

Cambios en el perfil proteico de *E. coli* O157:H7 frente al tratamiento con Ib-M1 e IONP@Ib-M1

Ramíez Forero, Gloria Smith; Valdivieso Quintero, Wilfredo; Ropero Vega, José Luis; Zafra, German; Flórez Castillo, Johanna Marcela

Cambios en el perfil proteico de *E. coli* O157:H7 frente al tratamiento con Ib-M1 e IONP@Ib-M1

Revista Colombiana de Química, vol. 50, núm. 1, 2021

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309066297001>

Cambios en el perfil proteico de *E. coli* O157:H7 frente al tratamiento con Ib-M1 e IONP@Ib-M1

Changes in the protein profile of *E. coli* O157: H7 against treatment with Ib-M1 and IONP@Ib-M1

Identificação de alterações no perfil protetor de *E. coli* O157: H7 contra o tratamento com Ib-M1 e IONP@Ib-M1

Gloria Smith Ramíez Forero

Universidad de Santander, Colombia

gsramirez06@outlook.com

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?>

id=309066297001

Wilfredo Valdivieso Quintero

Universidad de Santander, Colombia

José Luis Ropero Vega

Universidad de Santander, Colombia

German Zafra

Universidad Industrial de Santander, Colombia

Johanna Marcela Flórez Castillo

Universidad de Santander, Colombia

Recepción: 13 Julio 2020

Revisado: 08 Agosto 2020

Aprobación: 30 Septiembre 2020

RESUMEN:

Escherichia coli O157:H7 es una bacteria patógena reconocida por su capacidad de resistencia a diversos antibióticos; razón por la cual, se generan complicaciones en el tratamiento de infecciones producidas por esta bacteria. El péptido Ib-M1 y el bioconjuguado IONP@Ib-M1 han surgido como una nueva alternativa antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7. El mecanismo de acción de Ib-M1 e IONP@Ib-M1 contra esta bacteria aún es desconocido; por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue identificar el cambio en el perfil de proteínas de *E. coli* O157:H7 luego del tratamiento con Ib-M1 e IONP@Ib-M1 como primer paso para determinar su mecanismo de acción. Para esto, se llevó a cabo la obtención de proteínas, posteriormente se realizó una electroforesis bidimensional para finalmente realizar la determinación de la variabilidad de los perfiles proteicos. Una vez obtenidos estos perfiles, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA). Se identificaron 72 proteínas expresadas diferencialmente, las cuales pueden relacionarse con el efecto sobre el crecimiento de la bacteria en presencia de Ib-M1 e IONP@Ib-M1. Estas proteínas se encuentran involucradas en procesos de transferencia de grupos acilo (proteína Yhbs), translocación de lipoproteínas (proteína LolA) y transporte de aminoácidos (proteína GpmA), entre otros.

PALABRAS CLAVE: Ib-M1, *Escherichia coli* O157:H7, análisis proteómico, péptidos antimicrobianos, Ib-M1.

ABSTRACT:

Escherichia coli O157: H7 is a pathogenic bacterium which is recognized for the ability to resist multiple antibiotics; accordingly, complications occur in the treatment of infections caused by this bacterium. The Ib-M1 peptide and the IONP @ Ib-M1 bioconjugate have emerged as a new antimicrobial alternatives against *E. coli* O157: H7. The mechanism of action of Ib-M1 and IONP @ Ib-M1 against this bacterium is still unknown; therefore, the goal of this research was to identify the change in the proteins profile of *E. coli* O157: H7 after treatment with Ib-M1 and IONP @ Ib-M1 as a first step to determine its mechanism of action. For this, the proteins were obtained first, and then a two-dimensional electrophoresis was performed to finally determine

NOTAS DE AUTOR

gsramirez06@outlook.com

the variability of the protein profiles. Once the protein profiles were obtained, an analysis of variance (ANOVA) was carried out. 72 differentially expressed proteins were identified, which can be connected to the effect on the bacterium's growth in the presence of Ib-M1 and IONP @ Ib-M. These proteins are involved in acyl groups transfer processes (Yhbs protein), lipoprotein translocation (LolA protein) and amino acid transport (GpmA protein), among others.

KEYWORDS: *Escherichia coli* O157: H7, proteomic analysis, antimicrobial peptides, Ib-M1.

RESUMO:

Escherichia coli O157: H7 é uma bactéria patogênica reconhecida por sua capacidade de resistir a vários antibióticos; razão pela qual, complicações são geradas no tratamento de infecções produzidas por essa bactéria. O peptídeo Ib-M1 livre e imobilizado em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (IONP @ Ib-M1) surgiu como uma nova alternativa antimicrobiana contra *E. coli* O157: H7 e isolados clínicos desta bactéria. O mecanismo de ação de Ib-M1 e IONP @ Ib-M1 contra *E. coli* O157: H7 ainda é desconhecido; Portanto, o objetivo desta pesquisa foi identificar a alteração no perfil proteico de *E. coli* O157: H7 após o tratamento com Ib-M1 e IONP @ Ib-M1 como um primeiro passo para determinar seu mecanismo de ação. Para isso, foi realizada a obtenção das proteínas, posteriormente foi realizada uma eletroforese bidimensional para finalmente determinar a variabilidade dos perfis protéicos. Uma vez obtidos os perfis de proteínas, foi realizada uma análise de variância (ANOVA). Os resultados mostram a identificação de proteínas expressas diferencialmente e que estão envolvidas em processos de transferência de grupos acila (proteína Yhbs), translocação de lipoproteínas (proteína LolA) e transporte de aminoácidos (proteína GpmA), entre outros.

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli* O157: H7, análise proteômica, peptídeos antimicrobianos, Ib-M1.

Introducción

Escherichia coli O157:H7 es una bacteria patógena que ocasiona Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS) debido a que puede encontrarse contaminando alimentos como carne cruda o poco cocida, leche cruda, hortalizas y semillas germinadas crudas [1]. Entre las enfermedades producidas por *E. coli* O157:H7 se incluye la colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (HUS) y Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) [2]. Este tipo de enfermedades se convierten en un problema a nivel mundial de salud pública significativa, ya que se han encontrado cepas de *E. coli* O157:H7 que muestran resistencia a diferentes antibióticos, como ampicilina, amoxicilina, ácido clavulánico, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, neomicina, tetraciclina, cloranfenicol, ciprofloxacina, sulfametoxazol, entre otros [3].

Esta resistencia se ha convertido en una amenaza por la diseminación de bacterias resistentes, por lo cual los péptidos antimicrobianos (AMP, del inglés Anti-Microbial-Peptide) han surgido como una nueva alternativa de antimicrobianos, estos se caracterizan por su bajo peso molecular, gran variedad en su estructura secundaria, composición de aminoácidos variable y polaridad catiónica y anfipática. Debido a que presentan diferentes blancos de acción, dificultan el desarrollo de resistencia bacteriana [4] siendo algunos de sus mecanismos de acción la permeabilización de la membrana, la ruptura estructural de la célula y la interrupción de acciones biológicas de componentes citoplásmicos cruciales como proteínas, enzimas, ARN y ADN [5].

Flórez *et al.*, en el año 2014, obtuvieron sintéticamente la familia de péptidos Ib-M, con modificaciones en la carga neta e hidrofobicidad en el dominio C-terminal con respecto a su análogo Ib#AMP4, péptido antimicrobiano derivado de *Impatiens balsamina* [6], obteniendo mayor efecto inhibitorio con respecto al péptido nativo en *Escherichia coli* K-12 [7]. Así mismo, se ha encontrado que de esta familia, el péptido Ib-M1 posee un valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 4,7 μ M y 1,6 μ M de concentración mínima bactericida (CMB) contra *E. coli* O157:H7. Adicionalmente, presenta baja citotoxicidad en células VERO con un valor de concentración citotóxica 50 (CC₅₀) de 395,2 μ M [8]; lo que convierte a este compuesto en candidato a nuevos antibióticos para el tratamiento de infecciones ocasionadas por este patógeno. Por otra parte, se ha demostrado que la inmovilización de péptidos de la familia Ib-M en nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (IONPs, por sus siglas en inglés) no afecta su actividad contra *E. coli* O157:H7, lo cual puede

ser utilizado para el diseño de nuevos nanotransportadores de la familia Ib-M [9]. A pesar de las ventajas que los péptidos Ib-M presentan, aún no se conoce su mecanismo de acción antibacteriano.

