

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

José Davi dos Santos Neves

**CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DE *Escherichia coli* PARA PRODUÇÃO
HETERÓLOGA DE FENAZINAS**

**SÃO CARLOS - SP
2023**

José Davi dos Santos Neves

**CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DE *Escherichia coli* PARA PRODUÇÃO
HETERÓLOGA DE FENAZINAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva

**SÃO CARLOS – SP
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato José Davi dos Santos Neves, realizada em 27/02/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli (UNESP)

Prof. Dr. André Vessoni Alexandrino (UNICEP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

AGRADECIMENTOS

Gratidão para com aqueles que de algum modo, direto ou indireto, contribuíram para a concretização deste ciclo, construído a partir de incertezas e medos que resultaram em muito aprendizado, descobertas e superações.

Primeiramente agradeço a Deus, que me permitiu vivenciar essa extraordinária experiência. Agradeço pelo dom da vida, pela coragem e saúde para seguir sempre em frente e saber que a única alternativa que temos é não desistir.

Aos meus pais Maria Daguia e Marcos Roberto, por tudo que me proporcionaram. Que me ensinaram valores essenciais ao crescimento de um ser humano, como educação, responsabilidade, respeito e acima de tudo amor. Com carinho especial a meu irmão Roggêr e meu sobrinho Lucas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adilson José da Silva, pelos incentivos, ensinamentos profissionais e pessoais, por sempre estar presente, pelos seus conselhos e amizade, além de sua imensa paciência. O tenho como inspiração.

Aos amigos que se tornaram minha família nessa jornada desafiadora, Alessandra, Juliana, Carol, Ana Paula Silva, Paulo, Everton, Nilton e Márcio. Aos queridos “lafaquers”, apelido carinhoso dos integrantes do LAFAC, Davi Oliveira, Vitor, Ana Paula Horta, Yasmim, Josivan (*in memoriam*) e todos que fazem parte desse grupo incrível. Obrigado por todos os momentos que passamos juntos, por todo o amor, paciência, companhia, risadas, vocês são o presente que São Carlos me deu.

Aqueles que, assim como eu, vieram do CDSA (UFCEG), abriram portas, me apoiam e me inspiram sempre, Laura, Kamila, Marco, Rainy, Isadora, José Cordeiro, Júlio, José Renato e em especial, meu querido companheiro Caio.

Aos professores Dr^a Danielle Pedrolli e Dr. André por participarem da banca examinadora e dividir comigo seus conhecimentos e este momento tão importante e esperado. Além de expressar gratidão à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de mestrado, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

RESUMO

As fenazinas compõem uma classe de metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de microrganismos, com grande potencial de aplicação biotecnológica. Porém, a produção desses compostos tem sido realizada apenas nos microrganismos naturalmente produtores, restringindo a viabilidade de sua aplicação, já que alguns destes organismos são patogênicos e outros apresentam produção bastante limitada. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é produzir essas moléculas em células de *Escherichia coli*, de forma heteróloga. Para isso, os genes envolvidos na biossíntese das fenazinas selecionadas foram clonados e expressos utilizando vetores baseados em *BioBricks*. Partindo do cluster de genes *phzABCDEFG* de *Pseudomonas aeruginosa*, responsável pela produção da fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), foram adotadas estratégias para produção de fenazinas derivadas. Para produção da fenazina-1,6-ácido dicarboxílico (PDC), se fazia necessária a remoção do gene *phzA* do cluster mencionado. Entretanto, quando realizado cultivo e posterior análise de espectrometria de massa, não foi possível identificar a molécula alvo. Ainda sobre a produção da PDC, foi empregada a técnica de recombinação homóloga, afim de substituir os genes *phzABG* pelos genes *esmA1* e *esmA2* de *Streptomyces antibioticus* Tü 2706, porém não foram geradas colônias positivas. Já para a produção da 1-metoxifenazina (PMO) foi utilizado o gene *LaphzM* de *Lysobacter antibioticus*, que em conjunto com o gene *phzS* de *P. aeruginosa*, possibilitou a conversão da PCA em PMO. Neste caso, após a realização do cultivo da linhagem recombinante, foi possível identificar a massa da molécula alvo de interesse, produzida pela primeira vez de forma heteróloga, até onde sabemos. Na produção da PMO foram avaliadas diferentes linhagens de *E. coli*, concentrações do indutor IPTG, além de diferentes fontes de carbono, atingindo-se uma produção de 421 mg/L. Também foi possível produzir com sucesso a endofenazina A, com a utilização do gene *ppzP* de *Streptomyces anulatus*, que codifica uma preniltransferase, em conjunto com plasmídeos para expressão de genes da via do mevalonato de *S. cerevisiae*, além do cluster para produção da PCA. A confirmação da produção dessas moléculas foi realizada por espectrometria de massas e em cromatografia líquida, e em experimentos iniciais foi possível atingir concentrações finais em torno de 200 mg/L do produto de interesse.

