mL de buffer de lisis 3 (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, NaCl 200 mM, EDTA 1mM y PMSF 1mM) y se lisaron por sonicación. Los lisados se mantuvieron en frío, se transfirieron a tubos CORNING™ de 50 mL y se centrifugaron durante 50 minutos a $18,549 \times g$ a 4°C . Los sobrenadantes se transfirieron a tubos de 50 mL y se incubaron con 200 μL de resina de amilosa (New England Biolabs) durante 30 minutos a 4°C en agitación.

Las mezclas se transfirieron a columnas y se lavaron con 5 mL de buffer de lisis 3. Posteriormente, se sometieron a 3 lavados con 5 mL de buffer de lavado (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 500 mM NaCl). Finalmente, las proteínas se eluyeron con 200 μL de buffer de elución 3 (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 500 mM NaCl, 20 mM de maltosa). Las eluciones conteniendo las proteínas purificadas se dializaron en buffer TNED y posteriormente, se agregó glicerol a las proteínas purificadas al 10% del volumen de las eluciones para conservar las proteínas a -20°C .

6.16 Ensayo *pull-down* con MBP y MBP-BPtpA como carnada

Se realizaron cultivos de las cepas BL21 pMAL-C2X, BL21 pMAL-c2X-*bptpA* y Δ 3PTP pDA17-*iscU*-FLAG como anteriormente descrito para cada una, las células se cosecharon por centrifugación. Las pastillas celulares se solubilizaron en 15 mL de buffer de lisis 3 y se lisaron por sonicación. Los lisados se centrifugaron durante 50 minutos a 18,549 x g a 4°C. Los sobrenadantes de BL21 pMAL-C2X (control negativo) y BL21 pMAL-c2X-*bptpA* se incubaron con 250 μ L de resina de amilosa durante 40 minutos a 4°C en agitación y posteriormente se cargaron a columnas cromatográficas de polipropileno. Se realizó 1 lavado con 5 mL de buffer de lisis 3 a las columnas y se procedió a cargar a cada columna el sobrenadante de Δ 3PTP pDA17-*iscU*. Las proteínas no unidas se removieron con 2 lavados de 5 mL cada uno con buffer de lavado. Se eluyó 1 vez con 300 μ L de buffer de elución 3.

Se siguió la misma metodología para el *pull-down* con Δ 3PTP pDA17-*hscA*-FLAG.

6.17 Inmunodetección por Western blot anti-FLAG

Las fracciones de proteínas co-purificadas se sometieron a SDS-PAGE. El gel resultante se utilizó para la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa como anteriormente mencionado. A continuación, la membrana se bloqueó en 20 mL de buffer de bloqueo 2 (1X PBS, 0.1% Tween, 5 % leche semidescremada) a 4°C *overnight*. Posteriormente se lavó la membrana como anteriormente descrito y se incubó con anticuerpo anti-FLAG a una dilución 1:20,000 en 1X PBS, 0.1% Tween durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana se volvió a lavar como ya mencionado y se incubó con anticuerpo anti-ratón (GAM) acoplado a la peroxidasa de rábano diluido 1:15,000 durante 3 horas en agitación a temperatura ambiente. Se realizó la inmunodetección como antes descrito con tiempos de exposición de 30 segundos y 1 minuto.

6.18 Ensayo *pull-down* con BPtpA-His10x como carnada e IscU-FLAG como presa

Se realizaron cultivos de las cepas *E. coli* BL21(DE3)/pAT44 y *B. cenocepacia* Δ 3PTP / pDA17-*iscU* como anteriormente descrito y se obtuvieron sus pastillas. Las pastillas se

solubilizaron en 15 mL de buffer de lisis 2 y se lisaron por sonicación. Los lisados se centrifugaron durante 50 minutos a 18,549 x g a 4°C. El sobrenadante de *E. coli* BL21(DE3)/pAT44 se incubó con 500 µL de resina Ni-NTA durante 40 minutos a 4°C en agitación y posteriormente se cargó a una columna cromatográfica. Como control se utilizó una segunda columna cromatográfica cargada con una mezcla de 15 mL de buffer de lisis 2 con 500 µL de resina Ni-NTA. Se lavaron las columnas con 5 mL de buffer de lisis 2 y se procedió a cargar el sobrenadante de *B. cenocepacia* Δ3PTP / pDA17-*iscU* en cada una. Las proteínas no unidas se removieron con 3 lavados de 5 mL cada uno con buffer de lavado. Se eluyó 2 veces con 300 µL de buffer de elución 1. Las fracciones de proteínas co-purificadas se sometieron a SDS-PAGE y a inmunodetección por Western blot, utilizando un anticuerpo anti-FLAG (1:20,000) como anteriormente descrito.

6.19 Ensayo *pull-down* con HscA-His10x como carnada y BtpA-His10x-FLAG como presa

Se realizaron cultivos de las cepas *B. cenocepacia* Δ3PTP / pDA17-*hscA* y *E. coli* BL21(DE3)/pAT44 como antes descrito y se obtuvieron sus pastillas. Las pastillas se solubilizaron en 15 mL de buffer de lisis 2 y se lisaron por sonicación. Los lisados se centrifugaron durante 50 minutos a 18,549 x g a 4°C. El sobrenadante de *B. cenocepacia* Δ3PTP / pDA17-*hscA* se incubó con 500 µL de resina Ni-NTA durante 40 minutos a 4°C en agitación y posteriormente se cargó a una columna cromatográfica. Como control se utilizó una segunda columna cromatográfica cargada con una mezcla de 15 mL de buffer de lisis 2 con 500 µL de resina Ni-NTA. Se lavaron las columnas con 5 mL de buffer de lisis 2 y se procedió a cargar el sobrenadante de *E. coli* BL21(DE3)/pAT44 en cada una. Las proteínas no unidas se removieron con 3 lavados de 5 mL cada uno con buffer de lavado. Se eluyó 2 veces con 300 µL de buffer de elución 1. Las fracciones de proteínas co-purificadas se sometieron a SDS-PAGE y a inmunodetección por Western blot, utilizando un anticuerpo anti-FLAG (1:20,000) como anteriormente descrito.

6.20 Co-transformación de *E. coli* SU202 con las construcciones pSR658 y pSR659

Los plásmidos pSR658-*bptpA*, pSR659-*iscU* y pSR659-*iscUY61A* se purificaron y cuantificaron siguiendo la metodología descrita anteriormente. Posteriormente, se co-transformaron en células electrocompetentes de la cepa *E. coli* SU202. La co-transformación se llevó en pares: con los plásmidos pSR568-*bptpA* + pSR659-*iscU*, y pSR658-*bptpA* + pSR659-*iscUY61E*. Las cepas co-transformadas se incubaron 1 hora a 37°C en agitación a 200 rpm y posteriormente se sembraron 100 µL de cada suspensión a placas de agar LB suplementadas con tetraciclina [25 µg mL⁻¹] y ampicilina [200 µg mL⁻¹]. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas.

Posteriormente, se realizó un escrutinio de las colonias resultantes mediante PCR de colonia, utilizando los oligonucleótidos 378 (5'- GWTCTGTACGACGATGACG-3') y 379 (5'- TCTCATCCGCCAAAACAGC-3') siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de PCR para el escrutinio de la transformación con las construcciones en pSR658 y pSR659.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	30 segundos	30
Alineamiento	56°C	40 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron en el transiluminador.

6.21 Ensayos de doble híbrido bacteriano

Se prepararon cultivos de 4 mL de *E. coli* SU202 co-transformada con pSR658-*bptpA* + pSR659-*iscU* y pSR658-*bptpA* + pSR659-*iscUY61E* en medio LB suplementado con ampicilina [200 µg mL⁻¹], tetraciclina [25 µg mL⁻¹] e IPTG 0.2 mM. Los cultivos se dejaron incubando a 37°C 16 h. Al día siguiente, se tomaron 200 µL de los cultivos y se inocularon 4 mL de caldo LB suplementado con los mismos antibióticos mencionados. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una DO_{595nm} de entre 0.4 y 0.6.

Posteriormente, se colocaron 50 μL de los cultivos en tubos de 1.5 mL y se añadieron 450 μL de buffer Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 100 mM KCl, 1mM MgSO_4 , 50 mM β -mercaptoetanol) ajustado a pH 7.0. Seguido de esto, se añadió una gota de cloroformo y se mezcló el contenido vigorosamente por 30 segundos. En el siguiente paso se agregaron 100 μL de orto-nitrofenil- β -galactósido (ONPG) [4mg/mL] y se incubó la mezcla de reacción a 30°C por 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo en hielo. La actividad de la β -galactosidasa se midió con espectrofotometría a una $\text{DO}_{420\text{nm}}$ y se expresó en unidades Miller de acuerdo a la fórmula:

$$1 \text{ Unidad Miller} = 1000 \times \frac{(\text{Abs}_{420})}{(t)(v)(\text{Abs}_{600})}$$

Donde:

- Abs_{420} = absorbancia del orto-nitrofenil amarillo
- Abs_{600} = densidad celular
- t= tiempo de la reacción en minutos
- v= volumen del cultivo en mililitros

6.22 Evaluación *in vitro* de actividad fosfatasa

Se prepararon mezclas de reacción con volumen final de 700 μL conteniendo 10 μg de proteína purificada y dializada (BPtpA, BPtpA_{D127A} y MBP-BPtpA), 20 mM Tris pH 7.0, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 4 mM *p*-nitrofenolfosfato (*p*-NPP) siguiendo la metodología descrita por Andrade et al., con algunas modificaciones (50). Las mezclas de reacción se incubaron en oscuridad a 37 °C y se tomaron alícuotas de 100 μL cada 5 minutos. La reacción se detuvo con NaOH a una concentración final de 0.2 N y se midió absorbancia a 405nm. Se estimó la concentración de *p*-NPP obtenida usando un coeficiente de extinción molar de 1.78104 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ y se calculó la actividad fosfatasa para cada sustrato a partir de la pendiente obtenida en los análisis del curso de tiempo.

6.23 Ensayo de desfosforilación de IscU y HscA por BPtpA

Se prepararon mezclas de reacción con volumen final de 700 μ L con 10 μ g de fosfatasa, 10 μ g de sustrato, 20 mM Tris pH 7.0, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT y se incubaron las mezclas a 37°C. Se tomaron alícuotas cada hora y la reacción se detuvo a -20 °C. Las muestras se analizaron por inmunodetección por Western blot, utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina como anteriormente descrito.

7. RESULTADOS

7.1 Producción de las proteínas recombinantes IscU, HscA, BPtpA y BPtpA_{D127A}

Las proteínas recombinantes IscU, HscA, BPtpA y la mutante catalítica BPtpA_{D127A} se purificaron mediante cromatografía de afinidad. Las proteínas purificadas se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie (Figura 5).

Las proteínas se cuantificaron por espectrofotometría obteniendo un rendimiento de 500 µg/mL para IscU, 316 µg/mL para HscA, 370 µg/mL para BPtpA y 272 µg/mL para BPtpA_{D127A}.

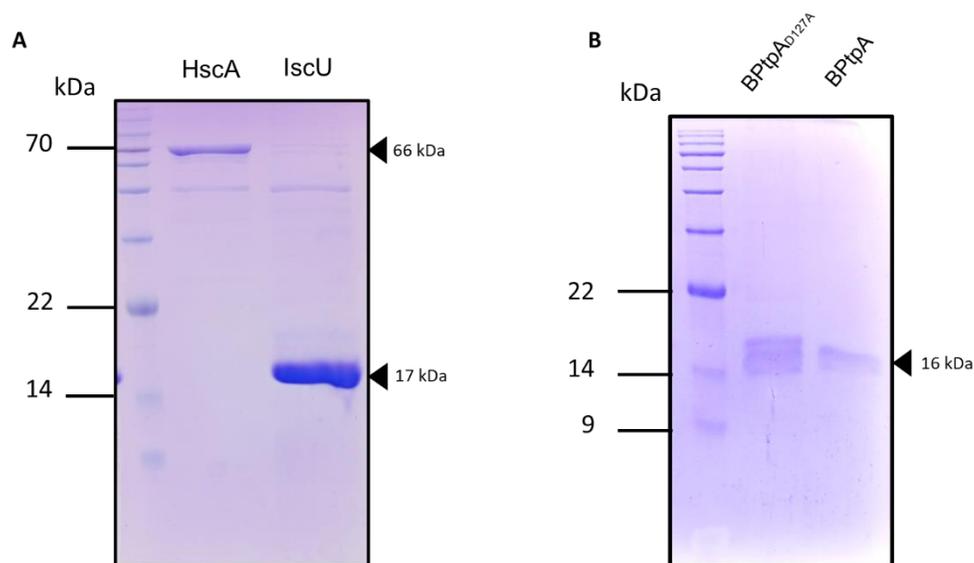


Figura 5. Producción recombinante de IscU, HscA, BPtpA y BPtpA_{D127A}. A) SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie con las proteínas HscA e IscU. B) SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie con las proteínas BPtpA_{D127A} y BPtpA. Se utilizó BlueRay Prestained Protein Marker (Jena Bioscience) como marcador de peso molecular. El tamaño de las bandas se indica en kilodaltones (kDa). La identidad de las proteínas se indica en la parte superior de cada gel. Las puntas de flecha indican la migración de las proteínas.

7.2 Inmunodetección de la fosforilación en tirosina de IscU y HscA

Para evaluar el estado tirosina-fosforilado de las proteínas IscU y HscA se llevó a cabo una inmunodetección tipo Western blot, utilizando un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas, como se describe en Materiales y Métodos. Como control positivo se utilizó la proteína mutante catalítica BPtpA_{D127A}. Las proteínas IscU y HscA fueron reactivas para el anticuerpo anti-fosfotirosina (Figura 6).