Las respuestas bacterianas a nivel molecular en presencia de algún efecto de su crecimiento llevan a cambios en los niveles de expresión de proteínas que son responsables de diversos procesos fisiológicos como la transducción de señales celulares, reacciones bioquímicas de catálisis [10], entre otros [11]. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar una aproximación inicial al conocimiento en los cambios proteómicos ocasionados por Ib-M1 e IONP@Ib-M1 sobre *Escherichia coli* O157:H7. De esta manera, se busca dar un primer indicio del posible mecanismo de acción contra este microorganismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos

El péptido Ib-M1 tiene una carga catiónica de +6 y 20 aminoácidos en su estructura [7], este fue fabricado por Biomatik® y la solución patrón fue preparada en tampón Tris-HCl (10 mM pH 7,4) a una concentración final de 2000 µM y almacenado a -80 °C hasta su uso.

La síntesis de las IONPs se llevó a cabo mediante el método de coprecipitación [9] haciendo uso de cloruro de hierro tetrahidrato (II) (Sigma Aldrich, ≥99,0%), cloruro de hierro hexahidrato (III) (ACS, Reag. Ph Eur), hidróxido de amonio (NH₄OH de Merck), quitosano (Sigma Aldrich, peso molecular medio), ácido acético glacial (Merck, 100%, Merck), *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA, Sigma Aldrich, ≥99%), O-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU, Sigma Aldrich, ≥98,0%), nitrógeno gaseoso de grado comercial (Praxair), y agua tipo 1 desionizada (18,2 MΩ·cm).

Cepas y condiciones de crecimiento

E. coli O157:H7 (ATCC® 43888TM) se cultivó por primera vez en 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB) a 37 °C durante 18 h a 37 °C antes del ensayo; posterior a la incubación, se realizó el ajuste a escala McFarland 3 (OD 625 nm = 0,58/9*10⁸ UFC/mL) en caldo Mueller Hinton (MH), luego se llevó a cabo la inoculación en cada uno de los tratamientos (Ib-M1, IONPs, IONP@ y IONP@Ib-M1) y se obtuvo una concentración celular final de 4,4x10⁸ UFC/mL para cada tratamiento, realizando dos réplicas biológicas para cada ensayo independiente.

Obtención de IONP@Ib-M1

La obtención del bioconjuguado IONP@Ib-M1 se realizó siguiendo el procedimiento reportado por Ropero-Vega, *et al.* [9]. Inicialmente se obtuvieron las IONP por el método de coprecipitación utilizando como precursores sales de Fe⁺² y Fe⁺³ y como base NH₄OH. Para la inmovilización de Ib-M1 se realizó un recubrimiento de las IONP utilizando 160 µL de quitosano al 0,5% *p/v* en ácido acético al 2% *v/v*. Posteriormente, se realizó la formación de un enlace peptídico entre los grupos amino del quitosano y el grupo carboxilo del residuo Glu del péptido; para esto se mezclaron 70 µL del péptido con 44,9 mg de TBTU y 24,2 µL de DIPEA. Despues de 20 min de reacción, la mezcla del péptido fue adicionada a una suspensión de 800 µg de IONPs. Para la determinación de la cantidad de péptido inmovilizado se estableció la concentración del péptido antes del proceso de inmovilización y el péptido en el sobrenadante después de la inmovilización utilizando el método de Bradford [12] con el kit Quick Start™ Bradford Protein Assay de

BioRad determinando la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de fibra óptica AvaSpec-ULS2048L StarLine fiber-optic (Avantes).

Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7

La inhibición del crecimiento de la bacteria se determinó mediante el método de microdilución de acuerdo con los procedimientos descritos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio [13], utilizando placas estériles de 96 pozos de fondo redondo. Se prepararon diluciones seriadas de Ib-M1, IONPs, IONP@, IONP@Ib-M1 y luego se agregó el inóculo del caldo MH obteniendo un volumen final de 200 μ L por pocillo. Se realizaron controles de crecimiento negativos y positivos agregando cada una de las suspensiones caldo MH o *E. coli* O157:H7 con caldo MH a los pozos. La cinética de crecimiento se determinó midiendo la absorbancia de la suspensión a 595 nm utilizando Multiskan Sky (Thermoscientific) a 37 °C durante 24 h y en agitación constante.

Extracción de proteínas intracelulares y cuantificación

Posterior a determinar el crecimiento celular, se llevó a cabo la inoculación de *E. coli* O157:H7 con los diferentes tratamientos a 37 °C / 140 rpm en un volumen final de 5 mL. Finalizada la incubación, se realizó la centrifugación en tubos eppendorf de 1 mL. Una vez obtenido el pellet celular, se realizó el rompimiento de las células, posteriormente la extracción de proteínas siguiendo lo establecido por el fabricante [14] y después se llevó a cabo la cuantificación de las proteínas siguiendo lo establecido por la casa comercial con un volumen final de 1,5 mL [15].

Determinación del perfil proteico de *E. coli* O157:H7

Electroforesis de isoelectroenfoque: una vez las proteínas fueron extraídas se separaron de acuerdo con sus puntos isoelectrómicos mediante isoelectroenfoque (IEF) utilizando el equipo Protean IEF i12 de Bio-Rad. Para ello, se emplearon tiras IPG de pH 4-7, (rango lineal) de 11 cm, las cuales fueron rehidratadas con una solución de 8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% anfolitos, y trazas de azul de bromofenol [16] y con 200 μ L de muestra de proteína durante 18 h y posteriormente sometidas a electroforesis EIF teniendo en cuenta la siguiente programación: (1) voltaje 250 V – tiempo 20 min; (2) voltaje 8000 V – tiempo 2 h 30 min; (3) voltaje/hora 20,000.

Electroforesis SDS-PAGE: una vez terminado el corrido IEF, las tiras IPG fueron sometidas a un proceso de equilibrio según lo establecido por la casa comercial [16] y posteriormente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS vertical con concentraciones finales de acrilamida de 12% y 5% *p/v* para los geles de separación y apilamiento, respectivamente. La electroforesis se llevó a cabo durante 330 min a 150 V en un sistema de electroforesis Protean II XI Cell (Biorad) utilizando como marcador de peso Chromatein Prestained Protein Ladder® (*Vivantis*). Finalizada la electroforesis, se realizó la tinción de los geles por medio de nitrato de plata [17]. Se preparó un litro de cada una de las soluciones en recipientes limpios antes de iniciar el procedimiento y utilizando agua de calidad Milli-Q. Cada uno de los geles fueron depositados en solución de fijación (12% ácido acético glacial, 50% etanol, 0,5 mL/L formaldehído grado analítico) durante una hora con agitación constante. Posteriormente, fueron depositados en la solución de lavado (50% etanol) por 5, 10 y 15 min. A continuación, fueron lavados rápidamente con solución de tiosulfato de sodio (0,2% Na₂S₂O₃·5H₂O), después, los geles se lavaron con agua Milli-Q tres veces y se sumergieron en la solución de nitrato de plata (2% AgNO₃, 0,75 mL/L formaldehído grado analítico)

durante un tiempo de 20 min. Transcurrido este tiempo, los geles fueron lavados nuevamente tres veces con agua Milli-Q, seguido de esto, se sumergieron en la solución de revelado (3% Na₂CO₃, 20 mL/L de solución de tiosulfato de sodio, 0,5 mL/L de formaldehído grado analítico), durante 10 min. Finalmente, los geles se introdujeron durante 5 min en la solución de fijación y se almacenaron en la solución de conservación (25% etanol, 3% glicerol) a temperatura ambiente para su posterior registro mediante imágenes en formato *.TIFF de los patrones visibles de proteínas a través de un sistema Gel-DocTM XR+Imager (Bio Rad).