Palavras-chave: Fenazinas, biotecnologia, engenharia metabólica, metabólitos secundários

ABSTRACT

Phenazines are a class of secondary metabolites produced by some species of microorganisms, with great potential for biotechnological application. However, the production of these compounds has been performed only in naturally producing microorganisms, restricting the viability of its application, since some of these organisms are pathogenic and others present very limited production. Thus, the objective of this work is to produce these molecules in *Escherichia coli* cells, heterologously. To this end, genes involved in the biosynthesis of the selected phenazines were cloned and expressed using BioBricks-based vectors. Starting from the *phzABCDEFG* gene cluster from *Pseudomonas aeruginosa*, responsible for the production of phenazine-1-carboxylic acid (PCA), strategies were adopted for production of derived phenazines. For production of phenazine-1,6-dicarboxylic acid (PDC), it was necessary to remove the *phzA* gene from the mentioned cluster. However, when culture and subsequent mass spectrometry analysis were performed, it was not possible to identify the target molecule. Still on the PDC production, the homologous recombination technique was employed in order to replace the *phzABG* genes by the *esmA1* and *esmA2* genes from *Streptomyces antibioticus* Tü 2706, but no positive colonies were generated. For the production of 1-methoxyphenazine (PMO), the *LphzM* gene from *Lysobacter antibioticus* was used, which, together with the *phzS* gene from *P. aeruginosa*, enabled the conversion of PCA into PMO. In this case, after culturing the recombinant strain, it was possible to identify the mass of the target molecule of interest, produced for the first time in a heterologous manner, to the best of our knowledge. In the production of PMO, different *E. coli* strains, concentrations of the inducer IPTG, and different carbon sources were evaluated, reaching a production of 421mg/L. It was also possible to successfully produce endofenazine A, using the *ppzP* gene from *Streptomyces anulatus*, which encodes a prenyltransferase, together with plasmids for the expression of genes from the *S. cerevisiae* mevalonate pathway, and the cluster for PCA production. The confirmation of the production of these molecules was performed by mass spectrometry and liquid chromatography, and in initial experiments it was possible to reach final concentrations around 200 mg/L of the product of interest.

Keywords: Phenazines, biotechnology, metabolic engineering, secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Compreensão da via de biossíntese das Fenazinas.....	14
Figura 2 - 1) Estrutura da mixina e 2) estrutura iodinina.....	16
Figura 3 - Possíveis configurações de clonagem pelo conjunto de vetores <i>ePathBricks</i>	17
Figura 4 - Esquema de <i>biobrick</i>	18
Figura 5 – Fenazinas selecionadas para produção heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	20
Figura 6 - (A) Mapa do plasmídeo <i>pETM7_phzABGFCDE</i> com suas principais características. (B) Mapa do plasmídeo <i>pACM5</i> com suas principais características.....	22
Figura 7 - Representação da clonagem por CPEC.....	26
Figura 8 - Simulação (SnapGene®) da amplificação do plasmídeo <i>pETM7_phzABGFCDE</i> sem a o gene <i>phzA</i>	27
Figura 9 – Esquema da amplificação do vetor e do inserto por recombinação homóloga em <i>E. coli</i>	30
Figura 10 – Esquema da clonagem <i>pACM5_laphzM</i>	31
Figura 11 – Esquema da clonagem do plasmídeo <i>pACM5_phzS_laphzM</i>	32
Figura 1 – Esquema da clonagem do plasmídeo <i>pACM5_ppzP</i>	33
Figura 13 2 – Construção do plasmídeo acessório <i>pMevT_ppzP</i>	34
Figura 14 - plasmídeos utilizados para transformação na <i>E. coli</i> QH4: <i>PMBI</i> , <i>pMevT_ppzP</i> e <i>pETM7_phzABGFCDE</i>	35
Figura 15 - Eletroforese da digestão dos plasmídeos com os genes sintéticos para produção das fenazinas de interesse.....	39
Figura 16 – Eletroforese do rodutos de PCR de colônias.....	41
Figura 17 – Eletroforese de produto de PCR Round the Horn.....	42
Figura 3 - Digestão das amostras de <i>pETM7_phzABGFCDE</i> e <i>pETM7_phzBGFCDE</i> com enzima de restrição <i>BamHI</i>	43
Figura 19 - Cultivo da fenazina 1-6-ácido dicarboxílico.....	44
Figura 20 - (A) Eletroforese desenvolvida com os produtos de PCR do inserto e do vetor..	45
Figura 21 – Eletroforese de produtos de PCR de colônia de <i>E. coli</i> DH5α recombinantes...	45
Figura 22 - Eletroforese de produtos de PCR de colônia do <i>pACM5_phzS_laphzM</i>	46
Figura 23 - Cultivo em duplicata de <i>E. coli</i> QH4 para produção de metoxifenazina (PMO).....	47
Figura 24 - Espectro de massas (PMO).....	47