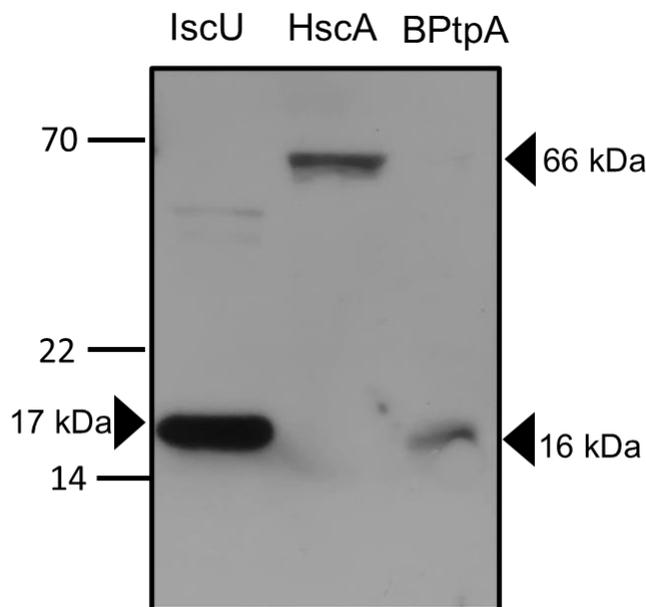


Figura 6. Evaluación del estado tirosina-fosforilado de las proteínas IscU y HscA por Western blot. La identidad de las proteínas se indica en la parte superior. Las masas moleculares usadas como referencia se indican a la izquierda del gel en kilodaltones (kDa). Las flechas indican la migración de las proteínas.

7.3 Detección de la fosforilación en tirosina de IscU y HscA por espectrometría de masas

Las proteínas purificadas, dializadas y liofilizadas se analizaron por espectrometría de masas en búsqueda de un péptido que presentara una tirosina fosforilada. El análisis indicó la fosforilación de la tirosina 61 de la proteína IscU de *B. cenocepacia* (Figura 7). Para el caso de HscA no se detectó fosforilación en tirosina.

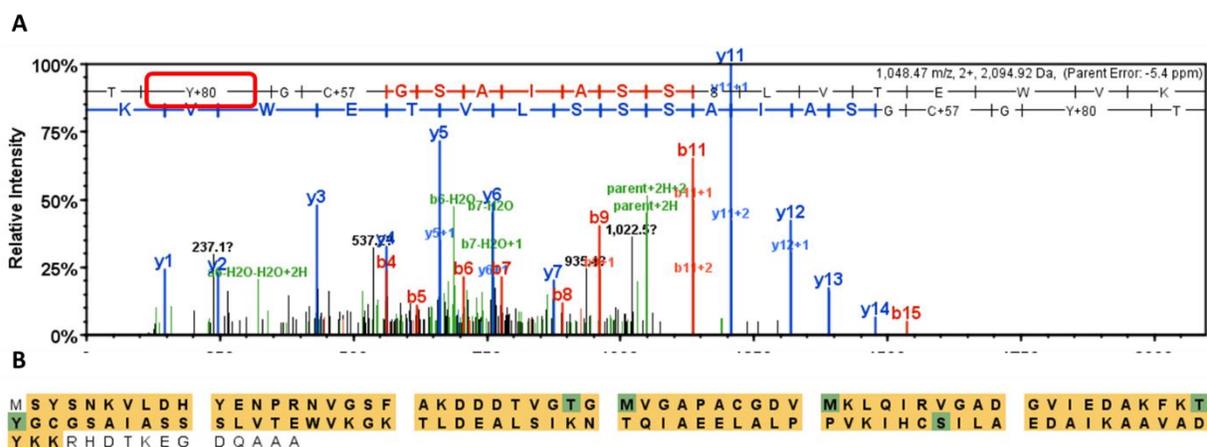


Figura 7. Identificación de fosfopéptidos por espectrometría de masas. A) Espectro de masas del fosfopéptido que contiene la tirosina 61 fosforilada de la proteína IscU de *B. cenocepacia*. B) Cobertura de los péptidos (amarillo) de la proteína IscU. Los residuos en verde indican una MPT.

7.4 Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA cromosómico de *B. cenocepacia* K56-2 así como del plásmido pMAL-c2X a partir de *E. coli* DH5 α . Ambos purificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% para evaluar su integridad de manera cualitativa. Ambos ácidos nucleicos se encontraron íntegros y libres de RNA (Figura 8). Se obtuvo una concentración aproximada de 80 ng μL^{-1} y un radio 260/280 de 1.95 para el DNA cromosómico y una concentración de 78 ng μL^{-1} y un radio 260/280 de 1.92 para el DNA plasmídico.

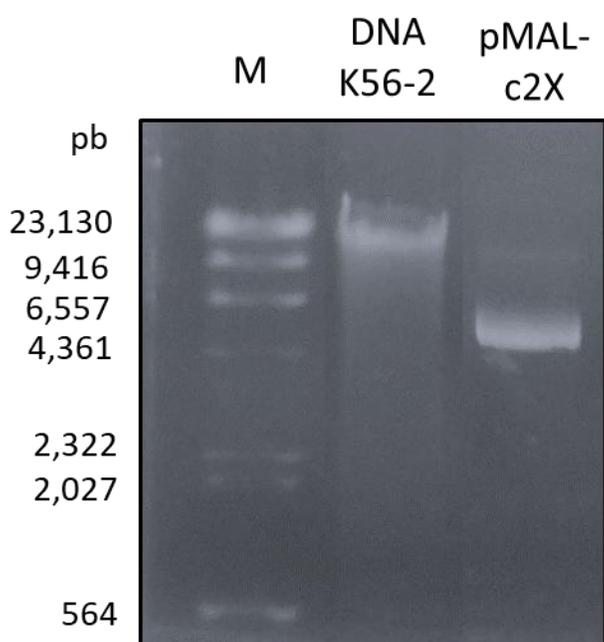
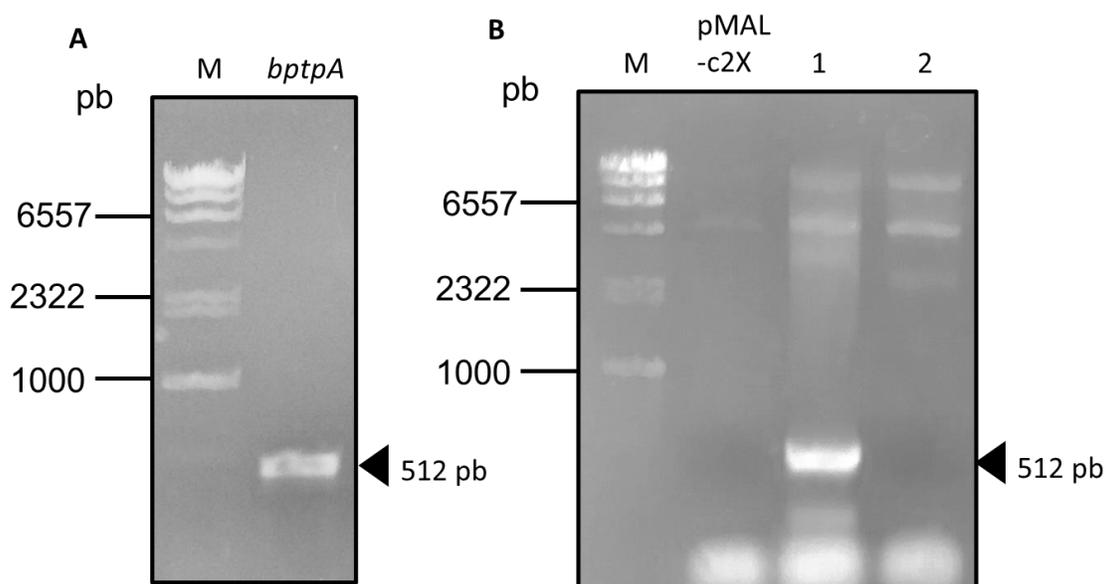


Figura 8. Purificación de DNA cromosómico de *B. cenocepacia* K56-2 y plásmido pMAL-c2X. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Se utilizó λ /HindIII como marcador de peso molecular (M). El tamaño de las bandas se indica en pares de bases (pb).

7.5 Clonación del gen *btpA* de *B. cenocepacia* en el plásmido pMAL-c2X

A partir del DNA cromosómico de *B. cenocepacia* K56-2 se realizó una PCR para amplificar el gen *btpA* e incorporar los sitios de restricción para *Bam*HI y *Hind*III. El producto de la amplificación se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (Figura 9).

El amplicón y el plásmido pMAL-c2X purificados se procesaron como se describe en Materiales y Métodos para llevar a cabo la clonación del gen *btpA* en pMAL-c2X. El producto de la ligación se transformó en células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes. Se realizó un escrutinio por PCR punto final a las colonias que crecieron. De las 2 colonias encontradas, solamente una colonia fue portadora del fragmento clonado. La colonia 1 amplificó un fragmento de tamaño similar al gen *btpA* (Figura 9). La colonia 2 no posee el fragmento clonado y fue descartada.



7.6 Evaluación del producto de clonación

El producto de clonación (pMAL-c2X-*bptpA*) se purificó y se sometió a digestión con *Bam*HI y *Hind*III. El producto de la digestión se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%. Se observó que, al digerir el producto de clonación con dichas enzimas, se libera un fragmento de tamaño similar al gen *bptpA* (Figura 10).

Además, el análisis de secuenciación tipo Sanger corroboró la incorporación del inserto en el plásmido, así como su integridad.

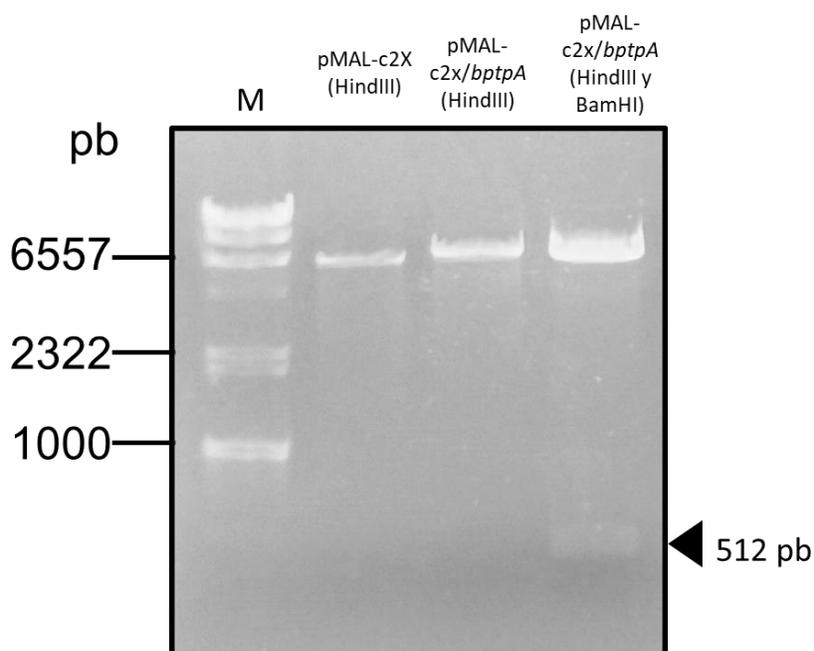


Figura 10. Evaluación del producto de clonación. El plásmido resultante se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III.

7.7 Producción de proteínas MBP y MBP-BPtpA

Las proteínas MBP y MBP-BPtpA se purificaron por cromatografía de afinidad como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas purificadas se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie (Figura 11). Se observó una migración similar a la esperada según su masa reportada.

Las proteínas se cuantificaron por espectrofotometría y el rendimiento promedio fue de 360 $\mu\text{g/mL}$ para MBP y de 800 $\mu\text{g/mL}$ para MBP-BPtpA.

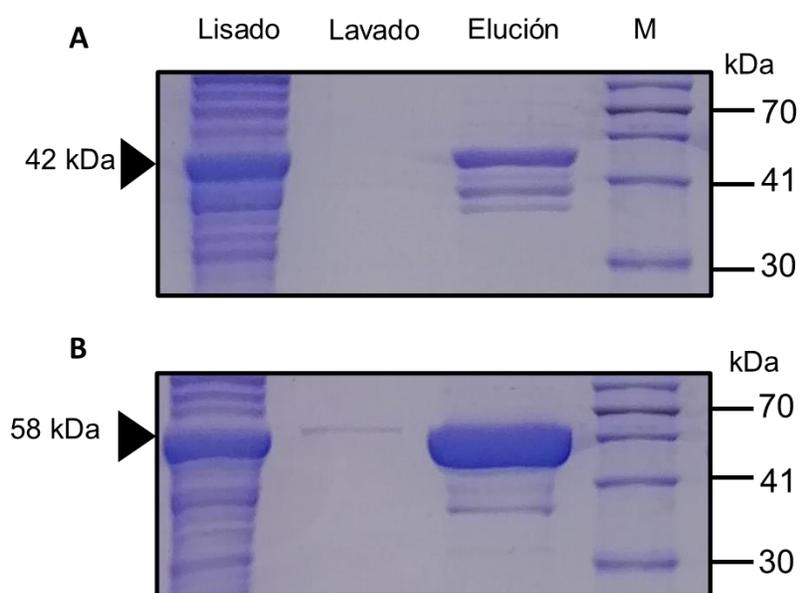


Figura 11. Producción y purificación de MBP y MBP-BPtpA. SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie. Se utilizó BlueRay Prestained Protein Marker (Jena Bioscience) como marcador de peso molecular. El tamaño de las bandas se indica en kilodaltones (kDa). Las flechas indican la migración y la masa esperada de las proteínas. A) MBP. B) MBP-BPtpA.