Determinación de la variabilidad de perfiles proteicos

La determinación de la variabilidad de los perfiles proteicos se realizó mediante análisis bioinformáticos. Para ello, por medio del *software* Photo-CaptMw versión 10.01, se efectuó la determinación de los puntos isoelectrómicos (pI) y pesos moleculares de cada una de las manchas (*spot*) expresadas en cada perfil comparando la movilidad electroforética del marcador de peso molecular Chromatein Prestained Protein Ladder[®] (Vivantis). A partir de este análisis se determinó, de acuerdo con estos parámetros, la posible proteína expresada y su función relacionada. Posteriormente se llevó a cabo la determinación de la variabilidad de los perfiles protéicos, haciendo uso de PDQuest 2-D Analysis Software[®] (Bio Rad), en el cual se detectó el número total de manchas (*spots*) para cada gel de tratamiento, se identificaron coincidencias entre cada uno de ellos (*matching*) y se realizó un análisis de acuerdo con los atributos.

Análisis estadístico

Mediante la cuantificación de densidad de pixeles de cada una de las manchas, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, el cual permitió determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los diferentes tratamientos de una misma proteína teniendo en cuenta las dos réplicas biológicas de cada una de las condiciones control, Ib-M1, IONP@Ib-M1, IONPs y IONP@. La comparación de medias de los tratamientos se realizó con el test de Bonferroni, en donde se determinó que cuando $p < 0,05$ hay diferencia significativa. Este análisis se realizó haciendo uso del software Stata/MP versión 14.0[®].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de bioconjugado a partir de inmovilización de Ib-M1 en IONPs

La inmovilización del péptido Ib-M1 en IONP@ se monitoreó por medio de la determinación de la absorbancia a 595 nm antes y después de realizar el lavado. Los resultados se muestran en la figura 1, en donde se observa una disminución en la absorbancia del sobrenadante proveniente de la centrifugación del IONP@Ib-M1, lo que indica que disminuyó la cantidad de péptido en solución y fue, por tanto, inmovilizado después de dos horas de agitación. El porcentaje de inmovilización del péptido Ib-M1 en las IONP@ fue de 45,23%.

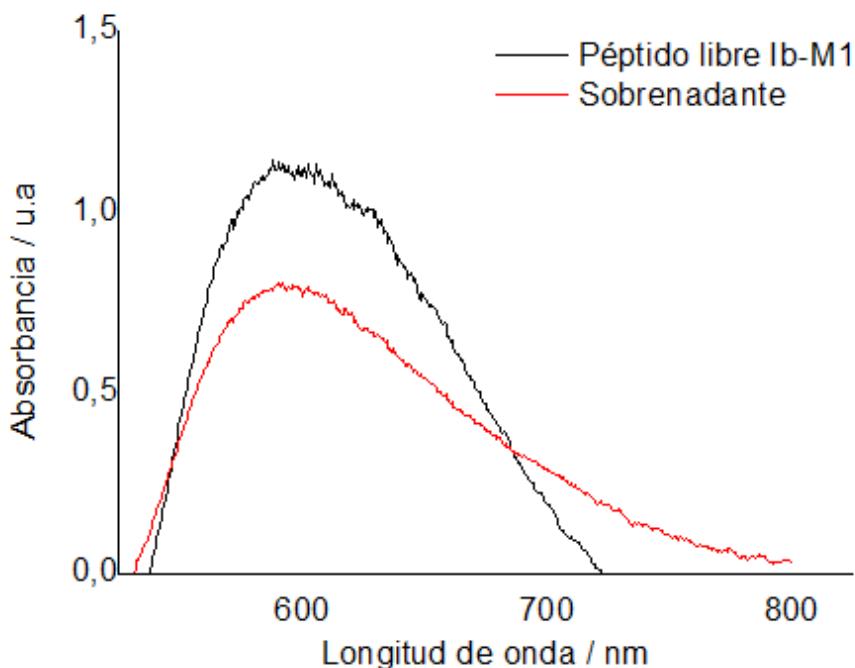


Figura 1. Inmovilización del péptido Ib-M1 en IONP@.

Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 bajo diferentes tratamientos con Ib-M1, IONP@Ib-M1, IONPs y IONP@

Los efectos inhibitorios de Ib-M1 se han estudiado en varias ocasiones [7, 8] bajo diferentes condiciones de cultivo. Se ha encontrado que el grado de inhibición depende de diferentes parámetros como la concentración celular. Teniendo en cuenta lo anterior, y con el objetivo de determinar cómo se podría afectar la cinética de crecimiento y a partir de qué momento de incubación se podría realizar el análisis con base en su cambio drástico en crecimiento, se analizó la respuesta de crecimiento celular bajo tratamientos con Ib-M1, IONP@Ib-M1, IONPs y IONP@ usando el método de microdilución. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos de cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 bajo los diferentes tratamientos.

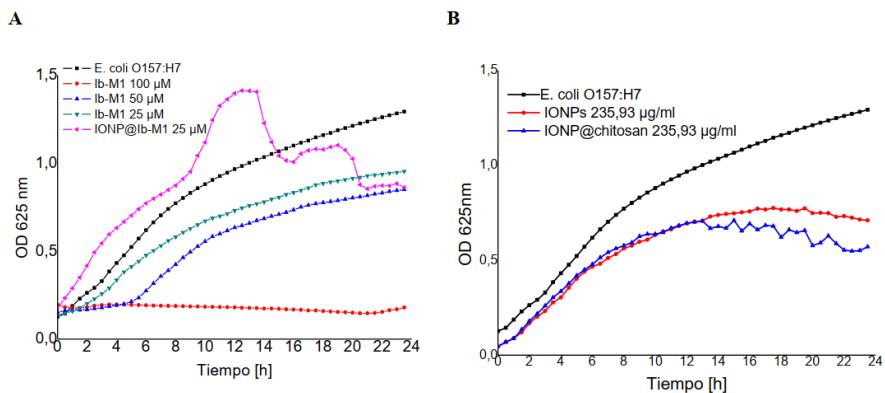


Figura 2. (A) Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) en presencia de péptido libre Ib-M1 a (●) 100 μ M, (▲) 50 μ M, (▼) 25 μ M, (#) y IONP@Ib-M1 a 25 μ M. El crecimiento de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) sin la adición de péptido (●) se incluyó con fines comparativos. (B) Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) en presencia de (●) IONPs y (▲) IONP@ a 235,93 μ g/ml. El crecimiento de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) sin la adición de tratamiento (●) se incluyó con fines comparativos.

De acuerdo con la figura 2A, el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en ausencia de los tratamientos, alcanzó una densidad óptica (OD) de 0,8 después de 9 h de tratamiento. Cuando este microorganismo se inocula junto con el péptido Ib-M1, se observa una disminución de 24; 40 y 78% del crecimiento frente a las concentraciones 25, 50 y 100 μ M respectivamente después de 9 h de incubación. Bajo estas condiciones se observó que el Ib-M1 a concentración de 50 μ M llevó a una fase de latencia extendida 5 h después de la incubación. Para la concentración de 25 μ M de Ib-M1, la densidad celular estuvo por debajo del control durante todo el periodo de incubación. El análisis anterior mostró que bajo el tratamiento con Ib-M1 el estrés condujo a una fase de latencia prolongada e inhibió el máximo crecimiento celular a una concentración de 100 μ M; mientras que las tasas de crecimiento celular mostraron un aumento a medida que se disminuye la concentración.