Figura 25 – Concentrações de metoxifenazina produzida por diferentes linhagens de <i>E. coli</i>	48
Figura 26 - Concentrações finais de metoxifenazina produzidas pela <i>E. coli</i> QH4 com variação na concentração do indutor IPTG.....	50
Figura 27 - Concentrações finais de metoxifenazina produzidas pela <i>E. coli</i> QH4 com variação na fonte de carbono.....	51
Figura 28 - Eletroforese com vetor e inserto.....	52
Figura 29 - (A) Simulação em SnapGene® com enzimas de restrição <i>KpnI</i> e <i>NdeI</i> para digestão do <i>pMevT_ppzP</i> e do <i>pMevT</i> . (B) eletroforese da digestão de <i>pMevT_ppzP</i> com as enzimas mencionadas.....	53
Figura 30 - Placa de Petri com meio LB + ágar(15g.L ⁻¹) com antibióticos: ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol. Colônias de <i>E. coli</i> QH4 após 20 h de incubação à 37°C.....	54
Figura 31 - Concentrações finais de endofenazina A produzidas pela <i>E. coli</i> QH4 com variação na fonte de carbono.....	54
Figura 32 - Espectro de massas endofenazina A.....	56
Figura 33 - Cromatogramas das Fenazinas produzidas.....	57

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo Geral.....	12
2.2	Objetivos específicos.....	12
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	Fenazinas e sua biossíntese	13
3.2	Configurações nos anéis das fenazinas.....	15
3.3	Estratégias para produção de fenazinas	16
3.4	Aplicações das fenazinas	18
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1	Estratégias abordadas para produção das fenazinas	20
4.2	Linhagens bacterianas e meios de cultivo	21
4.3	Genes acessórios para obtenção das fenazinas de interesse.....	22
4.4	Extração dos plasmídeos <i>pETM7_phzABGFCDE</i> e <i>pACM5</i>	22
4.5	Construção dos plasmídeos para produção da fenazina 1,6-ácido dicarboxílico (PDC)	23
4.6	Construção dos plasmídeos para produção da 1-metoxifenazina (PMO).....	31
4.7	Construção dos plasmídeos para produção da endofenazina A	32
4.8	Etapas de ligação de inserto e vetor com T4 ligase	35
4.9	Cultivos em frascos agitados para produção das fenazinas	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Subclonagem dos genes sintéticos	39
5.2	Produção da Fenazina-1,6-ácido dicarboxílico (PDC).....	40
5.3	Produção da 1-metoxifenazina (PMO).....	46
5.4	Produção da endofenazina A	51
6	CONCLUSÃO	58
7	SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS	59
8	REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários microbianos representam uma importante fonte de biomoléculas com aplicações biotecnológicas, entre os quais estão as fenazinas. Em geral, essas moléculas têm efeitos antibacterianos, antifúngicos e antitumorais de amplo espectro (CHINCHOLKAR, S., THOMASHOW, T, 2013; PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A, 2010).

Além dessas aplicações, tais compostos têm sido investigados para o desenvolvimento de dispositivos e processos eletroquímicos devido à sua capacidade de sofrer reações de oxidação e redução. Exemplos incluem o uso de fenazinas como mediadores eletrônicos em células de combustível microbianas ou no desenvolvimento de biossensores (PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A, 2010; JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S, 2014).