7.8 Interacción inespecífica de MBP con las proteínas sustrato

Para evaluar la posible interacción entre BPTpA y HscA-FLAG e IscU-FLAG se realizaron ensayos de tipo *pull-down* como se describe en Materiales y Métodos. Se utilizó como carnada a la proteína fusionada MBP-BPTpA y como control negativo a MBP. Los resultados del ensayo se evaluaron por inmunodetección tipo Western blot, utilizando un anticuerpo contra la etiqueta FLAG (Figura 12). La señal detectada en los carriles de elución sugiere interacción entre MBP e IscU, MBP-BPTpA e IscU, MBP y HscA. No se detectó señal en el carril de elución para el *pull-down* entre MBP-BPTpA y HscA.

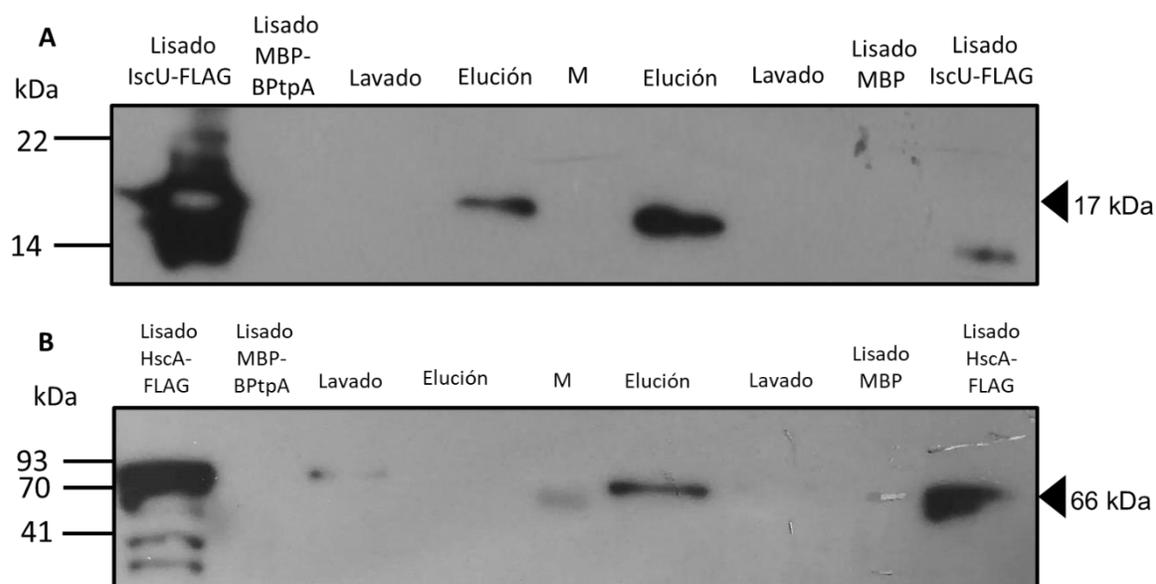


Figura 12. Ensayo *pull-down* con MBP-BPTpA como carnada. A) Ensayo *pull-down* para IscU. B) Ensayo *pull-down* para HscA. En ambos casos se utilizó a MBP como control negativo. Las muestras se evaluaron por inmunorreconocimiento utilizando un anticuerpo anti-FLAG.

7.9 BPTpA interactúa con IscU

Debido a las interacciones inespecíficas obtenidas utilizando MBP como carnada, se procedió a utilizar la proteína BPTpA-His y HscA-His como carnada para la evaluación de su interacción con la proteína IscU-FLAG y BPTpA-FLAG, respectivamente. Como control negativo se utilizó la resina Ni-NTA sin carnada. Los resultados del ensayo se evaluaron por inmunodetección tipo Western blot, utilizando un anticuerpo contra la etiqueta FLAG (Figura 13). La señal detectada en los carriles de elución sugiere interacción entre BPTpA e IscU (Figura 13 A) No se obtuvo señal en los carriles de elución para el *pull-down* entre HscA y BPTpA (Figura 13 B), lo que sugiere que no hay interacción entre estas proteínas.

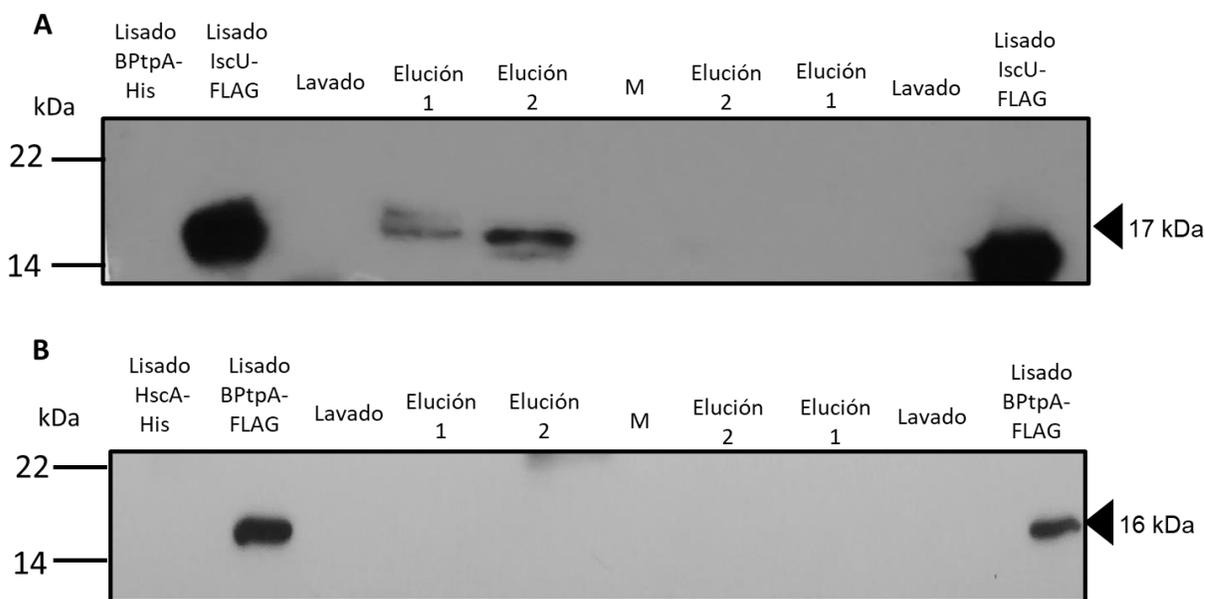


Figura 13. Ensayo *pull-down* con BPTpA-His y HscA-His como carnada. A) Ensayo *pull-down* para evaluar la interacción entre BPTpA-His e IscU-FLAG. B) Ensayo *pull-down* para evaluar la interacción entre HscA-His y BPTpA-FLAG. Las muestras se evaluaron por inmunorreconocimiento utilizando un anticuerpo anti-FLAG.

7.10 Co-transformación de la cepa de *E. coli* SU202

Los plásmidos pSR658-*btpA*, pSR659-*iscU* y pSR659-*iscU_{Y61A}* se co-transformaron en la cepa de *E. coli* SU202 como se describe en Materiales y Métodos. Se realizó un escrutinio por PCR a las colonias resultantes de las transformaciones. En la figura 14 se muestra un gel de agarosa representativo de los resultados para las co-transformaciones. En este caso, se observa que, de las colonias evaluadas, dos colonias amplificaron fragmentos del tamaño esperado (512 pb para *btpA* y 426 pb para *iscU*). Las colonias negativas fueron descartadas.

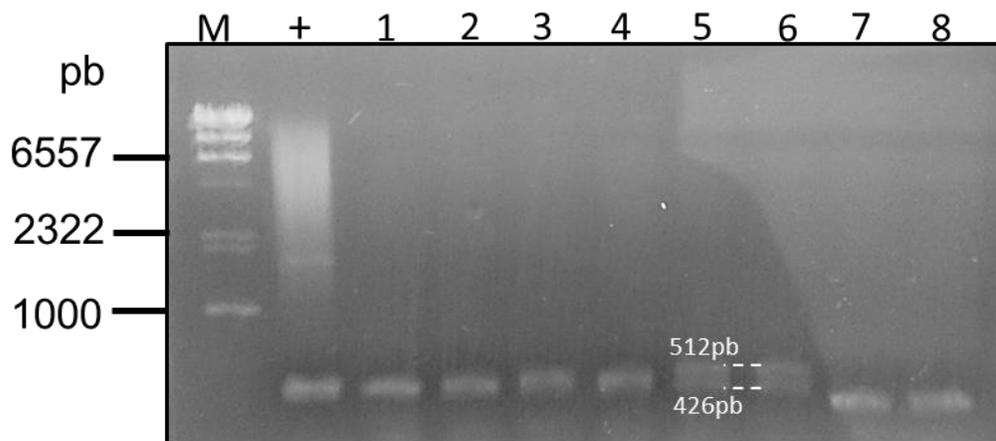


Figura 14. Análisis de las colonias co-transformadas. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0%. El carril M representa el marcador de peso molecular, que en este caso fue el marcador λ /HindIII modificado. El tamaño de las bandas se indica en pares de bases (pb). El carril “+” representa el control positivo para *iscU*.

7.11 Doble híbrido bacteriano

Para confirmar la interacción entre BPtpA e IscU, se realizó el ensayo del doble híbrido bacteriano como se describe en Materiales y Métodos. Además, debido a que el análisis por espectrometría de masas identificó a la tirosina 61 como sustrato a fosforilación, se evaluó la interacción entre BPtpA y una versión mutante de IscU en donde se sustituyó dicho residuo por glutamato. Para realizar este ensayo se utilizó el ONPG como sustrato. La actividad de la enzima β -galactosidasa se midió por espectrofotometría a una DO_{420nm} . Como control negativo se utilizó a la cepa *E. coli* SU202 portadora de los plásmidos pSR658 y pSR659 vacíos. Cabe mencionar que el sistema utilizado en este estudio es el sistema LexA, el cual

es un represor transcripcional. Esto implica que la actividad de la β -galactosidasa es inversamente proporcional a la interacción entre las dos proteínas.

La reducción de la actividad de la β -galactosidasa en la cepa co-transformada con los plásmidos que contienen *bptpA* e *iscU* a comparación del control negativo sugiere que existe una interacción entre BPtpA e IscU.

Por otro lado, la cepa que contiene BPtpA e IscU_{Y61E} presentó una actividad β -galactosidasa mayor a la cepa que contiene la versión silvestre de IscU, similar a la del control negativo (Figura 15). Estos resultados sugieren que la tirosina 61 de IscU podría ser importante para su interacción con BPtpA.

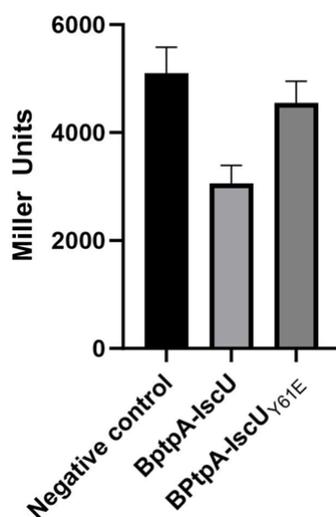


Figura 15. Evaluación de la interacción entre BPtpA e IscU y BPtpA e IscU_{Y61E} por doble híbrido bacteriano. La gráfica representa la actividad de la β -galactosidasa en unidades Miller. Los datos representan la media de al menos 3 experimentos independientes.

7.12 Evaluación de la actividad fosfatasa de BPtpA *in vitro*

Para corroborar que las fosfatasas purificadas tuvieran actividad fosfatasa, se realizó una evaluación de dicha actividad *in vitro*, utilizando *p*-NPP como sustrato. Se utilizó la mutante catalítica BPtpA_{D127A} como control negativo. Se obtuvo una actividad específica de 0.127, 4.365 y 8.739 nmol min⁻¹ μg⁻¹ para BPtpA_{D127A}, BPtpA y MBP-BPtpA, respectivamente (Figura 16).

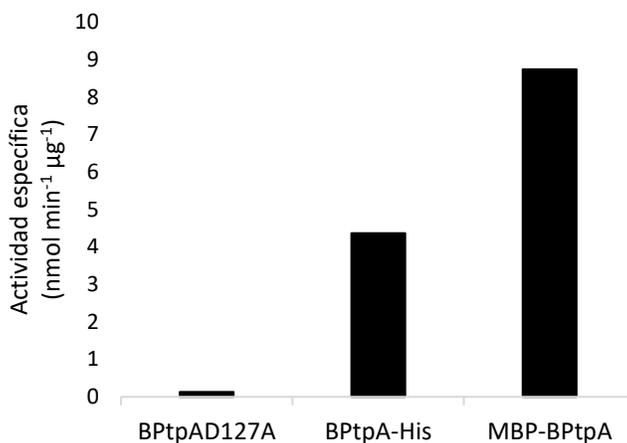


Figura 16. Actividad fosfatasa *in vitro* de las diferentes proteínas versiones de BPtpA purificadas. Los datos representan la media de al menos 3 experimentos independientes.