Por otro lado, cuando *E. coli* O157:H7 es puesta en crecimiento junto con IONP@Ib-M1 a una concentración de 25 μ M, se observa que el crecimiento celular presenta un cambio significativo en su fase de crecimiento a partir de la hora 9 de incubación, iniciando su fase exponencial. Es posible que este comportamiento esté relacionado con el aumento de la concentración focal del péptido sobre la membrana bacteriana [18]. De acuerdo con los resultados obtenidos por Prada *et al.* (2020), se observó diferencia en la cinética de crecimiento a lo largo de todo el periodo de incubación [8], esto posiblemente a causa de la diferencia en concentración celular utilizada en esta investigación. Así mismo, en el estudio realizado por Flórez-Castillo *et al.*, se demostró que las IONP y IONP@ no poseen actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7 a una concentración de 120,7 y 60,3 μ g/mL respectivamente. En este estudio, se determinó la cinética de crecimiento de este microorganismo en presencia de estas IONPs a concentraciones superiores, resultados que se presentan en la figura 2B, en donde se encontró que con respecto a IONPs y IONP@ a una concentración de 235 μ g/mL en *E. coli* O157:H7 a partir de la sexta hora de incubación, se alcanza la fase estacionaria con respecto al control.

Análisis proteómico de *E. coli* O157:H7 bajo tratamiento con Ib-M1 y IONP@Ib-M1

Para determinar los cambios a nivel de expresión de proteínas bajo los diferentes tratamientos transcurridas nueve horas de incubación, se realizó el análisis por medio de electroforesis bidimensional. Para esto, se utilizaron entre 1,2 y 2,6 mg de muestra de proteína. Se realizaron dos réplicas biológicas para el control positivo y para los tratamientos Ib-M1, IONP@Ib-M1, IONPs y IONP@. Posteriormente se efectuó el

análisis como se menciona en el apartado de metodología. Se llevó a cabo la normalización de las intensidades de cada una de las manchas expresadas, utilizando la intensidad total del punto por gel, para compensar las variaciones entre las réplicas. En la figura 3 se muestra el resultado de la exposición de *E. coli* O157:H7 a Ib-M1 a una concentración de 25 μ M. Las manchas de proteínas se encuentran en todo el rango de pH de la tira IPG y los pesos moleculares de las manchas se distribuyen a lo largo de todo el gel, entre 22 y 95 kDa aproximadamente.

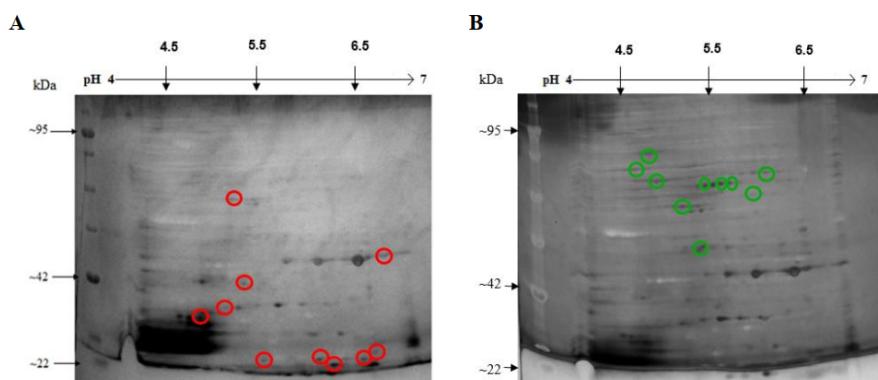


Figura 3. (A) Mapa bidimensional del proteoma control de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación. (B) Mapa bidimensional del proteoma control de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación con Ib-M1. Los círculos rojos evidencian manchas inhibidas bajo tratamiento y los círculos verdes son manchas expresadas bajo tratamiento.

Se obtuvo la expresión total de 39 puntos de proteínas; 15 se inhibieron con respecto al control, 15 se expresaron con respecto al control, 23 tuvieron una sobreexpresión $\geq 1,5$ y siete una inhibición $\leq 1,5$. De aquellas proteínas que estuvieron presentes tanto en el perfil de proteínas control como en el perfil de proteínas del tratamiento con Ib-M1, seis presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), las cuales se muestran en la figura 4.

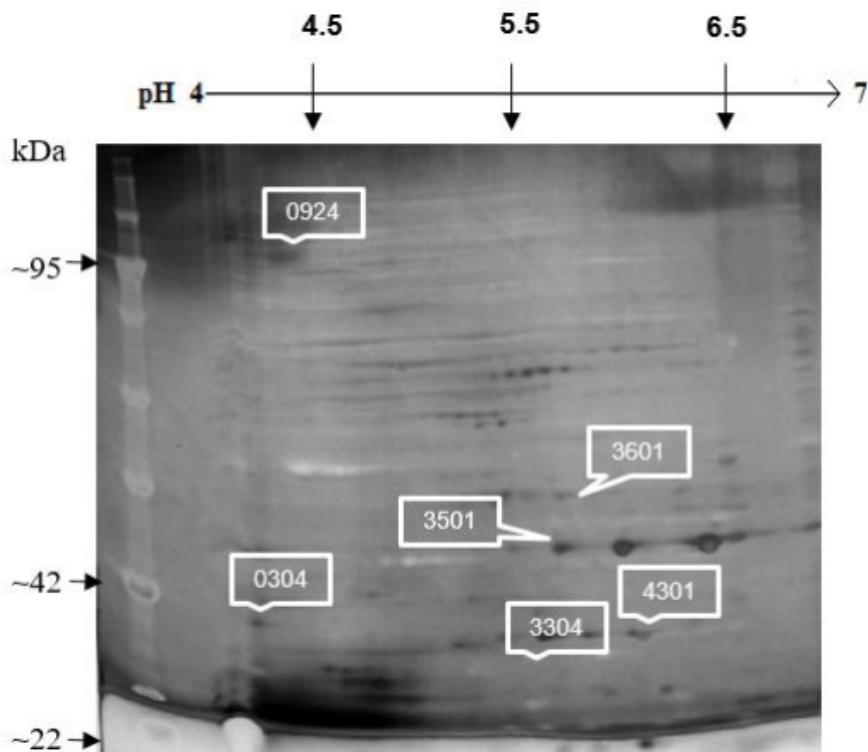


Figura 4. Mapa bidimensional del proteoma de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación con tratamiento Ib-M1. Se encuentran enmarcadas aquellas proteínas que estuvieron presentes tanto en el perfil de proteínas control como en el perfil de proteínas del tratamiento con Ib-M1 y que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Después de identificar los patrones de expresión se realizó la aproximación a la identificación de las proteínas expresadas que presentaron diferencias estadísticamente significativas, aquellas que para nuestro conocimiento no han sido reportadas se indicaron con NR. La posible identificación de las proteínas se lista en la tabla 1.

S po t	P osible proteína	Función molecular / proceso biológico	Expresión diferencial			
			p-valor*	pi	MW	
0304	NR	NR	+1,5	0,036	4,1	22,3
0924	CheA [19]	Transmisión de señales sensoriales de los quimiorreceptores a los motores flagelares [20]	+1,5	0,001	4,0	86,6
3304	MoaB [19]	Biosíntesis de molibdoptérica. Hexamerización de proteínas [20] Hidrólisis de enlace	+1,5	0,000	5,6	21,6
3501	Bla [19]	betalactámico en antibióticos [19] Respuesta a antimicrobiano [20]	+1,5	0,000	5,5	28,8
3601	TrxB [19]	Eliminación de radicales superóxido [20] Actividad de NADPH	+1,5	0,025	5,5	34,0
4301	MdaB [19]	deshidrogenasa (quinona), unión al dinucleótido de adenina flavina [20]	+1,5	0,029	5,9	21,8

Tabla 1. Proteínas de *E. coli* O157:H7 expresadas diferencialmente frente al tratamiento Ib-M1 con respecto al perfil de proteínas control.

* El p-valor resulta luego de hacer el Anova y test de Bonferroni. NR Proteínas no reportadas de acuerdo con peso molecular (MW) y punto isoelectrónico (pI).

