

*Autora: Suzi Almeida Vasconcelos Barboni
 Bióloga da Fundação Hemocentro Brasília (DF)
 (Ex-aluna do curso de Licenciatura em Ciências*

Habilitação em Biologia - UEFS)

Curso: Mestrado em Biologia Molecular

Instituição: Universidade de Brasília (UnB)

Área de Concentração: Engenharia Genética

*Título da Dissertação: Expressão do gene de α -amilase de *Bacillus subtilis*
 em *Escherichia coli* sob controle de diversos promotores*

Orientadores: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Prof. Dr. Carlos Roberto Félix

Defesa: 1990

RESUMO – Objetivando analisar experimentalmente a expressão do gene de α -amilase de *B. subtilis* sob o controle de diferentes promotores e comparar a produção da enzima por diferentes linhagens de *E. coli* (HB101, TGI, KS272 e KS303), recombinantes, iniciamos este estudo. Vetores de expressão carreando o fragmento do gene de α -amilase (Ami 2,4kb ou Ami* 1,9kb) sob controle ou do promotor *lac* ou do promotor *tac*, foram introduzidos nas diversas linhagens de *E. coli*. os clones transformantes obtidos e os ensaios enzimáticos indicaram que o gene *Ami* apresenta diferença na expressão, quando diminuído 500 pb de sua extremidade 3' (Ami*), favorecendo aparecimento de maior quantidade de α -amilase em sobrenadantes de culturas contendo *E. coli* KS272, transformada com o plasmídeo pAA88, sobre as demais.

ABSTRACT – The purpose of this study is to test expression of α -amylase gene from *B. subtilis* under control of several promoters and screening for identification of their products for different recombinant strains of *E. coli* (HB101, TGI, KS272 and KS303). To start, vectors carrying α -amylase gene (Ami 2,4kb or Ami* 1,9kb) under control or *lac* promoter or *tac* promoter, have been introduced in different strains of *E. coli*. Enzymatic assays and cloning analysis showed that *Ami* gene has been different in expression when 500pb were deleted downstream (Ami*). In cultures. *E. coli* KS272 harboring, pAA88 vector showed under enzymatic assays of extracellular product, hyper-production of the enzyme.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas com o desenvolvimento da Biologia Molecular, avanços biotecnológicos foram conquistados graças à possibilidade de se isolar, alternar e reintroduzir o material genético de um organismo em outro, tornando possível a criação de novas espécies. Aplicado à prática, é que hoje 7,5 kg de bactérias transgênicas podem produzir os mesmos 5 mg do hormônio somatostatina que antes

eram obtidos a partir de 500 000 cérebros de carneiro (NOTHENBERG, 1988). Assim, nos últimos anos, a Engenharia Genética tem introduzido tecnologia nas indústrias de produção de vacinas, enzimas e suco-alcooleiro; na obtenção de plantas resistentes a herbicidas e pragas, etc., além de promover subsídios operacionais para a pesquisa acadêmica básica.

FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

Diversos trabalhos de pesquisa têm sido desenvolvidos nos laboratórios de Biologia Molecular e de Enzimologia (UnB), visando produzir microorganismos (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*) com potencial hidrolítico industrialmente desejável, a partir de polímeros de plantas.

Com a crise do petróleo desencadeada em 1973, houve necessidade de se buscar alternativas energéticas, especialmente no setor de combustíveis. A obtenção de álcool combustível a partir da fermentação do amido armazenado nas raízes de mandioca, via microorganismos transgênicos, foi uma das alternativas. Para tanto, pesquisas como esta foram iniciadas, visando identificar a melhor e mais eficiente metodologia para a produção do processo.

DETERMINAÇÃO DO ESTUDO

Trabalho realizado nos Laboratórios de Biologia Molecular e Enzimologia da Universidade de Brasília (UnB) DF, visando dar continuidade aos estudos de expressão do gene de α -amilase de *B. subtilis*, isolado em Brasília (DF) por SOUZA (1986), em *E. coli*, a fim de obter um microorganismo transgênico com potencial hidrolítico industrialmente desejável.