7.13 BPTpA no desfosforila a las proteínas sustrato

Para evaluar si BPTpA era capaz de desfosforilar a IscU y HscA se llevó a cabo un ensayo de desfosforilación como se describe en Materiales y Métodos. Debido a que los resultados obtenidos de los ensayos de interacción sugieren la interacción entre IscU y BPTpA, se hicieron múltiples ensayos para evaluar la desfosforilación de IscU por la fosfatasa silvestre y por MBP-BPTpA. Como control negativo se utilizó la mutante catalítica BPTpA_{D127A}. Los resultados se evaluaron por inmunodetección tipo Western blot, utilizando un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas. La señal fue detectada a los diferentes tiempos, lo que indica que las proteínas IscU y HscA no son desfosforiladas por BPTpA (Figura 17).

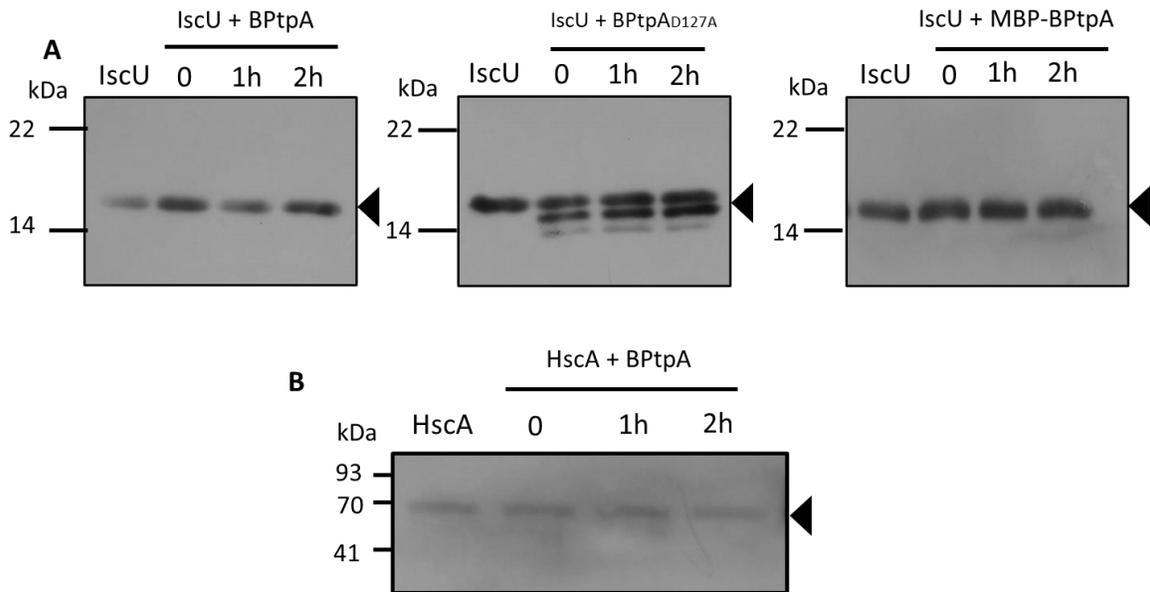


Figura 17. Evaluación de la desfosforilación de IscU y HscA. A) Se incubó la proteína purificada IscU con BPTpA, BPTpA_{D127A} y MBP-BPTpA a 37°C. Se tomaron muestras a los tiempos indicados. Las flechas representan la posición de IscU. B) Se incubó la proteína purificada HscA con BPTpA a 37°C. Se tomaron muestras a los tiempos indicados. La flecha representa la posición de HscA. Las reacciones se evaluaron por inmunorreconocimiento utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina.

8. DISCUSIÓN

La fosforilación de tirosinas en bacterias ha sido un área de investigación difícil de estudiar, principalmente debido a que los métodos de identificación de esta MPT no han sido desarrollados para muestras de origen bacteriano, así como el hecho de que las bacterias realizan esta modificación a niveles sub estequiométricos (4). No obstante, recientemente diversos estudios han reportado la abundancia de genes codificantes de BY-cinasas y tirosina fosfatasa en genomas bacterianos y cada vez más se describen nuevas implicaciones de esta modificación en la fisiología procarionte (7).

De manera general, las bacterias utilizan la fosforilación de tirosinas para responder a estímulos, lo que les permite adaptarse al ambiente. Nuestro equipo de trabajo ha reportado que la fosfatasa BPtpA del patógeno oportunista *B. cenocepacia* es necesaria para su adaptación a condiciones de estrés nutricional. Además, se encuentra codificada río arriba del operón ISC, encargado de la síntesis de los centros Fe-S. Esta localización no es común para una LMW-PTP, ya que normalmente se encuentran codificadas en operones asociados al metabolismo de EPS (50). Los sustratos de esta fosfatasa no han sido elucidados, por lo que este trabajo evaluó la interacción entre la fosfatasa BPtpA y las proteínas IscU y HscA del sistema ISC de *B. cenocepacia*.

La determinación de la fosforilación de tirosinas en las proteínas IscU y HscA se realizó mediante inmunodetección tipo Western blot, utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina. Se utilizó una versión mutante catalítica de BPtpA como control positivo debido a que anteriormente se había reportado su estado tirosina-fosforilado (50). El resultado de dicho experimento indica que tanto IscU como HscA fueron reactivas para el anticuerpo (Figura 12). A la fecha no hay estudios del fosfoproteoma de *B. cenocepacia*, sin embargo, se ha reportado que las proteínas homólogas en *E. coli* y *S. flexneri* se encuentran fosforiladas en tirosina (42,205).

Para confirmar este resultado, las proteínas fueron analizadas por espectrometría de masas. El análisis indicó que en IscU, la tirosina en la posición 61 se encuentra fosforilada (Figura 13). Este residuo se encuentra conservado en IscU de *S. flexneri* (Figura 18), en donde también se ha reportado como fosforilado (42).

<i>B. cenocepacia</i> _IscU	1 MSYSNKVL DH ENPRNVGSFAKDDDAVGTGMVGAPACGDVMKLQIRVGAD	50
<i>E. coli</i> _IscU	1 MA Y SEKVIDH Y ENPRNVGSFDNNDENVGSGMVGAPACGDVMKLQIKVNDE	50
<i>S. flexneri</i> _IscU	1 MA Y SEKVIDH Y ENPRNVGSFDNNDENVGSGMVGAPACGDVMKLQIKVNDE	50
<i>B. cenocepacia</i> _IscU	51 GVI E DAKFKT Y GCGSAIASSSLVTEWVKGKTLDEALSIKNTQIAEELALP	100
<i>E. coli</i> _IscU	51 GI I EDARFKT Y GCGSAIASSSLVTEWVKGKSLDEAQAIAKNTDIAEELALP	100
<i>S. flexneri</i> _IscU	51 GI I EDARFKT Y GCGSAIASSSLVTEWVKGKSLVEAQAIAKNTDIAEELALP	100
<i>B. cenocepacia</i> _IscU	101 PVKIHCSILAEDAIAKAAVAD Y KKRHDTKEGDQAAA	135
<i>E. coli</i> _IscU	101 PVKIHCSILAEDAIAKAAIAD Y KSKREAK-----	128
<i>S. flexneri</i> _IscU	101 PVKIHCSILAEDAIAKAAIAD Y KSKREAK-----	128

Figura 18. Alineamiento de secuencias de las proteínas IscU de *B. cenocepacia*, *E. coli* y *S. flexneri*. Las tirosinas conservadas se muestran en rojo.

No existen reportes del impacto de la fosforilación de residuos en la proteína IscU procarionte. La y colaboradores describen que la proteína homóloga en mamíferos debe ser fosforilada en un residuo de serina para lograr el ensamblaje de los centros Fe-S (209); sin embargo, dicha serina no está conservada en la proteína IscU bacteriana.

Por otro lado, el análisis por espectrometría de masas no detectó ningún péptido con esta modificación en la proteína HscA. Esto contrasta con lo reportado para *S. flexneri*, en donde se encontró que la proteína homóloga es sustrato a fosforilación en el residuo de tirosina 502, el cual está conservado en HscA de *B. cenocepacia* (42). Cabe mencionar que la naturaleza dinámica de la fosforilación hace difícil su detección, además de que se estima que la fosforilación de tirosinas representa el 0.01% de todos los residuos fosforilados en proteínas (210).

Se ha reportado que en *E. coli*, la proteína SufC del sistema SUF es sustrato a fosforilación de tirosina. A pesar de que no es un homólogo directo de HscA, lleva a cabo una función similar, ya que tiene actividad ATPasa necesaria para la síntesis de los Fe-S (52). Thomas indica que la sustitución de la tirosina 241 por el residuo fosfomimético aspartato interrumpe la formación de los centros Fe-S *in vivo*, mientras que la sustitución por fenilalanina permite el ensamblaje de los cofactores, lo que sugiere una regulación por fosforilación en tirosina (211). Interesantemente, la tirosina 241 de SufC es un residuo expuesto que se encuentra en el extremo C terminal de la proteína, de manera similar a la tirosina 502 en HscA.

Para evaluar si BPtpA interactúa con HscA e IscU, se realizaron ensayos tipo *pull-down*. En estos ensayos se inmoviliza una proteína carnada en una columna y posteriormente se pasa a

través de la columna una mezcla que contiene a la proteína presa. En el primer ensayo se utilizó una versión de BPtpA fusionada con la proteína de unión a maltosa (MBP) en su extremo amino terminal (MBP-BPtpA) como carnada y a la proteína MBP sola como control negativo. Los resultados evidenciaron una interacción inespecífica entre MBP y HscA e IscU (Figura 12). Si bien la etiqueta MBP es utilizada ampliamente para ensayos de interacciones entre proteínas, se ha reportado que su uso no siempre produce resultados de pureza confiable y que puede alterar las funciones de las proteínas (212,213). Además, Nguyen y Goodrich mencionan que la contaminación de las muestras con ácidos nucleicos puede generar falsos positivos o negativos en los ensayos de interacciones de proteínas, reduciendo su especificidad (214).

Debido a los resultados inconclusos obtenidos, decidimos realizar otros ensayos *pull-down* con modificaciones. Con el fin de observar la interacción entre BPtpA e IscU, se utilizó la proteína BPtpA-His como carnada, mientras que para la interacción entre BPtpA y HscA la carnada fue la proteína HscA-His. En ambos casos se utilizó la resina Ni-NTA vacía como control. Los resultados sugieren una interacción entre BPtpA-His e IscU-FLAG, pero no entre BPtpA-FLAG y HscA-His (Figura 13).

Para confirmar la interacción entre BPtpA e IscU se realizó el ensayo del doble híbrido bacteriano. Además, con el objetivo de valorar la importancia de la tirosina 61 de IscU en su interacción con BPtpA, se generó una versión mutante puntual de IscU, en donde se sustituyó dicha tirosina por el residuo fosfomimético glutamato (IscU_{Y61E}). Los resultados de este ensayo confirmaron la interacción entre BPtpA e IscU, y adicionalmente sugieren que la interacción entre estas proteínas se reduce al sustituir la Y61 de IscU por glutamato (Figura 15).

A pesar de que estudios del fosfoproteoma de diversas bacterias indican que algunas proteínas de los sistemas que ensamblan los centros Fe-S son fosforiladas en distintos residuos (42,205,206,211), no se conocen las cinasas y fosfatasa que regulan dichas modificaciones. Sin embargo, existe evidencia de que el ensamblaje de los centros Fe-S por el sistema SUF en *E. coli* puede ser regulado por fosforilación de tirosina (211).

En contraparte, algunas interacciones de IscU con proteínas del sistema ISC y los residuos implicados en estas interacciones están mejor caracterizados. Se ha identificado que la

tirosina 3 de la IscU bacteriana está conservada de manera universal (tirosina 35 en humanos). Se ha reportado que dicha tirosina es esencial para el ensamblaje de los centros Fe-S en bacterias, levaduras y humanos (215). Por ejemplo, en humanos, esta tirosina es esencial para la dimerización de IscU (215). Tanaka y colaboradores han indicado que la tirosina 3 de IscU en *E. coli* forma un puente de hidrógeno con el glutamato 311 de IscS, un enlace esencial para la interacción entre estas proteínas (58). Además, describieron que, al sustituir esta tirosina con otros residuos aromáticos, la proteína se mantiene funcional, pero es interesante que en la naturaleza esta tirosina está estrictamente conservada, lo que puede apuntar a un rol regulatorio, como la fosforilación. Cabe mencionar que en *E. coli* y *S. flexneri* dicha tirosina es sustrato a fosforilación por lo que la carga negativa del grupo fosfato podría afectar su interacción con el glutamato de IscS (216). Es importante mencionar que a pesar de que el análisis de espectrometría de masas no identificó la tirosina 3 de IscU de *B. cenocepacia* como fosforilada, esta posibilidad no se puede descartar.

La estructura tridimensional del complejo IscS-IscU de *E. coli* (Figura 19) (217) indica que en la interfaz de la interacción se encuentra también la tirosina 61, la cual hemos identificado como fosforilada en *B. cenocepacia* y se ha reportado fosforilada en *S. flexneri* (42). Aunque el estudio de Tanaka y colaboradores no identificó a este residuo como esencial para la interacción con IscS (58), la fosforilación de este residuo se podría agregar al conjunto de mecanismos que regulan la interacción entre IscS e IscU y así impactar en la síntesis de los centros Fe-S en estas bacterias.

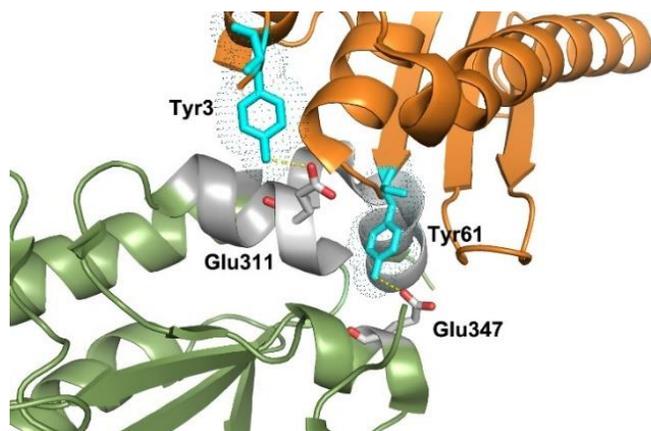


Figura 19. Interfaz de la interacción entre IscS (verde) e IscU (naranja) (PDB: 3LVL). Las tirosinas 3 y 61 de IscU se muestran en azul.

