

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA DE
***Escherichia coli* BL21 (DE3)**

SILVIA XIMENA VÁSQUEZ DALLOS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2015

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA DE
Escherichia coli BL21 (DE3)**

SILVIA XIMENA VÁSQUEZ DALLOS

**Trabajo de Grado presentado como requisito
Para optar al título de Bióloga**

Director

Jorge Hernández Torres

Ph.D.

Co-Tutor

Oriana Danuta Serna Daza

Bióloga

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2015

DEDICATORIA

Este trabajo, está dedicado especialmente a mis padres, Jorge Eliecer Vásquez García y María del Pilar Dallos Suárez, y a mi hermana Jurleth Paola Vásquez Dallos. Gracias a ustedes por educarme y haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Gracias por su acompañamiento en todos estos años de estudio, dándome su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos más difíciles. Sencillamente ustedes son la base de mi vida y eternamente les estaré agradecida por el mejor ejemplo de superación y entrega para que hoy pueda ver alcanzada mi meta.

Mil palabras no bastarían para agradecerles todo lo que hacen por mí y espero contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

Los amo infinitamente.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por poner en mi vida personas valiosas que me hacen crecer personal y profesionalmente, como mis maestros y amigos de biología que durante estos años de estudio me hicieron amar más mi carrera.

Un agradecimiento especial al profesor Jorge Hernández Torres, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia, por permitirme hacer parte de su equipo de trabajo, creer y confiar en mí en los momentos difíciles. Gracias a Oriana Serna Danuta por sus consejos y acompañamiento durante el trabajo en el laboratorio.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. OBJETIVOS.....	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	18
2. MATERIALES Y METODOS.....	19
2.1.1 Condiciones de cultivo.	20
2.1.2 Determinación de la concentración de cobre óptima que induce la actividad catecol oxidasa.	20
2.1.3 Efecto de la concentración de cobre sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	20
2.1.4 Efecto del pH y la temperatura en la actividad catecol oxidasa	20
2.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR RECOMBINANTE pET_CueO-1.5.	21
2.2.1 Diseño de oligonucleótidos	21
2.2.2 Clonación de <i>cueO</i> en el vector pET-21d (+).	21
2.3 SOBREEXPRESIÓN HOMÓLOGA DE <i>cueO</i> Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA EN FRACCIONES CELULARES.	22
2.3.1 Determinación de la concentración de proteínas	22
2.3.2 Determinación de la actividad enzimática y de la actividad específica.	22
2.3.3 Electroforesis desnaturalizante de proteínas (SDS-PAGE).	23
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	23
3. RESULTADOS.....	24
3.1 EVIDENCIA DE UNA ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA ENDÓGENA, EN <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	24
3.1.1 Incremento de la actividad catecol oxidasa con iones Cu^{2+}	24

3.1.2 Tolerancia de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) al crecimiento con cobre.	25
3.1.3 Valoración cualitativa del (los) producto(s) de la reacción.	26
3.1.4 Efecto del pH y la temperatura en la actividad catecol oxidasa.	27
3.1.5 Búsqueda bioinformática de enzimas con actividad fenol oxidasa en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	29
3.2 CueO COMO RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA.	29
3.2.1 Construcción del vector recombinante pET_CueO-1.5.	29
3.3 SOBREENPRESIÓN HOMÓLOGA DE <i>cueO</i> Y EL INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA.	32
3.3.1 Actividad catecol oxidasa en sobrenadante y periplasma.	32
3.3.2 Actividad específica de CueO sobreexpresada en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	34
3.3.3 Perfil de proteínas periplásmicas en geles SDS-PAGE.	35
4. DISCUSIÓN.	36
5. CONCLUSIONES.	39
BIBLIOGRAFÍA.	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividad específica de CueO en periplasma. Se calculó la actividad específica de extractos de periplasma de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada con pET_CueO-1.5, 6 h de inducción/no inducción con 0.4 mM IPTG. La actividad catecol oxidasa fue monitoreada mediante el incremento en la A_{540nm} (5 mM $CuSO_4$ y 5 mM catecol), hasta agotamiento del sustrato.....	34
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Expresión de la actividad catecol oxidasa en sobrenadantes de *E. coli* BL21 (DE3), en función del cobre en el medio de cultivo. La actividad de cuantificó como el $\Delta A_{540nm} / t$25
- Figura 2. Crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) en medio SOB suplementado con 1, 5, 10, 20 y 30 mM CuSO₄. El tiempo cero equivale al momento de la adición del CuSO₄ cuando $A_{600nm} = 1$26
- Figura 3. Cambio de coloración de un sobrenadante de 24 h (5 mM CuSO₄) después de 10 min de adición de catecol. Izquierda: sobrenadante de cultivo con catecol, t=0. Derecha: el mismo sobrenadante con 5 mM catecol como sustrato, t=10 min.27
- Figura 4. Influencia del pH en la actividad catecol oxidasa.28
- Figura 5. Influencia de la temperatura en la actividad catecol oxidasa a 27 y 70°C. Condiciones de la reacción: sobrenadantes de 24 h de cultivo con 5 mM CuSO₄, pH = 8.5, registro de ΔA_{540nm} por 10 min después de adición de 5 mM catecol.28
- Figura 6. Mapa de restricción del plásmido recombinante pET_CueO-1.5. El gen *cueO* (en rojo) fue clonado en los sitios de restricción Nco I y Hind III del vector pET-21d (+). El codón AUG quedó a 10 pb del sitio de unión al ribosoma y el codón stop es el mismo del gen *cueO*.30
- Figura 7. Traducción del gen *cueO* amplificado por PCR y clonado en pET-21d (+). El marco de lectura abierto de 1551 pb codifica para una proteína de 516 aminoácidos y un peso molecular de 56.6 kDa. En recuadro negro: segundo aminoácido mutado Q→E (4 CAA>GAA). En azul oscuro: oligonucleótidos diseñados. En celeste: sitios de unión al cobre. Realizado con el programa Geneious® V. 7.0.31
- Figura 8. Actividad catecol oxidasa de sobrenadantes y periplasma de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET_CueO-1.5, a 6 h de inducción

con IPTG. El CuSO_4 se adicionó al medio de reacción, 20 min antes de agregar el catecol. Se usó el vector pET-21d (+) no recombinante como control.32

Figura 9. SDS-PAGE de pET_CueO-1.5. Separación en gel 12% SDS-PAGE de las proteínas de la fracción periplásmica de *E. coli* BL21 (DE3), transformada con pET_CueO-1.5. Carril 1: A 1 h de inducción con 0.4 mM IPTG; Carril 2: A 3 h de inducción; Carril 3: A 6 h de inducción; Carril 4: pET-21d (+); Carril 5: Marcador, *Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific, USA).35

LISTA DE ABREVIATURAS

Significado	Abreviatura
Actividad específica.....	AE
Absorbancia.....	A
Delta de absorbancia.....	ΔA
Densidad óptica.....	OD
Horas.....	h
KiloDaltons.....	kDa
Nanometros.....	nm
Milimolar.....	mM
Minuto.....	min
Pares de bases.....	pb
Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	PCR
Revoluciones por minuto.....	rpm
Unidades enzimáticas.....	U

RESUMEN

TITULO:

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA DE *Escherichia coli* BL21 (DE3)*

AUTOR:

VÁSQUEZ DALLOS, Silvia Ximena**

PALABRAS CLAVES:

Catecol oxidasa, *Escherichia coli* BL21 (DE3) y catecol.