As fenazinas representam uma classe de compostos heterocíclicos contendo nitrogênio secretados principalmente por *Pseudomonas* e *Streptomyces* (MAVRODI, DMITRI V., *et al.*, 2010), e estima-se que mais de 180 tipos de fenazinas naturalmente produzidas já foram identificadas (GUTTENBERGER *et al.*, 2017; LAURSEN *et al.*, 2004; PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A, 2010). Diante dessa diversidade e suas variadas propriedades biológicas, as fenazinas têm atraído bastante atenção devido às suas diversas aplicações na agricultura, medicina e indústria (PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A, 2010; LAURSEN *et al.*, 2004; LIGON, *et al.*, 2000; MAKGATHO, *et al.*, 2000).

Embora as fenazinas possam ser sintetizadas quimicamente, esses métodos apresentam muitas desvantagens, como a produção de subprodutos tóxicos, baixos rendimentos e difícil purificação (ELHADY, H.A.; EL-MEKAWY, R.E.; FADDA, A., 2020; CHELUVAPPA. R, 2014).

Dadas as potenciais aplicações de tais moléculas, é notório o desenvolvimento de pesquisas sobre sua produção, principalmente em cepas bacterianas do gênero *Pseudomonas*. Em geral, várias estratégias para modular as vias regulatórias e o metabolismo energético do organismo hospedeiro são observadas durante as tentativas de produção por biossíntese. Nesse sentido, esses estudos se refletem como uma base de conhecimento que auxilia na elucidação das vias de produção e regulação de biomoléculas. Além disso, descrevem metas potenciais para alcançar ganhos de produtividade (GUTTENBERGER *et al.* 2017).

Ao comparar o operon *phz* em diferentes espécies, cinco grupos de enzimas, PhzE, PhzD, PhzF, PhzB e PhzG, demonstraram ser conservados em todas as bactérias produtoras de

fenazina (MENTEL *et al.*, 2009). Essas enzimas, por sua vez, convertem o corismato em fenazina-1,6-ácido dicarboxílico (PDC) e/ou fenazina-1-ácido carboxílico (PCA). Então, PDC e PCA, que são precursores de outras fenazinas, são convertidos por diferentes enzimas modificadoras de fenazina (MENTEL *et al.*, 2009).

Apesar do seu grande potencial de aplicação biotecnológica, a produção desses compostos tem sido realizada apenas nos microrganismos naturalmente produtores, restringindo a viabilidade de sua aplicação, já que alguns destes organismos são patogênicos e outros apresentam produção bastante limitada.

Dessa forma, para contornar essa limitação, a estratégia abordada neste trabalho é a produção dessas moléculas de forma heteróloga em células de *Escherichia coli*. Além disso, diante da complexa rede regulatória envolvida para controlar a produção destes metabólitos secundários nos organismos naturalmente produtores, acredita-se que sua produção em *E. coli* pode ser vantajosa, pois tal regulação pode ser eliminada em um sistema heterólogo de produção, como observado para o estudo de produção de piocianina em *E. coli* (SILVA, 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver plataformas microbianas baseadas em *Escherichia coli* para a produção de diferentes fenazinas.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a clonagem e expressão em *E. coli* de genes envolvidos na produção de um conjunto selecionado de fenazinas, nomeadamente fenazina-1,6-ácido dicarboxílico (PDC), 1-metoxifenazina (PMO), e endofenazina A.
- Identificar a produção das fenazinas de interesse por espectrometria de massas e realizar sua quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Estudar algumas condições de processo, como o emprego de diferentes linhagens de *E. coli* e aspectos relacionados à indução da produção das fenazinas (concentração de indutor, momento de indução);
- Estudar diferentes fontes de carbono na produção das fenazinas, visando maximizar a produção dos compostos de interesse.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fenazinas e sua biossíntese

Os microrganismos dos gêneros *Pseudomonas* e *Streptomyces*, possuem as fenazinas como produto de seu metabolismo secundário. As fenazinas são compostos aromáticos nitrogenados que exibem intensa coloração e destacam-se por suas funções biológicas e propriedades antitumorais, ação antifúngica, bactericida, entre outras (CHINCHOLKAR, S., THOMASHOW, T, 2013).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, é responsável pela produção de cinco diferentes fenazinas com potencial aplicação biotecnológica (MAVRODI *et al.*, 2001), sendo uma delas a fenazina-1-ácido carboxílico (PCA, do inglês *Phenazine-1-Carboxylic Acid*), de grande importância por ser precursora de outros tipos de fenazinas nesse e em outros microrganismos.