Nuestros resultados de doble híbrido bacteriano sugieren que la tirosina 61 de IscU es importante para su interacción con BPtpA y que sustituirla por un glutamato interrumpe la interacción (Figura 15). Es interesante que la interacción con la fosfatasa disminuya cuando la tirosina 61 es reemplazada por un residuo que asemeja una tirosina fosforilada. Tradicionalmente, los residuos como glutamato y aspartato se han utilizado para identificar y estabilizar las interacciones entre fosfatasas y sus sustratos (218). No obstante, los residuos fosfomiméticos no representan de manera exacta las características iónicas y espaciales de la fosfotirosina (7). Además, se ha documentado que la fosfatasa homóloga en *M. tuberculosis*, PtpA, reconoce y desfosforila tirosinas específicas en sus sustratos, a pesar de que otras tirosinas estén fosforiladas (219). Esto podría explicar el funcionamiento de BPtpA, indicando que esta tirosina no es sustrato de esta fosfatasa. Aunado a esto, la disminución de la interacción podría deberse a que la carga negativa en esta posición afecta la interacción entre las proteínas o a que el glutamato genera cambios conformacionales en IscU que no permiten la interacción (216).

Con el objetivo de evaluar si BPtpA podía desfosforilar a IscU, primero se realizó un ensayo de actividad fosfatasa *in vitro* con BPtpA, BPtpA_{D127A} y MBP-BPtpA utilizando *p*-NPP como sustrato. Los resultados confirmaron la actividad fosfatasa de BPtpA y MBP-BPtpA, así como la falta de actividad de la mutante catalítica (Figura 16). Se observó que la actividad fosfatasa de MBP-BPtpA fue el doble que la de BPtpA-His. Este incremento de la actividad enzimática ya se ha documentado para otras enzimas etiquetadas con MBP (220) y puede atribuirse a un incremento en la solubilidad de la proteína, proporcionado por esta etiqueta (221).

Los ensayos de desfosforilación con BPtpA-His indicaron que esta enzima no pudo desfosforilar a IscU ni HscA (Figura 17). Este resultado confirma que HscA no es sustrato de BPtpA de acuerdo con el resultado del *pull-down*, que sugirió que estas proteínas no interactúan.

Con el objetivo de confirmar que IscU no es sustrato de BPtpA, se realizó el ensayo de desfosforilación con MBP-BPtpA, que presentó mayor actividad fosfatasa que BPtpA-His. Sin embargo, el resultado fue el mismo. Esto es interesante debido a que los ensayos de interacción sugieren que estas proteínas interactúan. Una explicación puede ser que la

interacción entre esta fosfatasa e IscU es una interacción de tipo no catalítica. Este tipo de interacciones no catalíticas están bien documentadas para diferentes tipos de enzimas, incluyendo cinasas y fosfatasas (222–224). De manera relevante, Wong y colaboradores han reportado que la fosfatasa PtpA de *M. tuberculosis* presenta interacciones no catalíticas con proteínas fosforiladas del fagosoma de macrófagos (225). Este tipo de interacciones se asocian a un control alostérico de las enzimas, a reclutar enzimas a un sitio en la célula o a formar parte de un complejo multiproteico (222). Este último podría explicar la interacción entre IscU y BPtpA, ya que la primera es la proteína andamio encargada de formar los centros Fe-S en *B. cenocepacia* y, por lo tanto, se asocia con múltiples proteínas. Es posible que BPtpA forme parte de este sistema, incluso de una forma no catalítica y que la tirosina 61 de IscU sea importante para su interacción.

9. CONCLUSIONES

- Las proteínas HscA e IscU de *B. cenocepacia* fueron reactivas para el anticuerpo anti-fosfotirosina.
- El análisis de espectrometría de masas identificó a la tirosina 61 de IscU de *B. cenocepacia* como fosforilada.
- El ensayo tipo pull-down y el doble híbrido bacteriano sugieren que existe una interacción entre la proteína IscU y la fosfatasa BPtpA de *B. cenocepacia*.
- La sustitución de la tirosina 61 de IscU por glutamato impacta en su interacción con BPtpA.
- El ensayo tipo *pull-down* sugiere que BPtpA no interactúa con HscA.
- Los ensayos de desfosforilación sugieren que BPtpA no desfosforila a HscA ni IscU.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la desfosforilación de IscU por las fosfatasas BceD y BCAM0208.
- Generar la versión mutante IscU_{Y61F} y IscU_{Y61A} evaluar su interacción con BPtpA e IscS.
- Evaluar el estado fosforilado de las otras proteínas del sistema ISC de *B. cenocepacia*.
- Evaluar la interacción de las otras proteínas del sistema ISC con BPtpA.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Raff H, Levitzky M. Fisiología Médica: Un enfoque por aparatos y sistemas. 1era ed. 2013.
2. Ramazi S, Zahiri J. Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. Database J Biol Databases Curation. 7 de abril de 2021;2021:baab012.
3. Carabetta VJ, Hardouin J. Editorial: Bacterial Post-translational Modifications. Front Microbiol. 22 de marzo de 2022;13:874602.
4. Macek B, Forchhammer K, Hardouin J, Weber-Ban E, Grangeasse C, Mijakovic I. Protein post-translational modifications in bacteria. Nat Rev Microbiol. noviembre de 2019;17(11):651-64.
5. Veillard F, Sztukowska M, Nowakowska Z, Mizgalska D, Thøgersen IB, Enghild JJ, et al. Proteolytic processing and activation of gingipain zymogens secreted by T9SS of Porphyromonas gingivalis. Biochimie. 1 de noviembre de 2019;166:161-72.
6. Striebel F, Imkamp F, Özcelik D, Weber-Ban E. Pupylation as a signal for proteasomal degradation in bacteria. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res. enero de 2014;1843(1):103-13.
7. Getz LJ, Runte CS, Rainey JK, Thomas NA. Tyrosine Phosphorylation as a Widespread Regulatory Mechanism in Prokaryotes. J Bacteriol. 6 de septiembre de 2019;201(19):e00205-19.
8. Krebs EG, Fischer EH. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. Biochim Biophys Acta. abril de 1956;20(1):150-7.
9. Pawson T, Scott JD. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. Trends Biochem Sci. junio de 2005;30(6):286-90.
10. Garnak M, Reeves HC. Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of Escherichia coli. Science. 16 de marzo de 1979;203(4385):1111-2.
11. Cortay JC, Duclos B, Cozzzone AJ. Phosphorylation of an Escherichia coli protein at tyrosine. J Mol Biol. 20 de enero de 1986;187(2):305-8.
12. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. Annu Rev Biochem. 2000;69:183-215.
13. Muñoz-Dorado J, Inouye S, Inouye M. A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of M. xanthus, a gram-negative bacterium. Cell. 29 de noviembre de 1991;67(5):995-1006.
14. Galyov EE, Håkansson S, Forsberg A, Wolf-Watz H. A secreted protein kinase of Yersinia pseudotuberculosis is an indispensable virulence determinant. Nature. 25 de febrero de 1993;361(6414):730-2.
15. Grangeasse C, Doublet P, Vaganay E, Vincent C, Deléage G, Duclos B, et al. Characterization of a bacterial gene encoding an autophosphorylating protein tyrosine kinase. Gene. 19 de diciembre de 1997;204(1):259-65.

16. Jadeau F, Bechet E, Cozzone AJ, Deléage G, Grangeasse C, Combet C. Identification of the idiosyncratic bacterial protein tyrosine kinase (BY-kinase) family signature. *Bioinforma Oxf Engl*. 1 de noviembre de 2008;24(21):2427-30.
17. Pan Z, Wang B, Zhang Y, Wang Y, Ullah S, Jian R, et al. dbPSP: a curated database for protein phosphorylation sites in prokaryotes. *Database J Biol Databases Curation*. 3 de abril de 2015;2015:bav031.
18. Andrade Á, Alonso ÓM, Tavares-Carreón F. El AB“Y” de la fosforilación de tirosinas en bacterias: descripción de las enzimas implicadas y su impacto en la fisiología procarionte. *TIP Rev Espec En Cienc Quím-Biológicas* [Internet]. 9 de diciembre de 2023 [citado 3 de enero de 2024];26(0). Disponible en: <http://tip.zaragoza.unam.mx/index.php/tip/article/view/617>
19. Hajredini F, Alphonse S, Ghose R. BY-kinases: Protein tyrosine kinases like no other. *J Biol Chem* [Internet]. 1 de enero de 2023 [citado 27 de enero de 2024];299(1). Disponible en: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(22\)01180-2/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(22)01180-2/abstract)
20. Grangeasse C, Nessler S, Mijakovic I. Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 19 de septiembre de 2012;367(1602):2640-55.
21. Grangeasse C, Cozzone AJ, Deutscher J, Mijakovic I. Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci*. febrero de 2007;32(2):86-94.
22. Grangeasse C, Terreux R, Nessler S. Bacterial tyrosine-kinases: structure-function analysis and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*. marzo de 2010;1804(3):628-34.
23. Bechet E, Gruszczuk J, Terreux R, Gueguen-Chaignon V, Vigouroux A, Obadia B, et al. Identification of structural and molecular determinants of the tyrosine-kinase Wzc and implications in capsular polysaccharide export. *Mol Microbiol*. septiembre de 2010;77(5):1315-25.
24. Hajredini F, Ghose R. An ATPase with a twist: A unique mechanism underlies the activity of the bacterial tyrosine kinase, Wzc. *Sci Adv*. 24 de septiembre de 2021;7(39):eabj5836.
25. Yang Y, Liu J, Clarke BR, Seidel L, Bolla JR, Ward PN, et al. The molecular basis of regulation of bacterial capsule assembly by Wzc. *Nat Commun*. 16 de julio de 2021;12(1):4349.
26. Paiment A, Hocking J, Whitfield C. Impact of Phosphorylation of Specific Residues in the Tyrosine Autokinase, Wzc, on Its Activity in Assembly of Group 1 Capsules in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. diciembre de 2002;184(23):6437-47.
27. Nakamoto R, Kwan JMC, Chin JFL, Ong HT, Flores-Kim J, Midonet C, et al. The bacterial tyrosine kinase system CpsBCD governs the length of capsule polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 de noviembre de 2021;118(45):e2103377118.
28. Alphonse S, Djemil I, Piserchio A, Ghose R. Structural basis for the recognition of the bacterial tyrosine kinase Wzc by its cognate tyrosine phosphatase Wzb. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 de junio de 2022;119(26):e2201800119.
29. Böhmer F, Szedlacsek S, Tabernero L, Östman A, den Hertog J. Protein tyrosine phosphatase structure–function relationships in regulation and pathogenesis. *FEBS J*. 2013;280(2):413-31.

30. Sánchez-Rodríguez R, González GM, Becerril-García MA, Treviño-Rangel R de J, Marcos-Vilchis A, González-Pedrajo B, et al. The BPTpA protein from *Burkholderia cenocepacia* belongs to a new subclass of low molecular weight protein tyrosine phosphatases. *Arch Biochem Biophys*. 15 de marzo de 2020;681:108277.
31. Caselli A, Paoli P, Santi A, Mugnaioni C, Toti A, Camici G, et al. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase: Multifaceted functions of an evolutionarily conserved enzyme. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics*. 1 de octubre de 2016;1864(10):1339-55.
32. Messens J, Silver S. Arsenate Reduction: Thiol Cascade Chemistry with Convergent Evolution. *J Mol Biol*. septiembre de 2006;362(1):1-17.
33. Taddei N, Chiarugi P, Cirri P, Fiaschi T, Stefani M, Camici G, et al. Aspartic-129 is an essential residue in the catalytic mechanism of the low Mr phosphotyrosine protein phosphatase. *FEBS Lett*. 22 de agosto de 1994;350(2):328-32.
34. Lescop E, Hu Y, Xu H, Hu W, Chen J, Xia B, et al. The Solution Structure of *Escherichia coli* Wzb Reveals a Novel Substrate Recognition Mechanism of Prokaryotic Low Molecular Weight Protein-tyrosine Phosphatases*. *J Biol Chem*. 14 de julio de 2006;281(28):19570-7.
35. Whitmore SE, Lamont RJ. Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence. *Int J Oral Sci*. abril de 2012;4(1):1-6.
36. Mijakovic I, Poncet S, Boël G, Mazé A, Gillet S, Jamet E, et al. Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *EMBO J*. 15 de septiembre de 2003;22(18):4709-18.
37. Cuthbertson L, Mainprize IL, Naismith JH, Whitfield C. Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. marzo de 2009;73(1):155-77.
38. Kalynych S, Valvano MA, Cygler M. Polysaccharide co-polymerases: the enigmatic conductors of the O-antigen assembly orchestra. *Protein Eng Des Sel*. 1 de noviembre de 2012;25(11):797-802.
39. Lacour S, Bechet E, Cozzone AJ, Mijakovic I, Grangeasse C. Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PloS One*. 25 de agosto de 2008;3(8):e3053.
40. Henriques MX, Rodrigues T, Carido M, Ferreira L, Filipe SR. Synthesis of capsular polysaccharide at the division septum of *Streptococcus pneumoniae* is dependent on a bacterial tyrosine kinase. *Mol Microbiol*. 2011;82(2):515-34.
41. Nourikyan J, Kjos M, Mercy C, Cluzel C, Morlot C, Noirot-Gros MF, et al. Autophosphorylation of the Bacterial Tyrosine-Kinase CpsD Connects Capsule Synthesis with the Cell Cycle in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Genet*. septiembre de 2015;11(9):e1005518.
42. Standish AJ, Teh MY, Tran ENH, Doyle MT, Baker PJ, Morona R. Unprecedented Abundance of Protein Tyrosine Phosphorylation Modulates *Shigella flexneri* Virulence. *J Mol Biol*. 9 de octubre de 2016;428(20):4197-208.