Descripción

En extractos crudos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) se detectó una actividad catecol oxidasa periplásmica, estimulada por la presencia de cobre. Con base en la literatura científica vigente y a los hallazgos preliminares de dicha actividad se le atribuyó en primera instancia a la oxidasa multicobre CueO. Para demostrarlo, en el presente trabajo el gen *cueO* fue clonado y sobre-expresado con el vector pET-21d (+), en *E. coli* BL21 (DE3). Se caracterizó la actividad catecol oxidasa *in vitro*, y se determinaron la influencia del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática. Como resultado se confirmó que la multicobre oxidasa CueO es la responsable de la actividad catecol oxidasa observada en los extractos crudos de *E. coli* BL21 (DE3). Esta enzima es activada por la presencia de iones Cu^{2+} a una concentración de 5 mM, además, es termoestable y muestra su mayor actividad *in vivo* en el periplasma a pH 8.5. Se calculó el rendimiento enzimático en extractos crudos de periplasma para pET_CueO-1.5, después de 6 h de inducción con IPTG dando como resultado una actividad enzimática de 2.7 U/mg. CueO podría ser una lacasa bacteriana modelo para el estudio de la evolución de la estructura de las lacasas dado que cumple con condiciones como: su sobreexpresión es abundante en *E. coli*, no requiere de modificaciones post-traduccionales y es resistente a la degradación por proteasas de *E. coli*.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. y Co-Tutor: Oriana Datuna Serna, Bióloga.

ABSTRACT

TITLE:

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION CATECHOL OXIDASE ACTIVITY OF *Escherichia coli* BL21 (DE3)*

AUTHOR:

VÁSQUEZ DALLOS, Silvia Ximena**

Keywords: catecol oxidase, *Escherichia coli* BL21 (DE3) and catecol.

Description

In crude extracts of *Escherichia coli* BL21 (DE3) a periplasmic catechol oxidase activity, stimulated by the presence of copper was detected. Based on the current scientific literature and the preliminary findings of this activity was attributed in the first instance to the presence of multicopper oxidase CueO. To demonstrate this, in this assignmet the cueO gene was cloned and over-expressed using vector pET-21d (+) in *E. coli* BL21 (DE3). As a result it was confirmed that multicopper oxidase CueO is responsible for the observed in crude extracts of *E. coli* BL21 (DE3) catechol oxidase activity. This enzyme is activated by the presence of Cu²⁺ ions at a concentration of 5 mM, in addition, it is heat stable and shows its greater activity in vivo in the periplasm to pH 8.5. The enzymatic yield was calculated in crude extracts of periplasm for pET_CueO-1.5, after 6 h of IPTG induction resulting in an enzymatic activity of 2.7 U / mg. CueO may be a bacterial laccase model for the study of the evolution of the laccases structure due it meets conditions like its: overexpression which is abundant in *E. coli*, it does not require post-translational modifications and it is resistant to degradation by proteases *E. coli*.

*Degree work,

**Science faculty, Department of Biology. Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. and Co-Tutor: Oriana Datuna Serna, Bióloga.

INTRODUCCIÓN

Las Multicobre Oxidasas (MCOs) son una amplia y diversa familia de metaloenzimas, de las cuales hacen parte las lacasas, las ascorbato oxidasas y las bilirrubina oxidasas (Sakurai y Kataoka, 2007). Los miembros de esta familia están ampliamente distribuidos en bacterias, hongos, plantas e insectos (Hoegger *et al.*, 2006; Baldrian, 2006; Sakurai y Kataoka, 2007). Las MCOs dirigen electrones desde un sustrato reductor al oxígeno molecular, para producir agua. En estas reacciones intervienen tres centros de cobre (T1, T2 y T3) con diferentes propiedades espectroscópicas y funcionales (Roberts *et al.*, 2002). La transferencia de electrones está bien explicada (Djoko *et al.*, 2010), pero se conoce relativamente poco sobre sus amplios roles fisiológicos que incluyen pigmentación, morfogénesis, desintoxicación, degradación de la lignina, biosíntesis de antibióticos, esporulación, tolerancia al cobre, oxidación de manganeso y oxidación de hierro (Mayer y Staples, 2002; Rensing y Grass, 2003; Huston *et al.*, 2002). Sin embargo, pocas de sus funciones han sido suficientemente demostradas experimentalmente (Rensing y Grass, 2003).

El Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología (UIS) está en la búsqueda de una lacasa modelo para estudios sobre la evolución estructural de las lacasas. En cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) detectamos una actividad catecol oxidasa extracelular, objeto de estudio en este Trabajo de Grado. Una exploración exhaustiva en las bases de datos del genoma de *E. coli* y experimentos adicionales nos permitieron concluir que la única enzima con actividad catecol oxidasa sería la lacasa CueO. Hasta la fecha, se considera que esta MCO periplásmica tiene como función la regulación de los niveles internos de cobre y la neutralización de sus efectos tóxicos, en condiciones aeróbicas (Grass y Rensing, 2001).

El cobre es un metal necesario para la actividad de muchas enzimas fisiológicamente importantes, en forma de cofactor en reacciones redox o en la producción de especies radicales como OH, por medio de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton (Cerpa *et al.*, 2005; Gaetke y Chow, 2003). No obstante, en las bacterias, los excesos de cobre causan daños en los fosfolípidos y las enzimas, y pueden atacar las bases del ADN (preferiblemente guanina) o romper los enlaces fosfodiéster de ADN cadena simple, por modificación de los azúcares de desoxirribosa (Solioz y Stoyanov, 2003). Además, ocasionan daño peroxidativo de los lípidos, produciendo cambios en la fluidez y permeabilidad de las membranas (Mattie y Freedman, 2001).

CueO reúne todas las propiedades de una lacasa: presenta tres sitios de unión al cobre (T1, T2 y T3), tiene tres dominios dos de ellos (T1 y T3) cupredoxina y oxida sustratos convencionales como el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico), el DMP (2,6-dimetoxifenol) y la siringaldazina (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído azino) (Kataoka *et al.*, 2007; Reiss *et al.*, 2013). En el presente Trabajo de Grado se reporta la caracterización bioquímica de la actividad catecol oxidasa de sobrenadante o de periplasma de *E. coli* BL21 (DE3) y se aportan evidencias que permiten concluir que CueO es la enzima responsable de dicha actividad oxidasa.

COMPETENCIAS DE LA PASANTIA DE INVESTIGACIÓN

1. Realiza todos los procedimientos para el cultivo y mantenimiento de la cepa *E. coli* BL21 (DE3).
2. Determina la actividad enzimática de la catecol oxidasa de *E. coli* BL21 (DE3) con sobrenadantes de cultivos.
3. Adquiere destrezas en la caracterización bioquímica de una enzima.
4. Implementa las técnicas básicas de Biología Molecular.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bioquímicamente la actividad catecol oxidasa de *Escherichia coli* BL21 (DE3).

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Demostrar la actividad catecol oxidasa endógena de *E. coli* BL21 (DE3) y su activación por el cobre.
- Evaluar el efecto del pH y la temperatura en la actividad catecol oxidasa de sobrenadantes de cultivos inducidos con cobre en concentración óptima.
- Proponer una proteína de *E. coli* BL21 (DE3) como directa responsable de la actividad catecol oxidasa con base en la información genómica y proteómica disponible.
- Aportar evidencia experimental de la relación entre la proteína candidata y la actividad catecol oxidasa.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA ENDÓGENA DE LA CEPA *E. coli* BL21 (DE3).

2.1.1 Condiciones de cultivo. Los precultivos de *E. coli* BL21 (DE3) siempre fueron incubados en medio SOB (Sambrook y Russell., 2001) a 37°C, con agitación permanente (200 rpm) hasta alcanzar una OD_{600nm} = 1.0.

2.1.2 Determinación de la concentración de cobre óptima que induce la actividad catecol oxidasa. Fracciones de cultivo de cada tiempo monitoreado fueron centrifugadas a 5000 g durante 5 min. Se recuperaron los sobrenadantes y se les registró la actividad catecol oxidasa (5 mM catecol), mediante el incremento de la absorbancia a OD_{540nm} (Bahl *et al.*, 2013) usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-VIS, por 10 min a temperatura ambiente.