De acuerdo con lo anterior, se observó la sobreexpresión de proteínas relacionadas con mecanismo de respuesta inmediata para contrarrestar los efectos del péptido Ib-M1 libre. Una de las proteínas con expresión diferencial podría corresponder a cheA (histidina quinasa), la cual es regulada por señales enviadas de quimio aceptores de metiloproteínas (MCP) en respuesta a cambios en el comportamiento flagelar a través de un movimiento conocido como quimiotaxis [21]. La expresión diferencial de la proteína identificada como moaB está involucrada en la biosíntesis del cofactor de molibdeno (MoCo) [22]. La falta MoCo en *Escherichia coli* causa hipersensibilidad a ciertos análogos de bases N-hidroxiladas, ya que se ha encontrado que *E. coli* contiene una molibdoenzima capaz de desintoxicar tales análogos (Kozmin & Schaaper, 2007). Así mismo, se ha encontrado que MoCo es el componente esencial de un grupo de enzimas de óxido-reducción que catalizan una amplia variedad de transformaciones de carbono, átomos de azufre y nitrógeno [23]. La proteína identificada como Bla (β -lactamasa) está asociada a la biosíntesis de molibdopterina, hexamerización de proteínas e hidrólisis de enlaces betalactámicos en antibióticos [24]. Se ha encontrado que este tipo de proteína es producida por ciertas bacterias que pueden hidrolizar cefalosporina [25], así mismo, confieren resistencia a la ampicilina, amoxicilina, aztreonam y a la mayoría de las cefalosporinas [26]. La proteína identificada como MdaB (modulador de la actividad del fármaco B/NADPH quinona reductasa) proporciona protección contra la toxicidad de biomoléculas conocidas como quinonoides por sistema de reducción de electrones, además, regula el ciclo redox de la quinona en *E. coli* [27]. Haciendo uso de la herramienta en línea STRING V11.0, no se obtuvo interacción entre las posibles proteínas identificadas, sin embargo, esto no necesariamente implica que no se trate de proteínas biológicamente significativas, solo que aún no se conocen otras interacciones.

En la figura 5 se muestra el resultado de la exposición de *E. coli* O157:H7 a IONP@Ib-M1 a una concentración de 25 μ M. Las manchas de proteínas se encuentran en todo el rango de pH de la tira IPG y los pesos moleculares de las manchas se distribuyen entre 22 y 42 kDa aproximadamente.

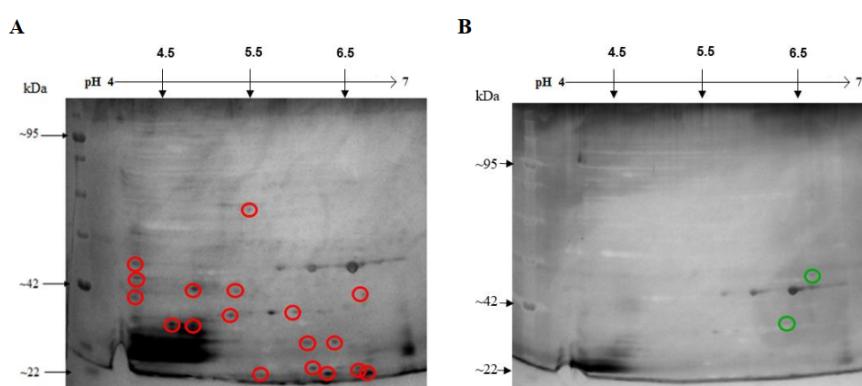


Figura 5. (A) Mapa bidimensional del proteoma control de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación. (B) Mapa bidimensional del proteoma control de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación con IONP@b-M1. Los círculos rojos evidencian manchas inhibidas bajo tratamiento y los círculos verdes son manchas expresadas bajo tratamiento.

Como resultado de la exposición de *E. coli* O157:H7 bajo el tratamiento con IONP@Ib-M1, fueron detectadas un total 17 puntos de proteínas expresados; 25 se inhibieron con respecto al control, dos se expresaron con respecto al control, 11 tuvieron una sobreexpresión $\geq 1,5$ y dos una inhibición $\leq 1,5$. De aquellas proteínas que estuvieron presentes tanto en el perfil de proteínas control como en el perfil de proteínas del tratamiento con IONP@Ib-M1, seis presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) las cuales se muestran en la figura 6.

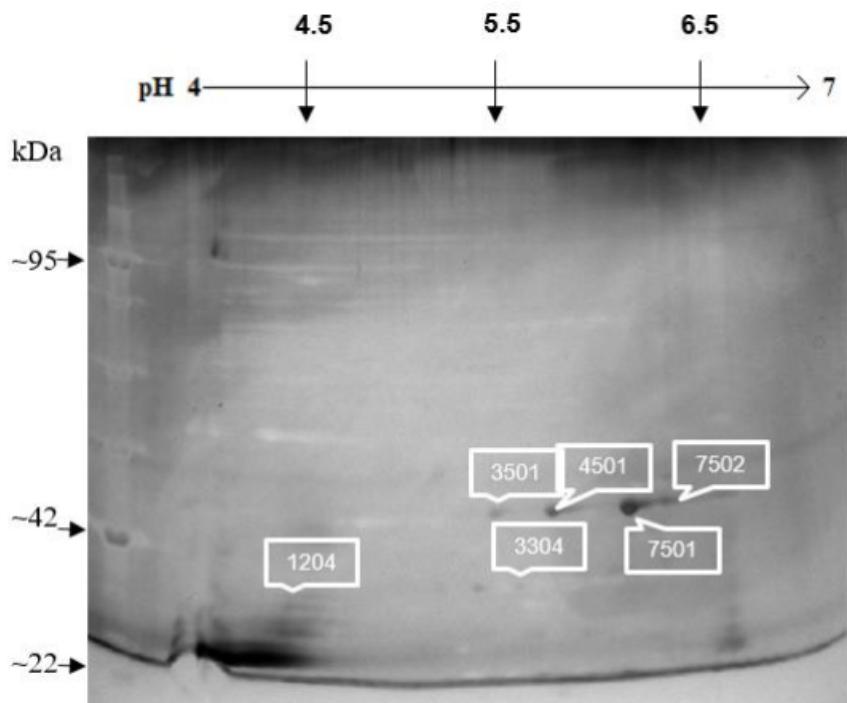


Figura 6. Mapa bidimensional del proteoma de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación con tratamiento IONP@Ib-M1. Se encuentran enmarcadas aquellas proteínas que estuvieron presentes tanto en el perfil de proteínas control como en el perfil de proteínas del tratamiento con IONP@Ib-M1 y que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Después de identificar los patrones de expresión se realizó la aproximación a la identificación de las proteínas expresadas y aquellas que presentaron diferencias estadísticamente significativas, aquellas que para nuestro conocimiento no han sido reportadas se indicaron con NR. La posible identificación de las proteínas se lista en la tabla 2.

Spot	Possible proteína	Función molecular / proceso biológico	Expresión diferencial	p-valor	pi	mw
1204	YhbS [19]	Transferencia de grupos acilo [20]	-1,5	0,009	4,5	18,5
3304	LolA [19]	Participa en la translocación de lipoproteínas de la membrana interna a la membrana externa [20]	+1,5	0,025	5,6	21,6
3501	Bla [19]	Hidrólisis de enlace betalactámico en antibióticos [19] Respuesta a antimicrobiano [20]	+1,5	0,004	5,5	28,8
4501	GpmA [19]	Glucogénesis [20]	+1,5	0,056	5,9	28,0
7501	YrbF [19]	Transportador hipotético ABC [19]	+1,5	0,007	6,3	28,1
7502	SuhB [19]	Actividad catalítica [20]	+1,5	0,035	6,5	29,6

Tabla 2. Proteínas de *E. coli* O157:H7 expresadas diferencialmente expuestas a tratamiento IONP@Ib-M1 con respecto al control.

* El p-valor resulta luego de hacer el Anova y test de Bonferroni. NR Proteínas no reportadas de acuerdo con peso molecular (MW) y punto isoeléctrico (pI).