43. Derouiche A, Shi L, Bidnenko V, Ventroux M, Pignonneau N, Franz-Wachtel M, et al. *Bacillus subtilis* SalA is a phosphorylation-dependent transcription regulator that represses *scoC* and activates the production of the exoprotease AprE. *Mol Microbiol.* septiembre de 2015;97(6):1195-208.
44. Robertson CD, Hazen TH, Kaper JB, Rasko DA, Hansen AM. Phosphotyrosine-Mediated Regulation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence. *mBio.* 27 de febrero de 2018;9(1):e00097-18.
45. Liu C, Miller D p., Wang Y, Merchant M, Lamont R j. Structure–function aspects of the *Porphyromonas gingivalis* tyrosine kinase Ptk1. *Mol Oral Microbiol.* 2017;32(4):314-23.
46. Shi L, Ravikumar V, Derouiche A, Macek B, Mijakovic I. Tyrosine 601 of *Bacillus subtilis* DnaK Undergoes Phosphorylation and Is Crucial for Chaperone Activity and Heat Shock Survival. *Front Microbiol.* 19 de abril de 2016;7:533.
47. Mijakovic I, Petranovic D, Macek B, Cepo T, Mann M, Davies J, et al. Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(5):1588-96.
48. Rajpurohit YS, Bihani SC, Waldor MK, Misra HS. Phosphorylation of *Deinococcus radiodurans* RecA Regulates Its Activity and May Contribute to Radioresistance. *J Biol Chem.* agosto de 2016;291(32):16672-85.
49. Ferreira AS, Silva IN, Fernandes F, Pilkington R, Callaghan M, McClean S, et al. The Tyrosine Kinase BceF and the Phosphotyrosine Phosphatase BceD of *Burkholderia contaminans* Are Required for Efficient Invasion and Epithelial Disruption of a Cystic Fibrosis Lung Epithelial Cell Line. McCormick BA, editor. *Infect Immun.* febrero de 2015;83(2):812-21.
50. Andrade A, Tavares-Carreón F, Khodai-Kalaki M, Valvano MA. Tyrosine Phosphorylation and Dephosphorylation in *Burkholderia cenocepacia* Affect Biofilm Formation, Growth under Nutritional Deprivation, and Pathogenicity. *Appl Environ Microbiol.* 22 de enero de 2016;82(3):843-56.
51. Weiss MC, Sousa FL, Mrnjavac N, Neukirchen S, Roettger M, Nelson-Sathi S, et al. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat Microbiol.* 25 de julio de 2016;1(9):16116.
52. Blanc B, Gerez C, Ollagnier De Choudens S. Assembly of Fe/S proteins in bacterial systems. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* junio de 2015;1853(6):1436-47.
53. Ayala-Castro C, Saini A, Outten FW. Fe-S Cluster Assembly Pathways in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* marzo de 2008;72(1):110-25.
54. Gao F. Iron–Sulfur Cluster Biogenesis and Iron Homeostasis in Cyanobacteria. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 [citado 10 de noviembre de 2023];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00165>
55. Outten FW, Djaman O, Storz G. A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* mayo de 2004;52(3):861-72.

56. Takahashi Y, Tokumoto U. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem.* 9 de agosto de 2002;277(32):28380-3.
57. Schwartz CJ, Djaman O, Imlay JA, Kiley PJ. The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 de agosto de 2000;97(16):9009-14.
58. Tanaka N, Yuda E, Fujishiro T, Hirabayashi K, Wada K, Takahashi Y. Identification of IscU residues critical for de novo iron-sulfur cluster assembly. *Mol Microbiol.* 2019;112(6):1769-83.
59. Qian L, Zheng C, Liu J. Characterization of iron-sulfur cluster assembly protein IscA from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochem Biokhimia.* marzo de 2013;78(3):244-51.
60. Yoon T, Cowan JA. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc.* 21 de mayo de 2003;125(20):6078-84.
61. Kim JH, Bothe JR, Frederick RO, Holder JC, Markley JL. Role of IscX in iron-sulfur cluster biogenesis in *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc.* 4 de junio de 2014;136(22):7933-42.
62. Mulo P. Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP(+) oxidoreductase (FNR): structure, function and location. *Biochim Biophys Acta.* agosto de 2011;1807(8):927-34.
63. Tokumoto U, Takahashi Y. Genetic analysis of the isc operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J Biochem (Tokyo).* julio de 2001;130(1):63-71.
64. Kim JH, Tonelli M, Frederick RO, Chow DCF, Markley JL. Specialized Hsp70 Chaperone (HscA) Binds Preferentially to the Disordered Form, whereas J-protein (HscB) Binds Preferentially to the Structured Form of the Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein (IscU)*. *J Biol Chem.* 7 de septiembre de 2012;287(37):31406-13.
65. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, 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. *Microbiol Immunol.* 1992;36(12):1251-75.
66. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* octubre de 1997;47(4):1188-200.
67. LiPuma JJ, Dulaney BJ, McMenamin JD, Whitby PW, Stull TL, Coenye T, et al. Development of rRNA-based PCR assays for identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* octubre de 1999;37(10):3167-70.
68. Segonds C, Heulin T, Marty N, Chabanon G. Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol.* julio de 1999;37(7):2201-8.
69. Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, et al. DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex, *Burkholderia*

- vietnamiensis, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* Genomovars I and III. *J Clin Microbiol.* septiembre de 2000;38(9):3165-73.
70. Vandamme P, Holmes B, Coenye T, Goris J, Mahenthiralingam E, LiPuma JJ, et al. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.—a new twist to an old story. *Res Microbiol.* 1 de marzo de 2003;154(2):91-6.
 71. Baldwin A, Mahenthiralingam E, Thickett KM, Honeybourne D, Maiden MCJ, Govan JR, et al. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* septiembre de 2005;43(9):4665-73.
 72. Peeters C, Zlosnik JEA, Spilker T, Hird TJ, LiPuma JJ, Vandamme P. *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. *Syst Appl Microbiol.* 1 de octubre de 2013;36(7):483-9.
 73. Bach E, Sant'Anna FH, Magrich dos Passos JF, Balsanelli E, de Baura VA, Pedrosa F de O, et al. Detection of misidentifications of species from the *Burkholderia cepacia* complex and description of a new member, the soil bacterium *Burkholderia catarinensis* sp. nov. *Pathog Dis.* 31 de agosto de 2017;75(6):ftx076.
 74. Martina P, Leguizamon M, Prieto CI, Sousa SA, Montanaro P, Draghi WO, 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):14-20.
 75. Tsuji M, Kadota I. Identification and phylogenetic analysis of *Burkholderia cepacia* complex bacteria isolated from rot of onion bulbs in Tohoku region of Japan. *J Gen Plant Pathol.* 1 de septiembre de 2020;86(5):376-86.
 76. Meza-Radilla G, Larios-Serrato V, Hernández-Castro R, Ibarra JA, Santos PE de los. *Burkholderia* species in human infections in Mexico: Identification of *B. cepacia*, *B. contaminans*, *B. multivorans*, *B. vietnamiensis*, *B. pseudomallei* and a new *Burkholderia* species. *PLoS Negl Trop Dis.* 29 de junio de 2021;15(6):e0009541.
 77. Jin Y, Zhou J, Zhou J, Hu M, Zhang Q, Kong N, et al. Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status. *Biol Direct.* 4 de marzo de 2020;15(1):6.
 78. Miñán A, Bosch A, Lasch P, Stämmeler M, Serra DO, Degrossi J, et al. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species including strains of the novel Taxon K, recovered from cystic fibrosis patients by intact cell MALDI-ToF mass spectrometry. *Analyst.* 1 de junio de 2009;134(6):1138-48.
 79. Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, et al. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* enero de 2009;59(Pt 1):102-11.
 80. Vandamme P, Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol.* 1 de abril de 2011;34(2):87-95.
 81. Wong KSK, Dhaliwal S, Bilawka J, Srigley JA, Champagne S, Romney MG, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS for the accurate identification of

- Burkholderia cepacia complex and Burkholderia gladioli in the clinical microbiology laboratory. J Med Microbiol. 2020;69(8):1105-13.
82. Loutet SA, Valvano MA. A Decade of Burkholderia cenocepacia Virulence Determinant Research. Infect Immun. octubre de 2010;78(10):4088-100.
 83. Tavares M, Kozak M, Balola A, Sá-Correia I. Burkholderia cepacia Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. Clin Microbiol Rev. 15 de abril de 2020;33(3):10.1128/cmr.00139-19.
 84. Hallmann J, Rodríguez-Kábana R, Kloepper JW. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. Soil Biol Biochem. 1 de abril de 1999;31(4):551-60.
 85. Parke JL, Gurian-Sherman D. Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains. Annu Rev Phytopathol. 2001;39:225-58.
 86. Bevivino A, Tabacchioni S, Chiarini L, Carusi MV, Del Gallo M, Visca P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of Burkholderia cepacia. Microbiol Read Engl. mayo de 1994;140 (Pt 5):1069-77.
 87. Vial L, Groleau MC, Dekimpe V, Déziel E. Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. J Microbiol Biotechnol. septiembre de 2007;17(9):1407-29.
 88. Lee YA, Chan CW. Molecular Typing and Presence of Genetic Markers Among Strains of Banana Finger-Tip Rot Pathogen, Burkholderia cenocepacia, in Taiwan. Phytopathology. febrero de 2007;97(2):195-201.
 89. Fang Y, Li B, Wang F, Liu B, Wu Z, Su T, et al. Bacterial Fruit Rot of Apricot Caused by Burkholderia cepacia in China. Plant Pathol J. 1 de diciembre de 2009;25.
 90. Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon Burkholderia cepacia complex. Nat Rev Microbiol. febrero de 2005;3(2):144-56.
 91. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Dowson CG. Burkholderia cepacia complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. J Appl Microbiol. junio de 2008;104(6):1539-51.
 92. Lessie TG, Hendrickson W, Manning BD, Devereux R. Genomic complexity and plasticity of Burkholderia cepacia. FEMS Microbiol Lett. 1 de noviembre de 1996;144(2-3):117-28.
 93. Rojas-Rojas FU, López-Sánchez D, Meza-Radilla G, Méndez-Canarios A, Ibarra JA, Estrada-de los Santos P. El controvertido complejo Burkholderia cepacia, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. Rev Argent Microbiol. 1 de enero de 2019;51(1):84-92.
 94. France MW, Dodd ME, Govan JR, Doherty CJ, Webb AK, Jones AM. The changing epidemiology of Burkholderia species infection at an adult cystic fibrosis centre. J Cyst Fibros. 1 de septiembre de 2008;7(5):368-72.

95. Drevinek P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect.* 1 de julio de 2010;16(7):821-30.
96. Zlosnik JEA, Henry DA, Hird TJ, Hickman R, Campbell M, Cabrera A, et al. Epidemiology of Burkholderia Infections in People with Cystic Fibrosis in Canada between 2000 and 2017. *Ann Am Thorac Soc.* diciembre de 2020;17(12):1549-57.
97. Depoorter E, De Canck E, Peeters C, Wieme AD, Cnockaert M, Zlosnik JEA, et al. Burkholderia cepacia Complex Taxon K: Where to Split? *Front Microbiol* [Internet]. 14 de julio de 2020 [citado 1 de julio de 2024];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.01594/full>
98. Weber CF, King GM. 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* [Internet]. 21 de febrero de 2017 [citado 1 de julio de 2024];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.00207/full>
99. Coenye T, Mahenthiralingam E, Henry D, LiPuma JJ, Laevens S, Gillis M, et al. Burkholderia ambifaria sp. nov., a novel member of the Burkholderia cepacia complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* julio de 2001;51(Pt 4):1481-90.
100. Vandamme P, Henry D, Coenye T, Nzula S, Vancanneyt M, LiPuma JJ, et al. Burkholderia anthina sp. nov. and Burkholderia pyrrocinia, two additional Burkholderia cepacia complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1 de junio de 2002;33(2):143-9.
101. Vanlaere E, Lipuma JJ, Baldwin A, Henry D, De Brandt E, Mahenthiralingam 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.* julio de 2008;58(Pt 7):1580-90.
102. Palleroni NJ, Holmes B. Pseudomonas cepacia sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1981;31(4):479-81.
103. Coenye T, LiPuma JJ, Henry D, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Gillis M, et al. Burkholderia cepacia genomovar VI, a new member of the Burkholderia cepacia complex isolated from cystic fibrosis patients. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(2):271-9.
104. Vermis K, Coenye T, Lipuma J, Mahenthiralingam E, Nelis H, Vandamme P. Proposal to accommodate Burkholderia cepacia genomovar VI as Burkholderia dolosa sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1 de junio de 2004;54:689-91.
105. Morales-Ruiz LM, Rodríguez-Cisneros M, Kerber-Díaz JC, Rojas-Rojas FU, Ibarra JA, Estrada-de Los Santos P. Burkholderia orbicola sp. nov., a novel species within the Burkholderia cepacia complex. *Arch Microbiol.* 17 de febrero de 2022;204(3):178.
106. Ong KS, Aw YK, Lee LH, Yule CM, Cheow YL, Lee SM. Burkholderia paludis sp. nov., an Antibiotic-Siderophore Producing Novel Burkholderia cepacia Complex Species, Isolated from Malaysian Tropical Peat Swamp Soil. *Front Microbiol.* 21 de diciembre de 2016;7:2046.