2.1.3 Efecto de la concentración de cobre sobre el crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3). Luego de inducir cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) (OD_{600nm} = 1.0) mediante la adición de 1, 5, 10, 20 y 30 mM final de CuSO₄, el crecimiento bacteriano fue monitoreado midiendo el incremento de la absorbancia a OD_{600nm}, tras 0, 6, 12, 18 y 24 h de inducción.

2.1.4 Efecto del pH y la temperatura en la actividad catecol oxidasa. Se preparó una mezcla de reacción que contenía 1.5 ml de sobrenadante de cultivo, 5 mM catecol y 0,1 M de buffer a los siguientes intervalos de pH: buffer acetato de sodio pH 3, buffer acetato de sodio pH 4.5, buffer fosfato de sodio pH 6, buffer fosfato de sodio pH 7.5, buffer Tris-HCl pH 8.5 y buffer Glicina-NaOH pH 10 (Sambrook y Russell., 2001). El efecto de la temperatura sobre la actividad catecol oxidasa fue registrado a 27°C y 70°C, monitoreando el incremento de la absorbancia a OD_{540nm} con un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-VIS, con sistema de recirculación de agua.

2.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR RECOMBINANTE pET_CueO-1.5.

2.2.1 Diseño de oligonucleótidos. Con base en la secuencia nucleotídica del gen *cueO* de *E. coli* BL21 (DE3) alojada en Genbank (número de acceso, CAQ30638.1), se diseñaron los oligonucleótidos CueOFN y CueORH, con el fin de amplificar específicamente el marco de lectura abierto:

CueOFN: 5'-**CCATGG**AACGTCGTGATTTCTTAAAATATTCCGT-3'

CueORH: 5'-**AAGCTT**TTTATACCGTAAACCCTAACATCATCCC-3'.

CueOFN contiene un sitio Nco I en el extremo 5' (en color rojo) y CueORH contiene un sitio Hind III en el extremo 3' (en color azul). Subrrayado se destacan los codones de inicio y terminación.

2.2.2 Clonación de *cueO* en el vector pET-21d (+). ADN genómico de *E. coli* BL21 (DE3) extraído mediante el protocolo de Ausubel *et al.* (1992) fue usado para la amplificación por PCR del gen *cueO*, usando los oligonucleótidos CueOFN y CueORH. La reacción de PCR se inició con una desnaturalización a 95°C por 2 min, seguida de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 66°C por 1 min y 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 5 min (termociclador Esco™). El producto de 1551 pb fue clonado en el vector pGEM-T easy (Promega), dando lugar al vector recombinante pG_CueO-1.5. Posteriormente, 5 µg de pG_CueO-1.5 fueron digeridos con las enzimas de restricción NcoI y Hind III y el fragmento de 1.5 kb fue recuperado usando una columna de purificación del kit de purificación de PCR GeneJet™ (Thermo Scientific, USA), siguiendo las instrucciones del manual del usuario. El vector pET-21d (+) (Novagen) fue digerido con las enzimas de restricción Nco I y Hind III, y ligado con el fragmento Nco I – Hind III de 1.5 kb. Para corroborar la correcta inserción, el plásmido pET_CueO-1.5 fue digerido con las enzimas de restricción Nco I y Hind III, y los productos de la digestión fueron visualizados en un gel 0.8 % agarosa coloreado con EZ-Vision III® (Amresco,

USA). Finalmente, se verificó la integridad de la secuencia del marco de lectura del gen *cueO*, mediante secuenciación (Macrogen Inc). Los protocolos de manipulación de ADN se basaron en el manual de Sambrook y Russell (2001).

2.3 SOBREEXPRESIÓN HOMÓLOGA DE *cueO* Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA EN FRACCIONES CELULARES.

Células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con el plásmido pET_CueO-1.5 mediante tratamiento con CaCl₂, según el protocolo propuesto por Sambrook y Russell (2001). *E. coli* BL21 (DE3), transformada con el plásmido pET_CueO-1.5, fue cultivada en 80 ml de medio SOB con 100 µg/ml ampicilina, a 37°C y agitación constante, hasta alcanzar una OD_{600nm} = 0.6. Las células fueron recuperadas mediante centrifugación a 5000 g por 5 min a 4°C, se resuspendieron en 80 ml de medio SOB fresco y se incubaron a 37°C con agitación constante, hasta alcanzar una OD_{600nm} = 0.6. La expresión fue inducida mediante adición de 0.4 mM IPTG. Alícuotas de 20 ml de cultivo fueron recuperadas a 0, 1, 3 y 6 h después de inducción. De cada alícuota se efectuó la separación de las fracciones de medio y periplasma. Los métodos del punto 2.3 se efectuaron según los protocolos recomendados por Novagen para el sistema pET (10th Ed.).

2.3.1 Determinación de la concentración de proteínas. La concentración de proteína total (mg/ml) en los extractos crudos o fracciones se determinó mediante el micro-ensayo de Bradford (1976), propuestas en el manual de Ausubel *et al.*, (1992). Como proteína de referencia se usó Albúmina de Suero Bovino (BSA).

2.3.2 Determinación de la actividad enzimática y de la actividad específica. La actividad enzimática fue monitoreada en las muestras de sobrenadante de cultivo y fracción periplásmica de *E. coli* BL21 (DE3) mediante incremento en la absorbancia a OD_{540nm} durante 10 min. La mezcla de reacción a un volumen final de 3 ml contenía: buffer acetato de sodio pH 8.5, 1,5 ml de las fracciones de

sobrenadante o de periplasma, 5 mM CuSO₄ y 5 mM catecol. En el caso de la sobreexpresión homóloga de *cueO*, el medio de reacción se preincubó con 5 mM CuSO₄ durante 20 min a temperatura ambiente, para facilitar la activación de la enzima. Las reacciones se llevaron a cabo a un pH de 8.5 y a temperatura ambiente.

Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de catecol en 1 min. Para el cálculo de la actividad enzimática se tuvo en cuenta el tiempo de estabilización de la reacción (asíntota horizontal), como indicador del agotamiento del sustrato.

La actividad específica se calculó con base en el número de unidades enzimáticas por mg de proteína de la fracción periplásmica.

2.3.3 Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS-PAGE). Los extractos de proteínas se separaron por electroforesis desnaturizante en geles 12% SDS-PAGE, de acuerdo con el protocolo sugerido en el manual de Ausubel *et al.*, (1992).

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

En el estudio de la caracterización bioquímica de la actividad catecol oxidasa, se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio con tres repeticiones de cada método. De cada uno de los resultados, se calcularon los valores medios de las unidades enzimáticas con sus correspondientes errores estándar. Las variables cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas; por lo tanto, se analizaron mediante una prueba de análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Todas las pruebas estadísticas mencionadas anteriormente se analizaron utilizando el programa R (R Development Core Team, 2008) y se consideró un valor de significancia $p < 0.05$.