Al igual que con el tratamiento con Ib-M1, se obtuvo la expresión significativa de la proteína identificada como Bla (β -lactamasa), la cual está asociada a la biosíntesis de molibdoptérica, hexamerización de proteínas e hidrólisis de enlaces betalactámicos en antibióticos [24]. Así mismo, se obtuvo expresión significativa de LolA, la cual es una chaperona periplasmática que interviene en la síntesis de lipoproteínas de membrana externa, proceso que es dependiente de ATP [28]. La proteína identificada como GpmA hace parte de proteínas que participan en el transporte de aminoácidos y el metabolismo en respuesta a estrés de tetraciclina y hexabromociclododecano (HBCD) [29]. La proteína identificada como YrbF se conoce que está involucrada en la regulación de fosfolípidos en la membrana externa de bacterias Gram-negativas, con el objetivo de formar y expulsar vesículas al medio externo como factor de virulencia y, así mismo, intercambiar componentes de la superficie celular [30]. Igualmente, la proteína está relacionada con funciones como actividad catalítica, transportador hipotético ABC y respuesta a antimicrobiano [20]. Haciendo uso de la herramienta en línea STRING V11.0, no se obtuvo interacción entre las posibles proteínas identificadas, sin embargo, esto no necesariamente implica que no se trate de proteínas biológicamente significativas, solo que aún no se conocen otras interacciones.

En la figura 7 se muestra el resultado de la exposición de *E. coli* O157:H7 a IONPs a una concentración de 235,93 μ g/mL. Las manchas de proteínas se encuentran en todo el rango de pH de la tira IPG y los pesos moleculares de las manchas se distribuyen a lo largo de todo el gel.

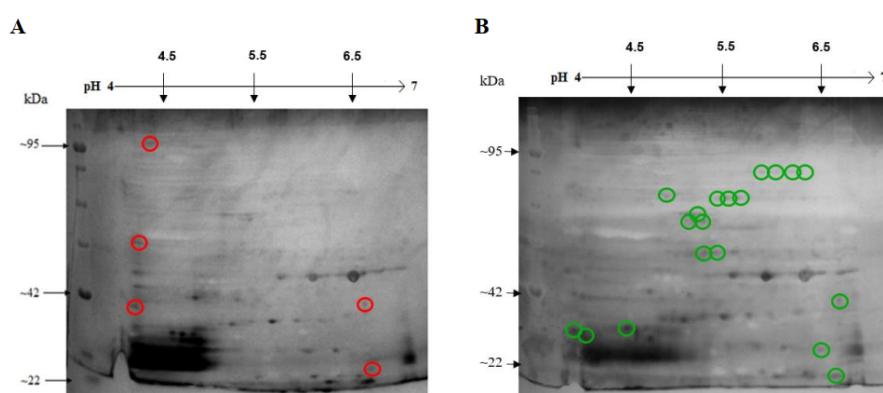


Figura 7. (A) Mapa bidimensional del proteoma control de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación. (B) Mapa bidimensional del proteoma control de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación con IONPs. Los círculos rojos evidencian manchas inhibidas bajo tratamiento y los círculos verdes son manchas expresadas bajo tratamiento.

Como resultado de la exposición de *E. coli* O157:H7 bajo el tratamiento con IONPs, se obtuvo un total de 55 puntos de proteínas; cinco se inhibieron con respecto al control, 20 se expresaron en relación con el control, 13 tuvieron una sobreexpresión $\geq 1,5$ y nueve una inhibición $\leq 1,5$. Este resultado puede deberse a la interacción electrostática entre las nanopartículas catiónicas y las membranas aniónicas del patógeno [31]. De aquellas proteínas que estuvieron presentes tanto en el perfil de proteínas control como en el perfil de proteínas del tratamiento con IONPs, 6 presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), las cuales se muestran en la figura 8.

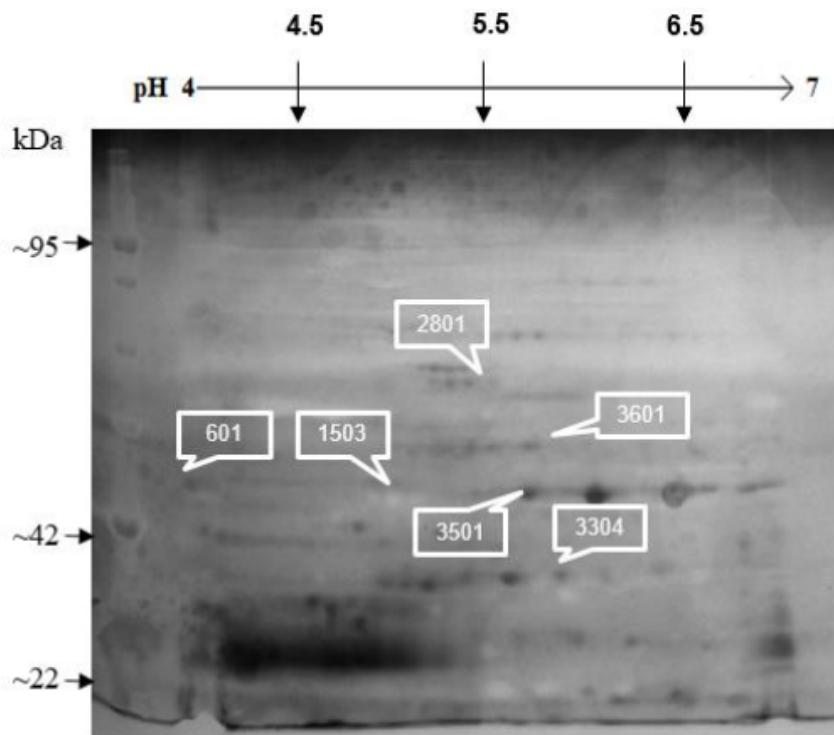


Figura 8. Mapa bidimensional del proteoma de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación con tratamiento IONPs. Se encuentran enmarcadas aquellas proteínas que estuvieron presentes tanto en el perfil de proteínas control como en el perfil de proteínas del tratamiento con IONPs y que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Después de identificar los patrones de expresión se realizó la aproximación a la identificación de las proteínas expresadas y aquellas que presentaron diferencias estadísticamente significativas. La posible identificación de las proteínas se lista en la tabla 3.

Spot	Possible proteína	Función molecular / proceso biológico	Expresión diferencial	*p-valor	pI	MW
601	Usg [19]	Proceso biosintético de aminoácidos celulares [20]	+1,5	0,057	4,0	29,2
2801	MalE [19]	Transporte de membrana de maltosa [19], químiotaxis celular, respuesta celular a estímulo de daño ADN [20]	+1,5	0,015	5,2	40,8
3304	LolA [19]	Participa en la translocación de lipoproteínas de la membrana interna a la membrana externa [20]	+1,5	0,000	5,6	21,6
3501	Bla [19]	Hidrolisis de enlace betalactámico en antibióticos [19] Respuesta a antibiótico [20]	+1,5	0,004	5,5	28,8
3601	TrxB [19]	Eliminación de radicales superóxido [20]	+1,5	0,013	5,5	34,0
1503	NR	NR	+1,5	0,024	4,8	27,9

Tabla 3. Proteínas de *E. coli* O157:H7 expresadas diferencialmente expuestas a tratamiento IONPs con respecto al control.

* El p-valor resulta luego de hacer el Anova y test de Bonferroni. NR Proteínas no reportadas de acuerdo con peso molecular (MW) y punto isoeléctrico (pI).