107. Velez LS, Aburjaile FF, Farias ARG, Baia ADB, Oliveira WJ, Silva AMF, et al. *Burkholderia semiarida* sp. nov. and *Burkholderia sola* sp. nov., two novel *B. cepacia* complex species causing onion sour skin. *Syst Appl Microbiol.* mayo de 2023;46(3):126415.
108. Vandamme P, Mahenthiralingam E, Holmes B, Coenye T, Hoste B, De Vos P, et al. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol.* marzo de 2000;38(3):1042-7.
109. De Smet B, Mayo M, Peeters C, Zlosnik JEA, Spilker T, Hird TJ, 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.* julio de 2015;65(7):2265-71.
110. Yabuuchi E, Kawamura Y, Ezaki T, Ikedo M, Dejsirilert S, Fujiwara N, et al. *Burkholderia uboniae* sp. nov., L-arabinose-assimilating but different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamiensis*. *Microbiol Immunol.* 2000;44(4):307-17.
111. GILLIS M, VAN VAN T, BARDIN R, GOOR M, HEBBAR P, WILLEMS A, et al. Polyphasic Taxonomy in the Genus *Burkholderia* Leading to an Emended Description of the Genus and Proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-Fixing Isolates from Rice in Vietnam. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1995;45(2):274-89.
112. Govan JR, Brown PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M, et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet Lond Engl.* 3 de julio de 1993;342(8862):15-9.
113. Mahenthiralingam E, Coenye T, Chung JW, Speert DP, Govan JRW, Taylor P, et al. Diagnostically and Experimentally Useful Panel of Strains from the *Burkholderia cepacia* Complex. *J Clin Microbiol.* febrero de 2000;38(2):910-3.
114. Greenberg DE, Goldberg JB, Stock F, Murray PR, Holland SM, LiPuma JJ. Recurrent *Burkholderia* Infection in Patients with Chronic Granulomatous Disease: 11-Year Experience at a Large Referral Center. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 de junio de 2009;48(11):1577-9.
115. Dailey Robert H., Benner E. Jack. Necrotizing Pneumonitis Due to the *Pseudomonad* Eugonic Oxidizer — Group I. *N Engl J Med.* 15 de agosto de 1968;279(7):361-2.
116. Association of *Pseudomonas cepacia* with chronic granulomatous disease [Internet]. [citado 23 de julio de 2024]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/jcm.1.5.425-428.1975>
117. O'Neil KM, Herman JH, Modlin JF, Moxon ER, Winkelstein JA. *Pseudomonas cepacia*: An emerging pathogen in chronic granulomatous disease. *J Pediatr.* 1 de junio de 1986;108(6):940-2.
118. Speert DP, Bond M, Woodman RC, Curnutte JT. Infection with *Pseudomonas cepacia* in chronic granulomatous disease: role of nonoxidative killing by neutrophils in host defense. *J Infect Dis.* diciembre de 1994;170(6):1524-31.
119. Marciano BE, Spalding C, Fitzgerald A, Mann D, Brown T, Osgood S, et al. Common Severe Infections in Chronic Granulomatous Disease. *Clin Infect Dis.* 15 de abril de 2015;60(8):1176-83.

120. Tablan OC, Martone WJ, Jarvis WR. The epidemiology of *Pseudomonas cepacia* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Epidemiol.* diciembre de 1987;3(4):336-42.
121. Ederer GM, Matsen JM. Colonization and infection with *Pseudomonas cepacia*. *J Infect Dis.* junio de 1972;125(6):613-8.
122. Blessing J, Walker J, Maybury B. *Pseudomonas cepacia* and maltophilia in the cystic fibrosis patient. *Am Rev Respir Dis.* 1979;119(262).
123. Nolan G, Moivor P, Levison H, Fleming PC, Corey M, Gold R. Antibiotic prophylaxis in cystic fibrosis: inhaled cephaloridine as an adjunct to oral cloxacillin. *J Pediatr.* octubre de 1982;101(4):626-30.
124. Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, et al. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr.* febrero de 1984;104(2):206-10.
125. Thomassen MJ, Demko CA, Klinger JD, Stern RC. *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis. A new opportunist. *Am Rev Respir Dis.* mayo de 1985;131(5):791-6.
126. Tablan OC, Chorba TL, Schidlow DV, White JW, Hardy KA, Gilligan PH, et al. *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risk factors and clinical outcome. *J Pediatr.* septiembre de 1985;107(3):382-7.
127. Tablan OC, Martone WJ, Doershuk CF, Stern RC, Thomassen MJ, Klinger JD, et al. Colonization of the respiratory tract with *Pseudomonas cepacia* in cystic fibrosis. Risk factors and outcomes. *Chest.* abril de 1987;91(4):527-32.
128. Jarvis WR, Olson D, Tablan O, Martone WJ. The epidemiology of nosocomial *Pseudomonas cepacia* infections: endemic infections. *Eur J Epidemiol.* septiembre de 1987;3(3):233-6.
129. Nasser RM, Rahi AC, Haddad MF, Daoud Z, Irani-Hakime N, Almawi WY. Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia traced to contaminated hospital water used for dilution of an alcohol skin antiseptic. *Infect Control Hosp Epidemiol.* marzo de 2004;25(3):231-9.
130. Ghazal SS, Al-Mudaimiegh K, Al Fakihi EM, Asery AT. Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in immunocompetent children caused by contaminated nebulized sulbutamol in Saudi Arabia. *Am J Infect Control.* agosto de 2006;34(6):394-8.
131. Vonberg RP, Gastmeier P. Hospital-acquired infections related to contaminated substances. *J Hosp Infect.* enero de 2007;65(1):15-23.
132. Alvarez-Lerma F, Maull E, Terradas R, Segura C, Planells I, Coll P, et al. Moisturizing body milk as a reservoir of *Burkholderia cepacia*: outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit Care Lond Engl.* 2008;12(1):R10.
133. Graindorge A, Menard A, Neto M, Bouvet C, Miollan R, Gaillard S, et al. Epidemiology and molecular characterization of a clone of *Burkholderia cenocepacia* responsible for nosocomial pulmonary tract infections in a French intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 de enero de 2010;66(1):29-40.

134. Walters S, Smith EG. *Pseudomonas cepacia* in cystic fibrosis: transmissibility and its implications. *Lancet Lond Engl*. 3 de julio de 1993;342(8862):3-4.
135. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*. septiembre de 1996;60(3):539-74.
136. Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* Complex in Patients with Cystic Fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis*. febrero de 2002;8(2):181-7.
137. Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Carrasco G, Villalón P, Garrido N, Saéz-Nieto JA. Increase in isolation of *Burkholderia contaminans* from Spanish patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect*. 1 de febrero de 2015;21(2):150-6.
138. Cipolla L, Rocca F, Martinez C, Aguerre L, Barrios R, Prieto M. Prevalence of *Burkholderia cepacia* complex species in cystic fibrosis patients in Argentina during the period 2011–2015. *Enfermedades Infecc Microbiol Clin Engl Ed*. 1 de agosto de 2018;36(7):431-4.
139. Coutinho CP, dos Santos SC, Madeira A, Mira NP, Moreira AS, Sá-Correia I. Long-Term Colonization of the Cystic Fibrosis Lung by *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria: Epidemiology, Clonal Variation, and Genome-Wide Expression Alterations. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2 de diciembre de 2011 [citado 18 de septiembre de 2024];1. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2011.00012/full>
140. Dtd K, D L, A C, K M, C P, R P, et al. Prevalence of *Burkholderia* species, including members of *Burkholderia cepacia* complex, among UK cystic and non-cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* [Internet]. abril de 2017 [citado 18 de septiembre de 2024];66(4). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28463663/>
141. LiPuma JJ. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. abril de 2010;23(2):299.
142. MAHENTHIRALINGAM E, BALDWIN A, VANDAMME P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol*. 2002;51(7):533-8.
143. Aris RM, Routh JC, LiPuma JJ, Heath DG, Gilligan PH. Lung transplantation for cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia* complex. Survival linked to genomovar type. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de diciembre de 2001;164(11):2102-6.
144. Scoffone VC, Barbieri G, Buroni S, Scarselli M, Pizza M, Rappuoli R, et al. Vaccines to Overcome Antibiotic Resistance: The Challenge of *Burkholderia cenocepacia*. *Trends Microbiol*. abril de 2020;28(4):315-26.
145. Jones AM, Dodd ME, Govan JRW, Barcus V, Doherty CJ, Morris J, et al. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax*. 1 de noviembre de 2004;59(11):948-51.
146. Scoffone VC, Chiarelli LR, Trespidi G, Mentasti M, Riccardi G, Buroni S. *Burkholderia cenocepacia* Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches. *Front Microbiol* [Internet]. 22 de agosto de 2017 [citado 24 de octubre de 2024];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.01592/full>

147. Rhodes KA, Schweizer HP. Antibiotic Resistance in Burkholderia Species. Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother. 30 de julio de 2016;28:82.
148. Fiore A, Laevens S, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Vandamme P, et al. Burkholderia cepacia complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. Environ Microbiol. 2001;3(2):137-43.
149. Sajjan US, Xie H, Lefebvre MD, Valvano MA, Forstner JF. Identification and molecular analysis of cable pilus biosynthesis genes in Burkholderia cepacia. Microbiol Read Engl. abril de 2003;149(Pt 4):961-71.
150. Sajjan U, Wu Y, Kent G, Forstner J. Preferential adherence of cable-piliated burkholderia cepacia to respiratory epithelia of CF knockout mice and human cystic fibrosis lung explants. J Med Microbiol. octubre de 2000;49(10):875-85.
151. Sajjan US, Corey M, Karmali MA, Forstner JF. Binding of Pseudomonas cepacia to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis. J Clin Invest. febrero de 1992;89(2):648.
152. Sajjan SU, Forstner JF. Identification of the mucin-binding adhesin of Pseudomonas cepacia isolated from patients with cystic fibrosis. Infect Immun. abril de 1992;60(4):1434-40.
153. Nelson JW, Butler SL, Krieg D, Govan JRW. Virulence factors of Burkholderia cepacia. FEMS Immunol Med Microbiol. 1 de febrero de 1994;8(2):89-97.
154. Sun L, Jiang RZ, Steinbach S, Holmes A, Campanelli C, Forstner J, et al. The emergence of a highly transmissible lineage of cbl+ Pseudomonas (Burkholderia) cepacia causing CF centre epidemics in North America and Britain. Nat Med. julio de 1995;1(7):661-6.
155. Sajjan US, Yang JH, Hershenson MB, LiPuma JJ. Intracellular trafficking and replication of Burkholderia cenocepacia in human cystic fibrosis airway epithelial cells. Cell Microbiol. septiembre de 2006;8(9):1456-66.
156. Lamothe J, Huynh KK, Grinstein S, Valvano MA. Intracellular survival of Burkholderia cenocepacia in macrophages is associated with a delay in the maturation of bacteria-containing vacuoles. Cell Microbiol. enero de 2007;9(1):40-53.
157. Tomich M, Herfst CA, Golden JW, Mohr CD. Role of Flagella in Host Cell Invasion by Burkholderia cepacia. Infect Immun. abril de 2002;70(4):1799.
158. Keith KE, Valvano MA. Characterization of SodC, a periplasmic superoxide dismutase from Burkholderia cenocepacia. Infect Immun. mayo de 2007;75(5):2451-60.
159. Sajjan SU, Carmody LA, Gonzalez CF, LiPuma JJ. A type IV secretion system contributes to intracellular survival and replication of Burkholderia cenocepacia. Infect Immun. diciembre de 2008;76(12):5447-55.
160. Urban TA, Griffith A, Torok AM, Smolkin ME, Burns JL, Goldberg JB. Contribution of Burkholderia cenocepacia flagella to infectivity and inflammation. Infect Immun. septiembre de 2004;72(9):5126-34.