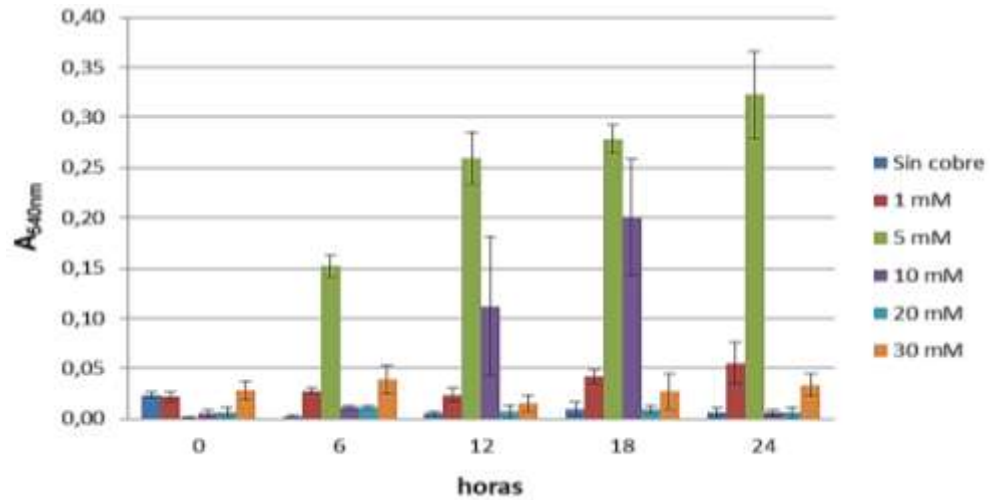
3. RESULTADOS

3.1 EVIDENCIA DE UNA ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA ENDÓGENA, EN *E. coli* BL21 (DE3).

En la búsqueda de una lacasa bacteriana modelo (datos no mostrados), se detectó una actividad catecol oxidasa en extractos crudos de *E. coli* JM109 y BL21 (DE3). Dada la posibilidad de expresión de genes recombinantes en *E. coli* BL21 (DE3), se eligió esta cepa para la caracterización de la actividad enzimática encontrada.

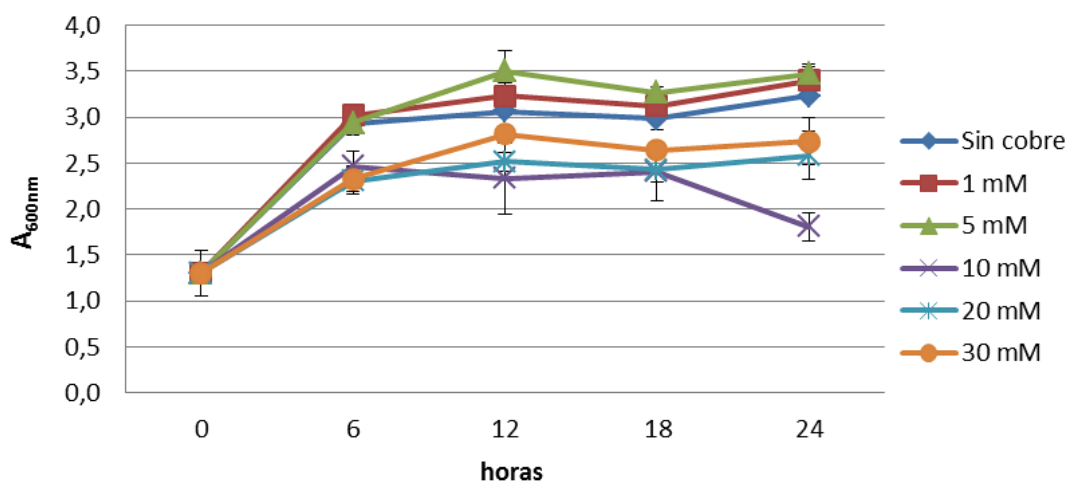
3.1.1 Incremento de la actividad catecol oxidasa con iones Cu^{2+} . En experimentos preliminares, se había notado que la actividad catecol oxidasa se magnificaba con la presencia de iones cobre en el medio de cultivo. Por esta razón, se hizo crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) con diferentes concentraciones de cobre y se monitoreó la actividad catecol oxidasa de sobrenadantes de cultivos en función del tiempo. El efecto inductor del cobre se evidencia en la Figura 1. La mayor actividad catecol oxidasa se observó en el sobrenadante con 5 mM CuSO_4 a 24 h de adición (barra verde). En cambio, 10 mM CuSO_4 mostró un efecto inhibitorio a 24 h (barra morada) y concentraciones ≥ 20 mM tuvieron un efecto inhibitorio total. Se constató que el sobrenadante de cultivo sin cobre (control negativo) no presentó actividad. El análisis de varianza para las diferentes concentraciones de cobre mostró diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$). Se concluyó que la presencia de iones Cu^{2+} es indispensable para la expresión de la actividad catecol oxidasa.

Figura 1. Expresión de la actividad catecol oxidasa en sobrenadantes de *E. coli* BL21 (DE3), en función del cobre en el medio de cultivo. La actividad de cuantificó como el $\Delta A_{540nm} / t$.



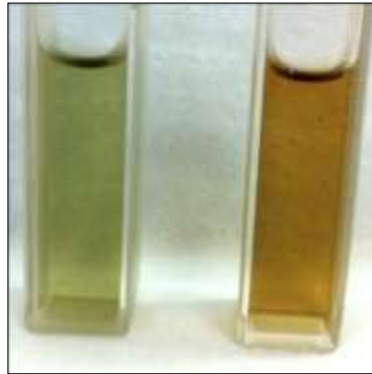
3.1.2 Tolerancia de *E. coli* BL21 (DE3) al crecimiento con cobre. El crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) fue monitoreado durante las anteriores pruebas de catecol oxidasa en sobrenadantes. En la Figura 2, se observan los cambios en A_{600nm} en función del tiempo de incubación. El análisis de varianza mostró un crecimiento significativo ($p < 0.05$) para los tratamientos con 1 mM, 5 mM y sin cobre ($\Delta A_{600nm} \geq 3.2$). El crecimiento bacteriano no fue significativo en las concentraciones de cobre más altas, lo que refleja un umbral de inhibición del cobre por encima de 5 mM. Se concluyó que *E. coli* muestra tolerancia a la presencia de iones Cu^{2+} en valores ≤ 5 mM; concentraciones superiores tienen un efecto inhibitorio del crecimiento.

Figura 2. Crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) en medio SOB suplementado con 1, 5, 10, 20 y 30 mM CuSO₄. El tiempo cero equivale al momento de la adición del CuSO₄ cuando A_{600nm} = 1.



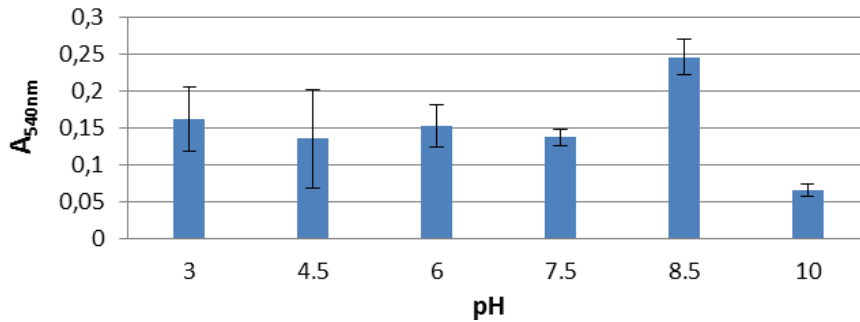
3.1.3 Valoración cualitativa del (los) producto(s) de la reacción. Los productos de la actividad catecol oxidasa han sido previamente caracterizados (Jeon *et al.*, 2010). Se registró el cambio de coloración del medio de reacción con 5 mM CuSO₄ a 24 h, transcurridos 10 min después de la adición de 5 mM catecol (Figura 3). El color marrón es similar al observado previamente en reacciones con catecol como sustrato y la lacasa de *Trametes versicolor* como catalizador. Por la tonalidad de color, es posible especular que el producto sea la o-benzoquinona (Sun *et al.*, 2013) y eventualmente un polifenol (Jeon *et al.*, 2010). De esta manera, se reafirma que en el sobrenadante del cultivo se encuentra la actividad oxidativa del catecol.

Figura 3. Cambio de coloración de un sobrenadante de 24 h (5 mM CuSO₄) después de 10 min de adición de catecol. Izquierda: sobrenadante de cultivo con catecol, t=0. Derecha: el mismo sobrenadante con 5 mM catecol como sustrato, t=10 min.