OBJETIVOS

Diante do que já foi exposto até então, os objetivos do presente trabalho foram:

- . analisar a expressão do gene de α -amilase sob controle de diferentes promotores.
- . comparar a produção de α -amilase por diferentes linhagens de *E. coli*.

PROCEDIMENTOS

Utilizaram-se vários vetores de expressão (plasmídios) com diferentes promotores (*tac* ou *lac*). Sob controle de um ou outro promotor, foi clonado ou o gene de α -amilase de 2,4kb (Ami) ou o gene de α -amilase de 1,9kb (Ami*). Esse conjunto

de diversos vetores foi introduzido em diferentes linhagens de *E. coli*. Foram analisados sobrenadantes de cultura, bem como, "suco celular" dissolvido em tampão fosfato, de todos os clones recombinantes obtidos. A detecção da atividade da enzima de α -amilase foi estimada pelo método Caraway modificado (CARAWAY, 1959).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As α -amilases são enzimas capazes de converter o amido em unidades de glicose e maltose. As α -amilases de origem microbiana são obtidas na forma cristalina sendo as bactérias do gênero *Bacillus* as principais produtoras (COLE e cols., 1988; FORGATY, 1983). Como a enzima obtida a partir destes microorganismos são termoestáveis e termofílicas, elas são preferencialmente utilizadas na fermentação. Diversos genes de α -amilase já foram clonados em diferentes hospedeiros para serem utilizados na indústria. Vários genes já foram clonados em *E. coli* e alguns de seus produtos utilizados comercialmente como insulina humana, hormônio do crescimento humano (GOEDDEL e cols., 1979a; GOEDDEL e cols., 1979b). Muitos vetores de expressão construídos para *E. coli* possuem os promotores *lac* (JACOB e MONOD, 1961), *tac* (DE BOER e cols., 1983) ou pL (REINIKAINEN e cols., 1989), pois estes, além de promoverem intensa atividade transcricional, podem ter sua ação regulada por agentes indutores. Infelizmente, proteínas heterólogas podem sofrer o ataque de proteases ou formar "corpos de inclusão". Para minimizar esses efeitos pesquisadores promovem mutações em *E. coli* para prover deficiência em proteólise bem como incrementar o processo de secreção protéica, como as mutantes *E. coli* KS272 e KS303 (STRAUCH e BECKWYTH, 1988).

INSTRUMENTOS DE MEDIDA

Foram construídos 04 (quatro) vetores de expressão, sendo eles:

- pAA11 – promotor *lac* / gene *Ami*.
- pAA88 – promotor *lac* / gene *Ami*^{*}.
- pKA11 – promotor *tac* / gene *Ami*.
- pKA88 – promotor *tac* / gene *Ami*^{*}.

Esses vetores foram clonados nas diferentes linhagens de *E. coli* HB101, TG1, KS272 e KS303.

Os clones transformantes foram cultivados em meio líquido e, a partir daí, foram analisados sobrenadantes e "suco celular" obtidos por sonicação, nos ensaios enzimáticos pelo método Caraway modificado.

Os dados numéricos obtidos foram comparados entre si, pela relação Atividade

Enzimática/Densidade Óptica (cultura).

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os diferentes fragmentos de α -amilase (2,4 Kb e 1,9 Kb) clonados em vetores de expressão contendo os promotores *lac* e *tac* os quais têm sua ação controlada pelos indutores alolactose/IPTG. Sabe-se que o promotor *tac* promove maior atividade transcricional que o promotor *lac*, entretanto, as maiores atividades de α -amilase (intra e extracelular) foram detectadas em culturas *E. coli* HB101 programadas com plasmídios pAA88. Ao que parece, o promotor *lac* "in tandem" como promotor do gene de α -amilase mostrou-se mais eficiente do que a interação *tac*-Ami.

Comparando-se a produção de α -amilase extracelular de *E. coli* HB101 contendo os plasmídios pAA88 e pAA11, identificou-se que o clone contendo o pAA88 é melhor produtor de α -amilase, significando que a remoção de 500 pb da região 3' do gene Ami favorece a expressão sob controle do promotor *lac*. O mesmo não foi observado quanto aos clones *E. coli*/pKA88 e *E. coli*/pKA11. Experimentos futuros poderão explicar essas diferenças.