Una de las proteínas con expresión diferencial es Usg, esta hace parte del complejo acetil coenzima A carboxilasa (ACC), así mismo, está relacionada con el control de la traducción del ARNm uniéndose a una horquilla probable en el extremo 5' del ARNm, inhibiendo la traducción [20]. Además, se obtuvo la sobreexpresión de la proteína identificada como MalE, la cual es una proteína periplásmica de unión a maltosa (MalE o MBP) requerida en bacterias Gram-negativas para el transporte de maltosa y maltodextrinas y para quimiotaxis hacia estos sustratos, también se ha encontrado que esta se expresa a un alto nivel en consecuencia de shock osmótico [32]. Al igual que en el tratamiento con el Ib-M1, se obtuvo la sobreexpresión significativa de proteínas como Bla, TrxB y LolA como lo obtenido en el tratamiento IONP@Ib-M1 cuya función es mencionada anteriormente. Haciendo uso de la herramienta en línea STRING V11.0, se obtuvo que esta red tiene una interacción entre las proteínas LolA y trxB.

En la figura 9 se muestra el resultado de la exposición de *E. coli* O157:H7 a IONP@ a una concentración de 235,93 μ g/mL. Las manchas de proteínas se encuentran en todo el rango de pH de la tira IPG y los pesos moleculares de las manchas se distribuyen a lo largo de todo el gel.

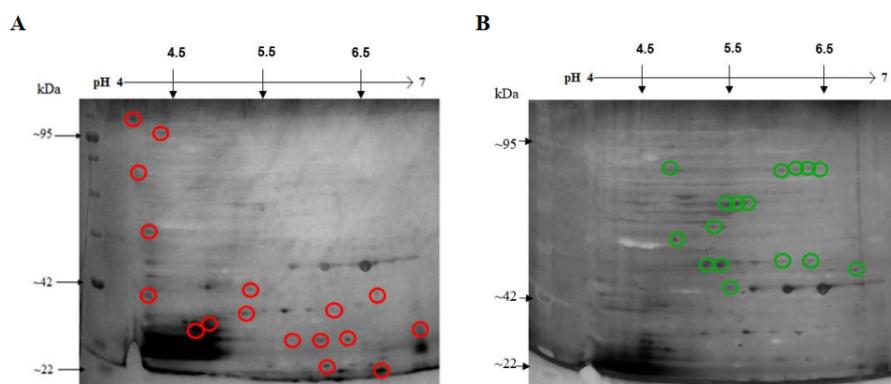


Figura 9. (A) Mapa bidimensional del proteoma control de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación. (B) Mapa bidimensional del proteoma control de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación con IONP@. Los círculos rojos evidencian manchas inhibidas bajo tratamiento y los círculos verdes son manchas expresadas bajo tratamiento.

Como resultado de la exposición de *E. coli* O157:H7 bajo el tratamiento con IONP@, se obtuvo un total de 37 puntos de proteínas; 19 se inhibieron con respecto al control, 16 se expresaron en relación con el control, 9 tuvieron una sobreexpresión $\geq 1,5$ y 2 una inhibición $\leq 1,5$. De aquellas proteínas que estuvieron presentes tanto en el perfil de proteínas control como en el perfil de proteínas del tratamiento con IONP@, 4 presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) como se muestra en la figura 10.

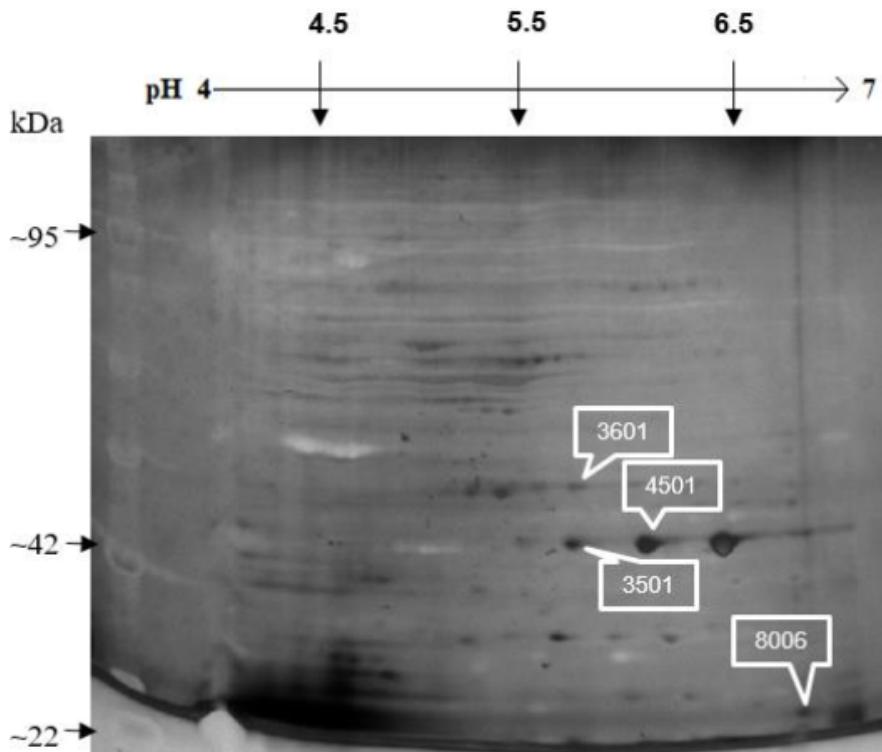


Figura 10. Mapa bidimensional del proteoma de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de 9 h de incubación con tratamiento IONP@. Se encuentran enmarcadas aquellas proteínas que estuvieron presentes tanto en el perfil de proteínas control como en el perfil de proteínas del tratamiento con IONP@ y que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Después de identificar los patrones de expresión se realizó la aproximación a la identificación de las proteínas expresadas y aquellas que presentaron diferencias estadísticamente significativas. La posible identificación de las proteínas se lista en la tabla 4.

Spot	Possible proteína	Función molecular / proceso biológico	Expresión diferencial	*p-valor	pI	MW
3501	Bla [19]	Hidrólisis de enlace betalactámico en antibióticos [19] Respuesta a antibiótico [20]	+1,5	0,000	5,5	28,8
3601	TrxB [19]	Eliminación de radicales superóxido [20]	+1,5	0,000	5,5	34,0
4501	GpmA [19]	Glucogénesis [20]	+1,5	0,001	5,9	28,0
8006	NR	NR	+1,5	0,004	6,7	11,0

Tabla 4. Proteínas de *E. coli* O157:H7 expresadas diferencialmente expuestas a tratamiento IONP@ con respecto al control.

* El p-valor resulta luego de hacer el Anova y test de Bonferroni. NR Proteínas no reportadas de acuerdo con peso molecular (MW) y punto isoelectrónico (pI).

Al igual que en el tratamiento con el Ib-M1, se obtuvo la sobreexpresión significativa de proteínas como Bla, TrxB y GpmA, cuyas funciones fueron mencionadas anteriormente. Haciendo uso de la herramienta en línea STRING V11.0, no se obtuvo interacción entre las posibles proteínas identificadas, sin embargo, esto no necesariamente indica que no se trate de proteínas biológicamente significativas, solo que aún no se conocen otras interacciones.

CONCLUSIONES

En este estudio se realizó el análisis proteómico comparativo bajo los diferentes tratamientos de antimicrobianos, como lo son Ib-M1, IONP@Ib-M1, IONPs y IONP@; el cual reveló un total de 72 proteínas. La expresión diferencial permitió determinar cambios relacionados con funciones como quimiotaxis, síntesis y mantenimiento de proteínas de membrana externa, procesos de óxido-reducción, crecimiento celular, protección contra toxicidad de biomoléculas, transporte de aminoácidos e inhibición de traducción. Estos hallazgos determinan un primer paso de mecanismos de acción de estos antimicrobianos alternativos, así mismo, se confirman las ventajas de análisis proteómicos sobre estrategias para identificar en futuros estudios proteínas clave en respuesta al estrés.

REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de Salud, “Organización Mundial de Salud”, 2020. [En línea]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.
- [2] N. Amigo, Q. Zhang, A. Amadio, Q. Zhang, W. Silvia, B. Cui, Z. Chen, M. Larzabal, J. Bei & A. Cataldi, “Overexpressed Proteins in Hypervirulent Clade 8 and Clade 6 Strains of *Escherichia coli* O157:H7 Compared to *E. coli* O157:H7 EDL933 Clade 3 Strain”, Vol 11(11), Plos One, 2016.
- [3] E. Seker y F. Kus, “The prevalence, virulence factors and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 in feces of adult ruminants slaughtered in three provinces of Turkey”, Veterinarski Arhiv, Vol 89(1), pp. 107-121, 2019.
- [4] M. Semreen, M. El-Gamal, S. Abdin, H. Alkhazraji, L. Kamal, S. Hammad, F. El-Awady, D. Waleed & L. Kourbaj, “Recent updates of marine antimicrobial peptides”, Saudi Pharmaceutical Journal, Vol 26(3), pp. 1-14, 2018
- [5] D. Ciuman, H. Gong, X. Hu & J. Lu, “Membrane targeting cationic antimicrobial peptides”, Journal of Colloid and Interface Science, Vol 537(1), pp. 163-185, 2019
- [6] R. Tailor, D. Acland, S. Attenborough, B. Cammue, I. Evans, R. Osborn, J. Ray, S. Rees & W. Broekaert, “A Novel Family of Small Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Seed of *Impatiens balsamina* Ls Derived from a Single Precursor Protein”, The Journal of Biological Chemistry, Vol 272(39), pp. 24480-24487, 1997.
- [7] J. Flórez, M. Perullini, M. Jobbággy & H. Cano, “Enhancing Antibacterial Activity Against *Escherichia coli* K-12 of Peptide Ib-AMP4 with Synthetic Analogues”, International Journal of Peptide Research and Therapeutics, Vol 20, pp. 365-369, 2014.
- [8] S. Prada, J. Flórez, A. Farfán, F. Guzmán & I. Hernández, “Antimicrobial activity of Ib-M peptides against *Escherichia coli* O157: H7”, Plos One, Vol 15(2), pp. 1-12, 2020.
- [9] J. Ropero, N. Ardila, P. Hernández & J. Flórez, “Immobilization of Ib-M2 peptide on core@shell nanostructures based on SPION nanoparticles and their antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7”, Applied Surface Science, vol. 515, 2020.
- [10] W. Li, S. Zhang, X. Wang, J. Yu, Z. Li, W. Lin & X. Lin, “Systematically integrated metabonomic-proteomic studies of *Escherichia coli* under ciprofloxacin stress”, Journal of Proteomics, Vol 179 pp 61-70, 2018.
- [11] E. Velasco, S. Wang, M. Sanet, J. Fernández, D. Jové, E. Glaria, A. Valledor, T. O'Halloran & C. Balsalobre, “A new role for Zinc limitation in bacterial pathogenicity: modulation of α -hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli*”, Scientific Reports, Vol 8 (6535 pp 1-11, 2018.
- [12] M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, Analytical Biochemistry, Vol 72, pp. 248-254, 1976.
- [13] CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition, West Valley Road, 2015.
- [14] Bio-Rad Laboratories, ReadyPrep Protein Extraction kit (Total protein), 2000.
- [15] Bio-Rad Laboratories, RC DC Protein Assay. Instruction manual, 2000.
- [16] Bio-Rad Laboratories, ReadyPrep TM. 2-D Starter Kit. Catalog Number 163-2105, 2000.

- [17] H. Blum, H. Beier & H. Gross, "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels", *Electrophoresis*, Vol 8 (2), pp. 93-99, 1987.
- [18] J. Cruz, C. Ortiz, R. Fernández & R. Torres, "Antimicrobial Peptides: Promising Compounds Against Pathogenic Microorganisms", *Current Medicinal Chemistry*, Vol 21 (20), pp 2299-2321, 2014.
- [19] Kaist, "EcoProDB. E. coli Protein Database", 2006. [En línea]. Available: <http://eocoli.kaist.ac.kr/view?name=YtfQ>.
- [20] Uniprot, 2020. [En línea]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprot/P08390>.
- [21] A. Muok, A. Briegel & B. Crane, "Regulation of the chemotaxis histidine kinase CheA: A structural perspective", *BBA - Biomembranas*, Vol 1862 (1) pp 1-12, 2020.
- [22] S. Kozmin & R. Schaaper, "Genetic characterization of moaB mutants of *Escherichia coli*", *Research in Microbiology*, Vol 164 (7), pp. 689-694, 2013.
- [23] C. Nivol & S. Leimkühler, "Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, Vol 1827 (8-9), pp. 1086-1101, 2013.
- [24] K. Champion, J. Nishihara, J. Joly & D. Arnott, "Similarity of the *Escherichia coli* proteome upon completion of different biopharmaceutical fermentation processes", *Proteomics*, Vol 1(9), pp. 1133-1148, 2001.
- [25] S. Ghafourian, N. Sadeghifard, S. Soheili & Z. Sekawi, "Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology", *Current Issues in Molecular Biology*, Vol 17, pp. 11-21, 2015.
- [26] S. Máttar y P. Martínez, "Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología", *Infectio*, Vol 11 (1), pp. 23-35, 2007.
- [27] Z. Khan, A. Rehman, M. Nisar, S. Zafar & I. Zerr, "Biosorption behavior and proteomic analysis of *Escherichia coli* P4 under cadmium stress", *Chemosphere*, Vol 174, pp. 136-147, 2017.
- [28] P. Murahari, S. Anishetty & G. Pennathur, "Understanding the lid movements of LolA in *Escherichia coli* using molecular dynamics simulation and in silico point mutation", *Computational Biology and Chemistry*, Vol 47, pp. 71-80, 2013.
- [29] M. Yang, H. Qin, W. Wang, H. Zhang, Y. Long & J. Ye, "Global proteomic responses of *Escherichia coli* and evolution of biomarkers under tetracycline stress at acid and alkaline conditions", *Science of the Total Environment*, Vol 627, pp. 1315-1326, 2018.
- [30] F. Zingl, P. Kohl, F. Cakar, Z. Guan, J. Reidl & S. Schild, "Outer Membrane Vesiculation Facilitates Surface Exchange and In Vivo Adaptation of *Vibrio cholerae*", *Cell Host & Microbe*, Vol 27 (2), pp. 1-13, 2020.
- [31] J. Panyam, D. Williams, A. Dash, D. Leslie & V. Labhsetwar, "Solid-state Solubility Influences Encapsulation and Release of Hydrophobic Drugs From PLGA/PLA Nanoparticles", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 93 (7), pp. 1804-1814, 2004.
- [32] E. Dassa & P. Lambert, "Activity of protein MalE (maltose-binding protein) fused to cytoplasmic and periplasmic regions of an *Zhherichkz* coli inner membrane protein", *Research in Microbiology*, Vol 148(5), pp. 389-395, 1997.
- [33] H. Zhu, M. Bilgin & M. Snyder, "Proteomics", *Biochem*, Vol 72, pp. 783-812, 2003.
- [34] R. Horler, A. Müller, D. Williamson, J. Potts, K. Wilson & G. Thomas, "Furanose-specific Sugar Transport. Characterization of a bacterial galactofuranosa-binding protein", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 248 (45) pp 31156-31163, 2009.
- [35] I. Seong, J. Oh, J. Lee, K. Tanaka & C. Chung, "The HslU ATPase acts as a molecular chaperone in prevention of aggregation of SulA, an inhibitor of cell division in *Escherichia coli*", *FEBS Letters*, Vol 477 (3), pp. 224-228, 2000.
- [36] M. Park, C. Hill, Y. Li, K. Hardy, H. Khanna, Y. Khang & F. Raushel, "Catalytic properties of the PepQ prolidase from *Escherichia coli*", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol 429 (2), pp. 224-230, 2004.
- [37] M. Han, "Exploring the proteomic characteristics of the *Escherichia coli* B and K-12 strains in different cellular compartments", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol 122 (1) pp 1-9, 2015.

- [38] C. Tseng, "Regulation of fumarase (fumB) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, iron and heme availability: role of the *arcA*, *fur*, and *hemA* gene products", FEMS Microbiology Letters, Vol 157 (1), pp. 67-72, 1997.