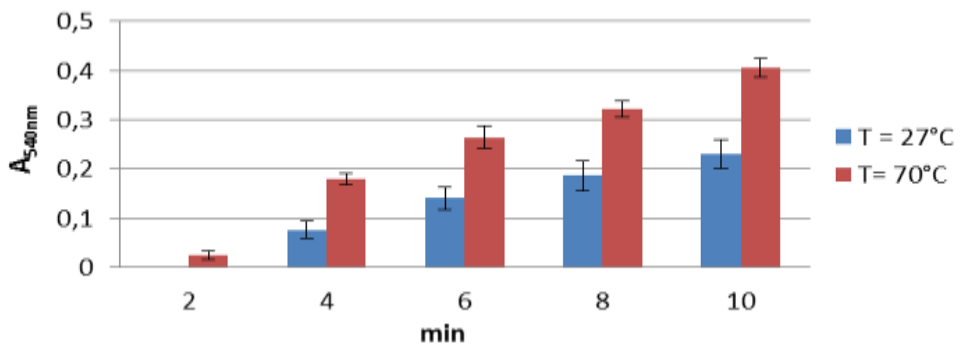
3.1.4 Efecto del pH y la temperatura en la actividad catecol oxidasa. Con el fin de contribuir a la identificación de la enzima responsable de oxidar el catecol, se evaluó el efecto del pH y de la temperatura en la actividad catalítica. Por esta razón, se evaluó la actividad catecol oxidasa de sobrenadantes a 24 h de cultivo (5 mM CuSO₄) a los siguientes valores de pH: 3, 4.5, 6, 7.5, 8.5 y 10. Después de 10 min de adición de 5 mM catecol y registro los cambios en la $A_{540\text{ nm}}$, el sobrenadante con pH 8.5 mostró la mayor actividad ($p < 0.05$), en comparación con los pH ácidos que no mostraron un comportamiento significativo. Como se puede deducir de la Figura 4, para la oxidación del catecol, la enzima responsable tiene un pH óptimo alcalino en el orden de 8.5.

Figura 4. Influencia del pH en la actividad catecol oxidasa.



Por otra parte, se evaluó la influencia de la temperatura en la actividad catecol oxidasa de los sobrenadantes. En particular, dado que las lacasa tienen un nivel alto de termoestabilidad (Claus, 2004; Kataoka *et al.*, 2007), se quiso determinar la resistencia de la enzima en estudio a una temperatura de 70°C (Figura 5). Se observó que la actividad oxidativa no se vio afectada a 70° C en relación con el control (27°C). Por el contrario, los valores de actividad en función del tiempo fueron mayores a 70°C (barra roja) que a 27°C ($p < 0.05$), lo que permite concluir que la enzima parece ser termoestable y manejar valores óptimos de temperatura altos.

Figura 5. Influencia de la temperatura en la actividad catecol oxidasa a 27 y 70°C. Condiciones de la reacción: sobrenadantes de 24 h de cultivo con 5 mM CuSO₄, pH = 8.5, registro de ΔA_{540nm} por 10 min después de adición de 5 mM catecol.



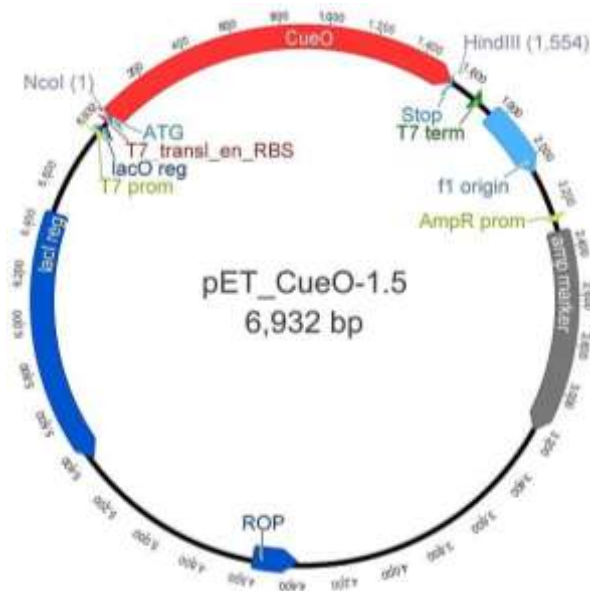
3.1.5 Búsqueda bioinformática de enzimas con actividad fenol oxidasa en *E. coli* BL21 (DE3). Con el propósito de encontrar enzimas con actividad fenol oxidasa en *E. coli* BL21 (DE3), se hicieron búsquedas exhaustivas en el genoma de esta bacteria en las bases de datos Genbank, EMBL y Swissprot. El genoma de *E. coli* BL21 (DE3) ha sido totalmente secuenciado y registrado en Genbank bajo el número de acceso AM946981. Los análisis bioinformáticos revelaron la existencia de una única enzima MCO con número de acceso CAQ30638.1 (*multicopper oxidase with role in copper homeostasis*). En la abundante literatura científica, esta enzima ha sido caracterizada como lacasa, bajo el nombre de CueO (Outten *et al.*, 2000; Grass y Rensing, 2001; Roberts *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2004; Grass *et al.*, 2004). Siendo la única enzima dependiente de cobre y con actividad oxidasa, exploramos la posibilidad de atribuir la actividad catecol oxidasa encontrada, a CueO.

3.2 CueO COMO RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA.

En los experimentos anteriores, se demostró que *E. coli* BL21 (DE3) sí ostenta una actividad catecol oxidasa y que esta actividad podría ser atribuida a multicobre oxidasa CueO. Por esta razón, decidimos sobreexpresar el gen *cueO* y evaluar el efecto de esta sobreexpresión sobre la capacidad de oxidar el catecol.

3.2.1 Construcción del vector recombinante pET_CueO-1.5. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *cueO* por PCR (ver M&M), de tal manera que el marco de lectura abierto tuviera en sus extremos sitios de restricción Nco I (5') y Hind III (3') que permitiera su expresión. Usando ADN de *E. coli* BL21 (DE3) como molde, se amplificó un fragmento de ~1.5 kb. El producto de la amplificación se clonó en el vector pGEM- T easy™ y se subclonó en pET-21d (+) digerido con las enzimas de restricción Nco I y Hind III, dando como resultado el plásmido recombinante pET_CueO-1.5 (Figura 6).

Figura 6. Mapa de restricción del plásmido recombinante pET_CueO-1.5. El gen *cueO* (en rojo) fue clonado en los sitios de restricción Nco I y Hind III del vector pET-21d (+). El codón AUG quedó a 10 pb del sitio de unión al ribosoma y el codón stop es el mismo del gen *cueO*.



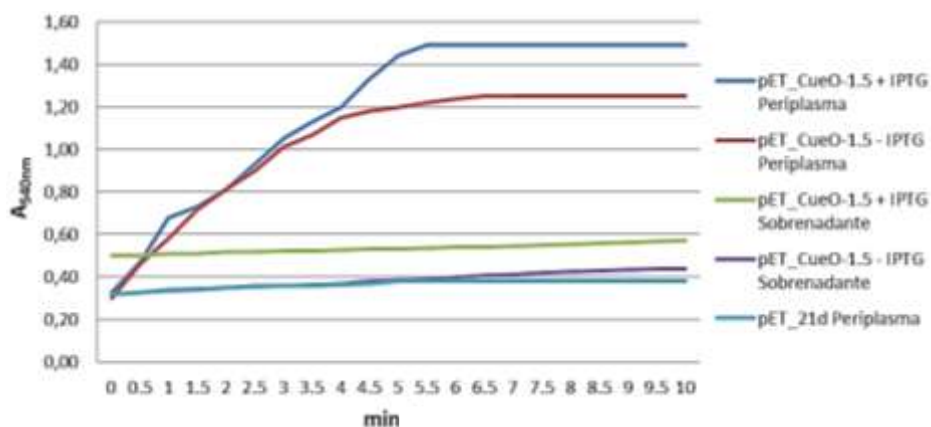
Durante el diseño de los oligonucleótidos y la construcción del vector pET_CueO-1.5, se tuvo la precaución de no alterar el marco de lectura original del gen *CueO*, a excepción del segundo aminoácido Q (Gln) por E (Glu) (Figura 7).