Em outros experimentos com diversas linhagens de *E. coli*, a cepa KS272 transformada com o plasmídio pAA88, demonstrou ser melhor produtora para o meio extracelular desta enzima.

BIBLIOGRAFIA BÁSICA

- BARBONI, S. A. V., TEIXEIRA, M., BATAUS, L. A. M., CRUZ, W. B. E ASTOLFI FILHO, S. Produção de α -amilase de *Bacillus* sp por *Escherichia coli*: Um estudo comparativo da ação de diversos promotores. Arq. Biol. Tecnol. Caxambu, MG. V.32. n.1, p.56, maio, 1983.
- BERG, P. Dissections and reconstructions of genes and chromosomes. *Science*, n.213, p.296-303, 1981.
- BRUNNER, M., BUJARD, H. Promoter recognition and promoter strength in the *Escherichia coli* system. EMBO. J., v.6, n.10, p.3134-3144, 1987.
- CARAWAY, W. T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and body fluids. *Am. J. Clin. Path.*, n.32, p.97-99, 1959.
- COLE, G. E., McCABE, P. C., INLOW, D., GELFAND, D. H., BENBASSAT, A. INNIS, M. A. Stable expression of *Aspergillus awamori* glucoamylases in distiller's yeast. *Nath. Acad. Sci. USA*, n.80, p.21-25, 1983.
- DE BOER, H., COMSTOCK, L. J. e VASSER, M. The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Nath. Acad. Sci. USA*, n.80, p.21-25, 1983.
- FORGARTY, W. M. Microbial amylases. Microbial enzymes and biotechnology. London: Forgarty W. M. (ed.). Applied Sciences Publishers, 1983. p.1-92.
- GOEDDEL, D. V., KLEID, D. G., BOLIVAR, F., HEYBECKER, H. C., YANSURA, D. G., CREA, R.; HIROSE, T., KRASZEWSKI, A., ITAKIEVA, K., RIGGS, A. D. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, n.280,

- p.201-211, 1979a.
- GOEDEL, D. V., HEYNECKER, H. C., MIOZZARI, G., CREA, R., SEEBURG, P. H. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, n.281, p.544-548, 1979b.
- HANCOCK, R. E. W. Alterations in outer membrane permeability. *Ann. Rev. Microbiol.*, n.38, p.237-264, 1984.
- JACOB, F. E MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, n.3, p.318-356, 1961.
- JOSEPHSON, S. e BISHOP, R. Secretion of peptides from *Escherichia coli*: a production system for the pharmaceutical industry. *TIBTECH*, n.6, p.218-224, 1988.
- MANIATTES, T. e PTASHNE, M. A DNA operator-repressor systems. *Scientific American*, n.234, p.64-74, 1976.
- MC GREGOR, E. A. α -amylase structure and activity. *J. Protein Chemistry*, v.7, n.4, p.399-415, 1988.
- NOTHENBERG, M. Auto suficiência à vista. *Química e Derivados*, n.250, p.22-25, 1988.
- REINIKAINEN, P., SEVELLA, B., SUUTARI, M. e MARKKINEN, P. Analysis and modeling of the lambda pL promoter controlled expression of a cloned thermostable α -amylase gene in *Escherichia coli* during batch cultivation. *J. Biotechnology*, v.9, n.3, p.221-234, 1989.
- SOUZA, M. B. N. S. Clonagem molecular e expressão do gene de α -amilase de *Bacillus* sp. Brasília: 1986. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.
- STARK, M. J. R. Multicopy expression vector carrying the lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Gene*, n.51, p.255-267, 1987.
- STRAUCH, K. L. BECKWYTH, J. An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, n.85, p.1576-1580, 1988.
- SUKHODOLETS, V. V. Organization and evolution of the bacterial. *Microbiological Sciences*, v.5, n.7, p.202-206, 1986.