161. Loeven NA, Perault AI, Cotter PA, Hodges CA, Schwartzman JD, Hampton TH, et al. The *Burkholderia cenocepacia* Type VI Secretion System Effector TecA Is a Virulence Factor in Mouse Models of Lung Infection. *mBio*. 28 de septiembre de 2021;12(5):10.1128/mbio.02098-21.
162. Walpole GF, Plumb JD, Chung D, Tang B, Boulay B, Osborne DG, et al. Inactivation of Rho GTPases by *Burkholderia cenocepacia* Induces a WASH-Mediated Actin Polymerization that Delays Phagosome Maturation. *Cell Rep*. 2 de junio de 2020;31(9):107721.
163. Keith KE, Hynes DW, Sholdice JE, Valvano MA. Delayed association of the NADPH oxidase complex with macrophage vacuoles containing the opportunistic pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Microbiol Read Engl*. abril de 2009;155(Pt 4):1004-15.
164. Rosales-Reyes R, Aubert DF, Tolman JS, Amer AO, Valvano MA. *Burkholderia cenocepacia* type VI secretion system mediates escape of type II secreted proteins into the cytoplasm of infected macrophages. *PLoS One*. 2012;7(7):e41726.
165. Al-Khodor S, Marshall-Batty K, Nair V, Ding L, Greenberg DE, Fraser IDC. *Burkholderia cenocepacia* J2315 escapes to the cytosol and actively subverts autophagy in human macrophages. *Cell Microbiol*. marzo de 2014;16(3):378-95.
166. McClean S, Callaghan M. *Burkholderia cepacia* complex: epithelial cell-pathogen confrontations and potential for therapeutic intervention. *J Med Microbiol*. 2009;58(1):1-12.
167. Duff C, Murphy PG, Callaghan M, McClean S. Differences in invasion and translocation of *Burkholderia cepacia* complex species in polarised lung epithelial cells in vitro. *Microb Pathog*. 1 de octubre de 2006;41(4):183-92.
168. Kim JY, Sajjan US, Krasan GP, LiPuma JJ. Disruption of Tight Junctions during Traversal of the Respiratory Epithelium by *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun*. noviembre de 2005;73(11):7107.
169. Kooi C, Corbett CR, Sokol PA. Functional Analysis of the *Burkholderia cenocepacia* ZmpA Metalloprotease. *J Bacteriol*. julio de 2005;187(13):4421.
170. Kooi C, Subsin B, Chen R, Pohorelic B, Sokol PA. *Burkholderia cenocepacia* ZmpB Is a Broad-Specificity Zinc Metalloprotease Involved in Virulence. *Infect Immun*. julio de 2006;74(7):4083.
171. Kooi C, Sokol PA. *Burkholderia cenocepacia* zinc metalloproteases influence resistance to antimicrobial peptides. *Microbiology*. 2009;155(9):2818-25.
172. Straus DC, Lonon MK, Hutson JC. Inhibition of rat alveolar macrophage phagocytic function by a *Pseudomonas cepacia* lipase. *J Med Microbiol*. noviembre de 1992;37(5):335-40.
173. Mullen T, Markey K, Murphy P, McClean S, Callaghan M. Role of lipase in *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) invasion of lung epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. diciembre de 2007;26(12):869-77.
174. Tomich M, Griffith A, Herfst CA, Burns JL, Mohr CD. Attenuated Virulence of a *Burkholderia cepacia* Type III Secretion Mutant in a Murine Model of Infection. *Infect Immun*. marzo de 2003;71(3):1405.

175. Lefebvre M, Valvano M. In vitro resistance of Burkholderia cepacia complex isolates to reactive oxygen species in relation to catalase and superoxide dismutase production. *Microbiol Read Engl.* enero de 2001;147(Pt 1):97-109.
176. Acker HV, Sass A, Bazzini S, Roy KD, Udine C, Messiaen T, et al. Biofilm-Grown Burkholderia cepacia Complex Cells Survive Antibiotic Treatment by Avoiding Production of Reactive Oxygen Species. *PLOS ONE.* 13 de marzo de 2013;8(3):e58943.
177. Sokol PA, Darling P, Woods DE, Mahenthiralingam E, Kooi C. Role of Ornibactin Biosynthesis in the Virulence of Burkholderia cepacia: Characterization of pvdA, the Gene Encoding l-Ornithine N5-Oxygenase. *Infect Immun.* septiembre de 1999;67(9):4443.
178. Uehlinger S, Schwager S, Bernier SP, Riedel K, Nguyen DT, Sokol PA, et al. Identification of Specific and Universal Virulence Factors in Burkholderia cenocepacia Strains by Using Multiple Infection Hosts. *Infect Immun.* 15 de junio de 2009;77(9):4102.
179. Visser MB, Majumdar S, Hani E, Sokol PA. Importance of the Ornibactin and Pyochelin Siderophore Transport Systems in Burkholderia cenocepacia Lung Infections. *Infect Immun.* mayo de 2004;72(5):2850.
180. Cox AD, Wilkinson SG. Ionizing groups in lipopolysaccharides of Pseudomonas cepacia in relation to antibiotic resistance. *Mol Microbiol.* marzo de 1991;5(3):641-6.
181. Shimomura H, Matsuura M, Saito S, Hirai Y, Isshiki Y, Kawahara K. Unusual Interaction of a Lipopolysaccharide Isolated from Burkholderia cepacia with Polymyxin B. *Infect Immun.* septiembre de 2003;71(9):5225.
182. Zughair SM, Ryley HC, Jackson SK. Lipopolysaccharide (LPS) from Burkholderia cepacia is more active than LPS from Pseudomonas aeruginosa and Stenotrophomonas maltophilia in stimulating tumor necrosis factor alpha from human monocytes. *Infect Immun.* marzo de 1999;67(3):1505-7.
183. Reddi K, Phagoo SB, Anderson KD, Warburton D. Burkholderia cepacia-Induced IL-8 Gene Expression in an Alveolar Epithelial Cell Line: Signaling Through CD14 and Mitogen-Activated Protein Kinase. *Pediatr Res.* septiembre de 2003;54(3):297-305.
184. Cescutti P. Bacterial Capsular Polysaccharides and Exopolysaccharides. *Microb Glycobiol.* 31 de diciembre de 2010;93-108.
185. Cress BF, Englaender JA, He W, Kasper D, Linhardt RJ, Koffas MAG. Masquerading microbial pathogens: Capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiol Rev.* 27 de enero de 2014;38(4):660.
186. Cuzzi B, Herasimenka Y, Silipo A, Lanzetta R, Liut G, Rizzo R, et al. Versatility of the Burkholderia cepacia Complex for the Biosynthesis of Exopolysaccharides: A Comparative Structural Investigation. *PLOS ONE.* 10 de abril de 2014;9(4):e94372.
187. Conway BAD, Chu KK, Bylund J, Altman E, Speert DP. Production of Exopolysaccharide by Burkholderia cenocepacia Results in Altered Cell-Surface Interactions and Altered Bacterial Clearance in Mice. *J Infect Dis.* 1 de septiembre de 2004;190(5):957-66.

188. Bylund J, Burgess LA, Cescutti P, Ernst RK, Speert DP. Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* Inhibit Neutrophil Chemotaxis and Scavenge Reactive Oxygen Species *. *J Biol Chem.* 3 de febrero de 2006;281(5):2526-32.
189. Sousa SA, Ulrich M, Bragonzi A, Burke M, Worlitzsch D, Leitão JH, et al. Virulence of *Burkholderia cepacia* complex strains in gp91phox^{-/-} mice. *Cell Microbiol.* diciembre de 2007;9(12):2817-25.
190. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* febrero de 2004;2(2):95-108.
191. Schwab U, Leigh M, Ribeiro C, Yankaskas J, Burns K, Gilligan P, et al. Patterns of Epithelial Cell Invasion by Different Species of the *Burkholderia cepacia* Complex in Well-Differentiated Human Airway Epithelia. *Infect Immun.* agosto de 2002;70(8):4547.
192. Murphy MP, Caraher E. Residence in biofilms allows *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) bacteria to evade the antimicrobial activities of neutrophil-like dHL60 cells. *Pathog Dis.* 1 de noviembre de 2015;73(8):ftv069.
193. Desai M, Bühler T, Weller PH, Brown MR. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *J Antimicrob Chemother.* agosto de 1998;42(2):153-60.
194. Caraher E, Reynolds G, Murphy P, McClean S, Callaghan M. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1 de marzo de 2007;26(3):213-6.
195. Bellich B, Terán LC, Fazli MM, Berti F, Rizzo R, Tolker-Nielsen T, et al. The Bep gene cluster in *Burkholderia cenocepacia* H111 codes for a water-insoluble exopolysaccharide essential for biofilm formation. *Carbohydr Polym.* 1 de febrero de 2023;301:120318.
196. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:165-99.
197. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:319-46.
198. Lewenza S, Conway B, Greenberg EP, Sokol PA. Quorum Sensing in *Burkholderia cepacia*: Identification of the LuxRI Homologs CepRI. *J Bacteriol.* febrero de 1999;181(3):748.
199. Baldwin A, Sokol PA, Parkhill J, Mahenthiralingam E. The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun.* marzo de 2004;72(3):1537-47.
200. Subramoni S, Sokol PA. Quorum Sensing Systems Influence *Burkholderia Cenocepacia* Virulence. *Future Microbiol.* 1 de diciembre de 2012;7(12):1373-87.
201. Sokol PA, Sajjan U, Visser MB, Gingués S, Forstner J, Kooi C. The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. *Microbiol Read Engl.* diciembre de 2003;149(Pt 12):3649-58.

202. Schwager S, Agnoli K, Köthe M, Feldmann F, Givskov M, Carlier A, et al. Identification of *Burkholderia cenocepacia* Strain H111 Virulence Factors Using Nonmammalian Infection Hosts. *Infect Immun.* enero de 2013;81(1):143.
203. Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* junio de 2011;55(6):2655-61.
204. Yin L, Wang Y, Xiang S, Xu K, Wang B, Jia AQ. Tyramine, one quorum sensing inhibitor, reduces pathogenicity and restores tetracycline susceptibility in *Burkholderia cenocepacia*. *Biochem Pharmacol.* 1 de diciembre de 2023;218:115906.
205. Hansen AM, Chaerkady R, Sharma J, Díaz-Mejía JJ, Tyagi N, Renuse S, et al. The *Escherichia coli* phosphotyrosine proteome relates to core pathways and virulence. *PLoS Pathog.* 2013;9(6):e1003403.
206. Ouidir T, Jarnier F, Cosette P, Jouenne T, Hardouin J. Potential of liquid-isoelectric-focusing protein fractionation to improve phosphoprotein characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Anal Bioanal Chem.* octubre de 2014;406(25):6297-309.
207. Daines DA, Granger-Schnarr M, Dimitrova M, Silver RP. Use of LexA-based system to identify protein-protein interactions in vivo. *Methods Enzymol.* 2002;358:153-61.
208. Holden MTG, Seth-Smith HMB, Crossman LC, Sebahia M, Bentley SD, Cerdeño-Tárraga AM, et al. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J Bacteriol.* enero de 2009;191(1):261-77.
209. La P, Yang G, Dennery PA. Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated phosphorylation stabilizes ISCU protein: implications for iron metabolism. *J Biol Chem.* 3 de mayo de 2013;288(18):12901-9.
210. Annan RS, Carr SA. The essential role of mass spectrometry in characterizing protein structure: mapping posttranslational modifications. *J Protein Chem.* julio de 1997;16(5):391-402.
211. Thomas K. Characterization of the SufC ATPase during Fe-S Cluster Assembly by the Suf Pathway in *Escherichia coli*. Theses Diss [Internet]. 1 de enero de 2015; Disponible en: <https://scholarcommons.sc.edu/etd/3626>
212. Nallamsetty S, Waugh DS. A generic protocol for the expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* using a combinatorial His6-maltose binding protein fusion tag. *Nat Protoc.* 2007;2(2):383-91.
213. Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of Affinity Tags for Protein Purification. *Curr Protoc Protein Sci* Editor Board John E Coligan Al. 24 de septiembre de 2013;73:Unit.
214. Nguyen TN, Goodrich JA. Protein-protein interaction assays: eliminating false positive interactions. *Nat Methods.* febrero de 2006;3(2):135-9.
215. Freibert SA, Boniecki MT, Stümpfig C, Schulz V, Krapoth N, Winge DR, et al. N-terminal tyrosine of ISCU2 triggers [2Fe-2S] cluster synthesis by ISCU2 dimerization. *Nat Commun.* 25 de noviembre de 2021;12(1):6902.

216. Brady ST, Lau LF. Chapter 26 - Tyrosine Phosphorylation. En: Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL, editores. Basic Neurochemistry (Eighth Edition) [Internet]. New York: Academic Press; 2012 [citado 7 de noviembre de 2024]. p. 493-513. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749475000262>
217. Shi R, Proteau A, Villarroya M, Moukadiri I, Zhang L, Trempe JF, et al. Structural Basis for Fe-S Cluster Assembly and tRNA Thiolation Mediated by IscS Protein-Protein Interactions. PLOS Biol. 13 de abril de 2010;8(4):e1000354.
218. Fahs S, Lujan P, Köhn M. Approaches to Study Phosphatases. ACS Chem Biol. 18 de noviembre de 2016;11(11):2944-61.
219. Margenat M, Betancour G, Irving V, Costábile A, García-Cedrés T, Portela MM, et al. Characteristics of Mycobacterium tuberculosis PtpA interaction and activity on the alpha subunit of human mitochondrial trifunctional protein, a key enzyme of lipid metabolism. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 22 de junio de 2023 [citado 8 de noviembre de 2024];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2023.1095060/full>
220. Raran-Kurussi S, Waugh DS. The Ability to Enhance the Solubility of Its Fusion Partners Is an Intrinsic Property of Maltose-Binding Protein but Their Folding Is Either Spontaneous or Chaperone-Mediated. PLoS ONE. 16 de noviembre de 2012;7(11):e49589.
221. Wang C, Zou Q. Prediction of protein solubility based on sequence physicochemical patterns and distributed representation information with DeepSoluE. BMC Biol. 24 de enero de 2023;21(1):12.
222. Kung JE, Jura N. Structural Basis for the Non-catalytic Functions of Protein Kinases. Structure. 5 de enero de 2016;24(1):7-24.
223. Cirri P, Chiarugi P, Taddei L, Raugei G, Camici G, Manao G, et al. Low Molecular Weight Protein-tyrosine Phosphatase Tyrosine Phosphorylation by c-Src during Platelet-derived Growth Factor-induced Mitogenesis Correlates with Its Subcellular Targeting *. J Biol Chem. 4 de diciembre de 1998;273(49):32522-7.
224. Hertog J den, Östman A, Böhmer FD. Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms. FEBS J. 2008;275(5):831-47.
225. Wong D, Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. Proc Natl Acad Sci U S A. 29 de noviembre de 2011;108(48):19371-6.