3.3 SOBREEXPRESIÓN HOMÓLOGA DE *cueO* Y EL INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD CATECOL OXIDASA

En conformidad con la literatura científica, está plenamente establecido que la proteína CueO –cuya función es regular los niveles internos de cobre– es de localización periplásmica. Por lo tanto, las nuevas pruebas de actividad catecol oxidasa se realizaron con muestras de sobrenadante de cultivo y fracción periplásmica de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pET_CueO–1.5.

3.3.1 Actividad catecol oxidasa en sobrenadante y periplasma. En la Figura 8 se muestra la actividad catecol oxidasa reflejada en el incremento en la A_{540nm} , de muestras de sobrenadante y periplasma de *E. coli* BL21 (DE3), transformada con el plásmido pET_CueO–1.5 e inducida con IPTG.

Figura 8. Actividad catecol oxidasa de sobrenadantes y periplasma de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET_CueO–1.5, a 6 h de inducción con IPTG. El $CuSO_4$ se adicionó al medio de reacción, 20 min antes de agregar el catecol. Se usó el vector pET-21d (+) no recombinante como control.



En la Figura 8 es claramente visible un incremento de la $A_{540\text{nm}}$ en las nuevas condiciones experimentales. Es importante aclarar que el CuSO_4 se adicionó directamente al medio de reacción, 20 min antes de agregar el sustrato, a fin de activar la enzima. Este ajuste al método garantizó que el cobre no estuviera presente durante los cultivos y por lo tanto no habría lugar a la inducción de la actividad catecol oxidasa por iones Cu^{2+} (gen *cueO* endógeno), durante el crecimiento exponencial de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET_CueO-1.5.

Se puede observar en la Figura 8, que la fracción periplásmica con pET_CueO-1.5 alcanzó un valor máximo de actividad a los 5.5 min ($\Delta A_{540\text{nm}} = 1.49$), en relación con los demás tratamientos. Interesantemente, la fracción periplásmica con pET_CueO-1.5 sin inducción con IPTG mostró una sobreexpresión del gen (máx $\Delta A_{540\text{nm}} = 1.25$ a 6.5 min). Este inesperado hallazgo sugiere una expresión basal, un tanto anómala, del gen recombinante sin la adición del inductor. Como puede verse en la Figura 8, el control con sólo el plásmido pET-21d (+) no recombinante tiene cero actividad. Este control demuestra bien que la actividad detectada no corresponde a la expresión del gen *cueO* endógeno de *E. coli* BL21 (DE3), si a una expresión basal no inducida de pET_CueO-1.5, probablemente por la composición de nutrientes del medio de cultivo SOB (ver discusión). En conclusión, tomados en conjunto todos los resultados, podemos afirmar que la actividad catecol oxidasa proviene de la enzima multicobre oxidasa CueO.

Finalmente, es de destacar que los valores de actividad fueron mayores en periplasma que en los sobrenadantes (Figura 8). Este resultado confirma que la enzima sí es periplásmica, pero también se secreta al medio de cultivo, tema que será discutido más adelante.

3.3.2 Actividad específica de CueO sobreexpresada en *E. coli* BL21 (DE3). La enzima CueO ha sido sobreexpresada en diversas ocasiones (Kim *et al.*, 2001; Kataoka *et al.*; 2007; Su *et al.*, 2014); sin embargo, son escasos los reportes de actividad específica de extractos crudos de *E. coli* BL21 (DE3) (Kim *et al.*, 2001) y ninguno con catecol como sustrato. Dado que contamos con los valores de concentración de proteína periplásmica, nos dimos a la tarea de calcular la actividad específica de CueO periplásmica (Tabla 1). Los extractos de periplasma arrojaron una actividad específica de 2.7 U/mg para pET_CueO–1.5, después de 6 h de inducción con IPTG y 1.17 U/mg, sin inducción. Como se puede apreciar en la Tabla 1, la actividad específica del extracto periplásmico sin inducción con IPTG alcanza el 43% del inducido, cifra bastante elevada. Como se vio anteriormente, la actividad de extractos de periplasma de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET-21d (+) es igual a cero. Por consiguiente, se concluye que los valores de actividad específica concuerdan con la hipótesis de una expresión basal exagerada.

Tabla 1. Actividad específica de CueO en periplasma. Se calculó la actividad específica de extractos de periplasma de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET_CueO–1.5, 6 h de inducción/no inducción con 0.4 mM IPTG. La actividad catecol oxidasa fue monitoreada mediante el incremento en la A_{540nm} (5 mM $CuSO_4$ y 5 mM catecol), hasta agotamiento del sustrato.

Ensayos	Tiempo Asíntota	U/ml	Proteína mg/ml	AE (U/mg)
pET_CueO–1.5 + IPTG	5.5 min	3.6	1.3	2.70
pET_CueO–1.5 – IPTG	6.5 min	3.0	2.6	1.17

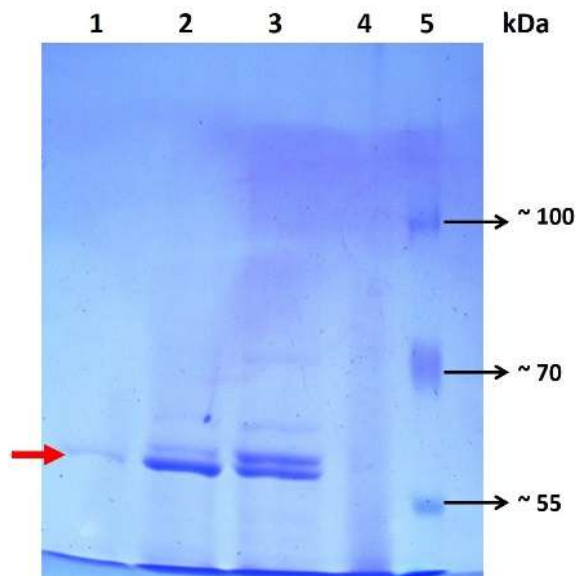
Una unidad enzimática (1 U) corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μ mol de catecol en 1 min a 27°C.

U: Unidades enzimáticas.

AE: Actividad específica.

3.3.3 Perfil de proteínas periplásmicas en geles SDS-PAGE. El perfil de proteínas de la fracción periplásmica de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET_CueO-1.5 a 1, 3 y 6 h de inducción con IPTG se muestra en la Figura 9. Se evidenció una banda cercana a 56 kDa (flecha roja). Esta banda es visible únicamente en los carriles 1 al 3 y su grosor aumenta con el tiempo. En el carril 4 (*E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET-21d (+)), no se observa ninguna banda. Desafortunadamente no contamos con anticuerpos para revelar la presencia de CueO mediante *western blot*, pero es tentador especular que la banda señalada podría tratarse de CueO.

Figura 9. SDS-PAGE de pET_CueO-1.5. Separación en gel 12% SDS-PAGE de las proteínas de la fracción periplásmica de *E. coli* BL21 (DE3), transformada con pET_CueO-1.5. Carril 1: A 1 h de inducción con 0.4 mM IPTG; Carril 2: A 3 h de inducción; Carril 3: A 6 h de inducción; Carril 4: pET-21d (+); Carril 5: Marcador, *Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific, USA).



4. DISCUSIÓN

El laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología de la UIS ha venido trabajando en el estudio de la evolución de la estructura de las lacasas (Hernández *et al.*, 2006; Revollo *et al.*, 2012). Para demostrar las hipótesis que se han propuesto, se requiere de una lacasa bacteriana modelo que cumpla con los siguientes criterios: 1) Que la sobreexpresión sea abundante en *E. coli*. 2) Que no requiera de modificaciones post-traduccionales. 3) Que sea resistente a la degradación por proteasas y 4) Con una prueba de actividad que facilite su detección. Las lacasas fúngicas tienen altos potenciales rédox (Xu *et al.*, 1996) pero son muy difíciles de sobreexpresar en *E. coli* por la ausencia de modificaciones post-traduccionales (Piscitelli *et al.*, 2010).

En este estudio se detectó una actividad catecol oxidasa en *E. coli* BL21 (DE3), la cual no ha sido previamente caracterizada. Todos los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a que es la lacasa CueO la responsable de esta actividad. Esta conclusión se basa en los siguientes argumentos: 1) Quedó demostrado que la enzima es dependiente de cobre para su función (Figura 1). Se sabe que CueO utiliza iones Cu^{2+} como cofactores para la transferencia de electrones al oxígeno (Gaetke y Chow, 2003). 2) CueO se expresa como respuesta a altas concentraciones de cobre, en condiciones aeróbicas (Outten *et al.*, 2000 y Rensing *et al.*, 2000). 3) Las búsquedas bioinformáticas en el genoma de *E. coli* BL21 (DE3), arrojaron un único gen con características estructurales y funcionales de una oxidasa multicobre. 4) CueO es periplásmica y aunque no se hizo una exploración profunda de la ubicación subcelular de la catecol oxidasa, la enzima es abundante en la fracción periplásmica (Figura 8). 5) Se ha demostrado que CueO es estable a temperaturas de $\sim 70^\circ\text{C}$ (Kim *et al.*, 2001) e incluso mayores (Kataoka *et al.*, 2007), con una vida media de 5 h a 70°C . Nuestros experimentos de actividad a 70°C mostraron que la catecol oxidasa logra mantener su actividad

a esta temperatura (Figura 5). 6) La influencia del pH en los parámetros cinéticos de CueO con 2,6-dimethoxyphenol (DMP) como sustrato mostraron dos picos óptimos de actividad a pH 5-6 (alto) y 8 (más bajo) (Roberts *et al.*, 2003). Nuestros resultados son compatibles con este reporte, sólo que el pico más alto con catecol como sustrato ocurre a pH 8.5 (Figura 4). 7) CueO tiene un peso molecular calculado de 56 kDa (Kim *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2002; Ruijssenaars y Hartmans, 2004; Sevcenco *et al.*, 2009). Desafortunadamente no contamos con anticuerpos anti-CueO para determinar cuál de las bandas podría corresponder a CueO en los geles SDS-PAGE. Sin embargo, sí aparecen proteínas en ese rango de peso molecular, que incrementan su expresión después de la inducción con IPTG (Figura 9). La sobreexpresión del gen *cueO* incrementó la actividad catecol oxidasa con respecto a la no inducida con IPTG (Tabla 1). Esta prueba resulta definitiva para concluir que se le puede atribuir la actividad catecol oxidasa a CueO.

Según Singh *et al.*, (2004); Grass y Rensing, (2001) y Kim *et al.*, (2001), la proteína CueO tiene una amplia gama de sustratos típicos de las multicobre oxidasas. No se ha caracterizado la actividad catecol oxidasa de CueO con la profundidad con que se realizó este trabajo. No obstante, sí existe un único reporte de su empleo en una exploración de los mejores sustratos, en el cual el catecol es de los sustratos menos específicos (Kataoka *et al.*, 2007). Desafortunadamente, no contamos con valores de actividad específica de extractos de periplasma con catecol, pero sí podemos decir que son netamente superiores a los extractos crudos de *E. coli* con ABTS como sustrato (Kim *et al.* 2001).

Interesantemente, la actividad catecol oxidasa de CueO fue encontrada inicialmente en sobrenadante y posteriormente en periplasma (Figura 8). Durante el diseño de la construcción del plásmido pET_CueO-1.5 tuvimos especial cuidado de que CueO permaneciera en su forma nativa (sin señales secretorias),

bien a pesar de un único cambio aminoacídico (Figura 7). Así pues, la presencia de la actividad catecol oxidasa en el periplasma de *E. coli* es, por así decirlo, biológicamente auténtica. Las proteínas de periplasma equivalen solo al 4–16% de la proteína total de *E. coli* y CueO hace parte de ellas (Quan *et al.*, 2013). Las señales para la exportación de CueO al periplasma han sido previamente sugeridas (Grass y Rensing, 2001), pero nada se dice sobre su secreción al medio. Una explicación plausible podría ser que la CueO detectada provenga de detritos celulares o de células que han sufrido ruptura por choque osmótico o proteasas que han liberado el contenido periplásmico. No obstante no se debería descartar una posible secreción de la enzima para contrarrestar externamente los efectos tóxicos del cobre.

Otro punto importante que llama la atención es la expresión basal tan pronunciada del plásmido pET_CueO–1.5 sin inducción con IPTG. Normalmente, se asume que los vectores de última generación de la serie pET (Novagen) garantizan una represión total del gen recombinante, en ausencia del inductor. Sin embargo, la composición del medio de cultivo, en particular el incremento de los niveles de AMPc, podría influenciar la expresión de los genes recombinante regulados por el promotor Lac y conducir a una desrepresión del sitio operador (Grossman *et al.*, 1998). De hecho, la adición de glucosa al medio de cultivo podría ser una solución sencilla y eficaz, según las recomendaciones del fabricante y puestas a prueba con proteínas recombinantes expresadas sin inducción (Mahmoudi *et al.*, 2012).

5. CONCLUSIONES

Se demostró que la actividad catecol oxidasa endógena de *E. coli* BL21 (DE3) es activada por 5 mM CuSO₄, con un pH óptimo de 8.5 y una temperatura óptima de 70°C.

En base a los resultados obtenidos de la caracterización de la actividad catecol oxidasa y la sobreexpresión del gen *cueO* dicha actividad se atribuye a la multicobre oxidasa CueO

CueO podría ser una lacasa bacteriana modelo para el estudio de la evolución de la estructura de las lacasas dado que cumple con las condiciones establecidas por el Laboratorio de Biología Molecular.

BIBLIOGRAFÍA

AUSUBEL, Frederick., BRENT, Roger., KINGSTON, Robert., MOORE, David., SEIDMAN, J., SMITH, John. y STRUHL, Kevin Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. Greene publishing associates and Jhon Wiley & Sons, New York, 1992, vol. 232.

BAHL, Vanndita., KAPOOR, Parth., TYAGI, Prasadhi. y SHARMA, Kameshwar Enzymatic determination of Catechol oxidase and Protease from fruits (orange, apple) and vegetables (carrot, tomato). Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS). March - April, 2013, vol 5, no 5, p. 29–35.

BALDRIAN, Petr Fungal laccases—occurrence and properties. FEMS microbiology reviews. November, 2005, vol. 30, no 2, p. 215-242.

BALLA, Jozsef., KISS, Tamas. y JAMESON, Reginald Copper (II)-catalyzed oxidation of catechol by molecular oxygen in aqueous solution. Inorganic Chemistry. October, 1992, vol. 31, no 1, p. 58-62.

BRADFORD, Marion A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. January, 1976, vol. 72, no 1, p. 248-254.

CERPA, Waldo., VARELA, Lorena., REYES, Ariel., MINNITI, Alicia. y INESTROSA, Nibaldo Is there a role for copper in neurodegenerative diseases?. Molecular Aspects of Medicine, 2005, vol. 26, no 4, p. 405-420.

CLAUS, Harald Laccases: structure, reactions, distribution. Micron, 2004, vol. 35, no 1, p. 93-96

DJOKO, Karrera., CHONG, Lee., WEDD, Anthony. y XIAO, Zhiguang Reaction mechanisms of the multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli* support its functional role as a cuprous oxidase. Journal of the American Chemical Society. January, 2010, vol. 132, no 6, p. 2005-2015.

GAETKE, Lisa. y CHOW, Ching Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology. 2003, vol. 189, no 1, p. 147-163.

GRASS, Gregor. y RENSING, Christopher CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications. July, 2001, vol. 286, no 5, p. 902-908.

GRASS, Gregor., THAKALI, Keshari., KLEBBA, Philip., THIEME, Daniel., MÜLLER, Axel., WILDNER, Günter. y RENSING, Christopher Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. September, 2004, vol. 186, no 17, p. 5826-5833.

GROSSMAN, Trudy., KAWASAKI, Ernest., PUNREDDY, Sandhya. y OSBURNE, Marcia Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. Gene. 1998, vol. 209, no 1, p. 95-103.

HERNÁNDEZ-TORRES, Jorge., RODRÍGUEZ-BUITRAGO, Jhon. y CHOMILIER, Jacques Hydrophobic Cluster Analysis (HCA) revela la existencia de isoformas de baja identidad de lacasas (EC 1.10. 3.2) en 7 phyla de bacteria. Actualidades Biológicas. December, 2006, vol. 28, no 85, p. 101-114.

HOEGGER, Patrik., KILARU, Sreedhar., JAMES, Timothy., THACKER, Jason. y KÜES, Ursula Phylogenetic comparison and classification of laccase and related

multicopper oxidase protein sequences. Federation of European Biochemical Societies Journal. March, 2006, vol. 273, no 10, p. 2308-2326.

HUSTON, Wilhelmina., JENNINGS, Michael. y MCEWAN, Alastair The multicopper oxidase of *Pseudomonas aeruginosa* is a ferroxidase with a central role in iron acquisition. Molecular Microbiology. June, 2002, vol. 45, no 6, p. 1741-1750.

JEON, Jong., KIM, Eun., MURUGESAN, Kumarasamy., PARK, Hyo., KIM, Young., KWON, Jung., KIM, Wang., LEE, Ji, y CHANG, Yoon Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo-or hetero-polymer synthesis. Microbial Biotechnology. September, 2009, vol. 3, no 3, p. 324-335.

KATAOKA, Kunishige., KOMORI, Hirofumi., UEKI, Yusaku., KONNO, Yusuke., KAMITAKA, Yuji., KUROSE, Shinji., TSUJIMURA, Seiya., HIGUCHI, Yoshiki., KANO, Kenji., SEO, Daisuke. y SAKURAI, Takeshi Structure and function of the engineered multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli*—deletion of the methionine-rich helical region covering the substrate-binding site. Journal of Molecular Biology. July, 2007, vol. 373, no 1, p. 141-152.

KIM, Chulhwan., LORENZ, Walter., HOOPEES, Todd. y DEAN, Jeffrey Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* yacK gene. Journal of Bacteriology. March, 2001, vol. 183, no 16, p. 4866-4875.

MAHMOUDI, Shima., ABTAHI, Hamid., BAHADOR, Abbas., MOSAYEBI, Ghasem., SALMANIAN, Ali. y TEYMURI, Mostafa Optimizing of nutrients for high level expression of recombinant streptokinase using pET32a expression system. Maedica. September, 2012, vol. 7, no 3, p. 241.

MATTIE, Michael. y FREEDMAN, Jonathan Protective effects of aspirin and vitamin E (α -tocopherol) against copper-and cadmium-induced toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. June, 2001, vol. 285, no 4, p. 921-925.

MAYER, Alfred. Y STAPLES, Richard Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. January, 2002, vol. 60, no 6, p. 551-565.

OUTTEN, Wayne., OUTTEN, Caryn., HALE, Jeremy. y O'HALLORAN, Thomas Transcriptional Activation of an *Escherichia coli* Copper Efflux Regulon by the Chromosomal MerR Homologue, CueR. *Journal of Biological Chemistry*. July, 2000, vol. 275, no 40, p. 31024-31029.

PISCITELLI, Alessandra., PEZZELLA, Cinzia., GIARDINA, Paola., FARACO, Vincenza. y GIOVANNI, Sannia Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioengineered bugs*. July, 2010, vol. 1, no 4, p. 254-264.

QUAN, Shu., HINIKER, Annie., COLLET, Jean. y BARDWELL, James A Bacterial Cell Surfaces: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. 2013, vol. 966, p. 358–366.

REISS, Renate., IHSEN, Julian., RICHTER, Michael., EICHHORN, Eric., SCHILLING, BORIS. y THÖNY, Linda Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *PloS one*. June, 2013, vol. 8, no 6, p. e65633.

RENSING, Christopher., FAN, Bin., SHARMA, Rakesh., MITRA, Bharati. y ROSEN, Barry CopA: an *Escherichia coli* Cu (I)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. January, 2000, vol. 97, no 2, p. 652-656.

RENSING, Christopher y GRASS, Gregor *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. Federation of European Biochemical Societies Microbiology reviews. April, 2003, vol. 27, no 2-3, p. 197-213.

REVOLLO, Enrique., SERNA, Oriana. y HERNÁNDEZ-TORRES, Jorge Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: Demostración de actividad lacasa en dos aislados de Tsukamurella sp y Cellulosimicrobium sp. Revista Colombiana de Biotecnología. December, 2012, vol. 14, no 2, p. 70-80.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

ROBERTS, Sue., WEICHSEL, Andrzej., GRASS, Gregor., THAKALI, Keshari., HAZZARD, James., TOLLIN, Gordon., RENSING, Christopher y MONTFORT, William Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences. December, 2001, vol. 99, no 5, p. 2766-2771.

ROBERTS, Sue., WILDNER, Günter., GRASS, Gregor., WEICHSEL, Andrzej., AMBRUS, Attila., RENSING, Christopher. y MONTFORT, William A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. Journal of Biological Chemistry. August, 2003, vol. 278, no 34, p. 31958-31963.

RUIJSSENAARS, Harald. y HARTMANS, Robert A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. Applied microbiology and biotechnology. February, 2004, vol. 65, no 2, p. 177-182.

SAKURAI, Takeshi. y KATAOKA, Kunishige Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *The Chemical Record*. 2007, vol. 7, no 4, p. 220-229.

SAMBROOK, Joseph. y RUSSELL, David *Molecular cloning*. New York: Cold spring harbor laboratory press. 2001, 3 rd, ed.

SEVCENCO, Ana., KRIJGER, Gerard., PINKSE, Martijin., VERHAERT, Peter., HAGEN, Wilfred. y HAGEDOORN, Peter Development of a generic approach to native metalloproteomics: application to the quantitative identification of soluble copper proteins in *Escherichia coli*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. February, 2009, vol. 14, no 4, p. 631-640.

SINGH, Satish., GRASS, Gregor., RENSING, Christopher. y MONTFORT, William Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. November, 2004, vol. 186, no 22, p. 7815-7817.

SOLIOZ, Marc. y STOYANOV, Jivko Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *Federation of European Microbiological Societies microbiology reviews*. May, 2003, vol. 27, no 2-3, p. 183-195.

SU, Jianmei., DENG, Lin., HUANG, Liangbo., GUO, Shujin., LIU, Fan. y HE, Jin Catalytic oxidation of manganese (II) by multicopper oxidase CueO and characterization of the biogenic Mn oxide. *Water research*. March, 2014, vol. 56, p. 304-313.

SUN, Xuejiao., BAI, Rubing., ZHANG, Ya., WANG, Qiang., FAN, Xuerong., YUAN, Jiugang., LI, Cui. y WANG, Ping Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenolic Compounds. *Applied biochemistry and biotechnology*. June, 2013, vol. 171, no 7, p. 1673-1680.

XU, Feng., SHIN, Woon-sup., BROWN, Stephen., WAHLEITHNER, Jill., SUNDARAM, Uman. y SOLOMON, Edward A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology*. September, 1996, vol. 1292, no 2, p. 303-311.

ZENG, Jun., LIN, Xiangui., ZHANG, Jing., LI, Xuanzhen. y WONG, Ming Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the bacterial laccase CueO from *E. coli*. *Applied microbiology and biotechnology*. December, 2011, vol. 89, no 6, p. 1841-1849.