A biossíntese de fenazinas em *Pseudomonas* é realizada por enzimas codificadas pelo cluster de genes *phzABCDEFG* que tem como precursor o corismato (MAVRODI *et al.*, 1998). Por sua vez, o corismato é o produto final da via do chiquimato pela qual os compostos aromáticos são produzidos nas bactérias. A ação das enzimas codificadas no cluster *phzABCDEFG* resulta na produção de PCA, conforme mostrado na Figura 1. Na maioria das bactérias produtoras de fenazina, esses genes são flanqueados por um ou mais genes acessórios que codificam enzimas que facilitam a adição e modificação de grupos nas moléculas de PCA, gerando outras fenazinas.

Figura 4- Compreensão da via de biossíntese das fenazinas: começa com a conversão do ácido corísmico em ADIC, catalisada pela PhzE. O grupo funcional éter vinílico do ADIC é clivado na etapa seguinte da cascata biossintética, catalisada pela PhzD, para produzir piruvato e ácido trans-2,3-dihidro-3-hidroxi-antranílico (DHAH). A isomerização subsequente da ligação dupla é catalisada pela PhzF, o enol obtido tautomeriza para ácido 6-amino-5-oxociclo-hex-2-eno-1-carboxílico (AOCHC) e sugere-se que uma cavidade na PhzF dimérica possa ser adequada para a subsequente condensação cetônica de duas moléculas de AOCHC para a geração de ácido hexahidrofenzina-1,6-dicarboxílico (HHPDC). Devido à sua instabilidade, o HHPDC sofre uma rápida transformação oxidativa em ácido tetraidrofenzina-1,6-carboxílico (THPCA). A partir do HHPDC, duas reações de descarboxilação oxidativa ocorrem juntamente com uma oxidação espontânea, resultando na formação de fenazina sem substituintes. As etapas finais da biossíntese de DHPDC e DHPCA são mediadas por reações de oxidação catalisadas pela enzima PhzG. A PhzG não tem uma especificidade perfeita, o que significa que também produz PCA, PDC e fenazina sem substituintes. A proporção desses compostos é determinada pela competição entre as reações de oxidação catalisadas pela PhzG e as descarboxilações oxidativas espontâneas.

antibiótica e anticancerígena (DASGUPTA *et al.* 2015), porém é produzida em menor quantidade do que sua semelhante PCA, que é produzida por *Pseudomonas* (JIN *et al.* 2015).

Entende-se que a produção ou não de PDC pode ser uma ferramenta para diferenciação das *Pseudomonas* de outras bactérias que produzem fenazinas, como por exemplo *Streptomyces* e *Pantoea agglomerans*, que produzem derivados de fenazinas a partir da PDC (DASGUPTA *et al.* 2015; MCDONALD *et al.* 1999; MESSENGER E TURNER 1986). Dessa forma, as bactérias produtoras de fenazinas foram classificadas como produtoras apenas de PCA ou de PCA mais PDC (DASGUPTA *et al.* 2015; GOHAIN, N *et al.* 2006; PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A, 2010), e ao avaliar a evolução dos genes das fenazinas em todas as bactérias produtoras, foi notória a ausência do gene *phzA* nos organismos produtores de PDC, o que leva a crer que o mesmo seja o principal fator na distinção entre as vias responsáveis pela produção apenas de PCA ou de PCA mais PDC.

Diante disso, os estudos demonstraram que a produção de PDC e seus derivados associa-se com ausência do gene *phzA* (PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A, 2010; MESSENGER, A. J.; TURNER, J. M, 1986), ao mesmo tempo que *Pseudomonas* carregam o gene *phzA* e produzem a fenazina PCA e seus derivados (MAVRODI *et al.* 2006; TURNER e MESSENGER 1986). No entanto, ainda se faz necessário que estudos sejam promovidos para elucidar as funções do gene *phzA* na biossíntese de fenazinas para potencial produção desses compostos por *Pseudomonas*.

3.2 Configurações nos anéis das fenazinas

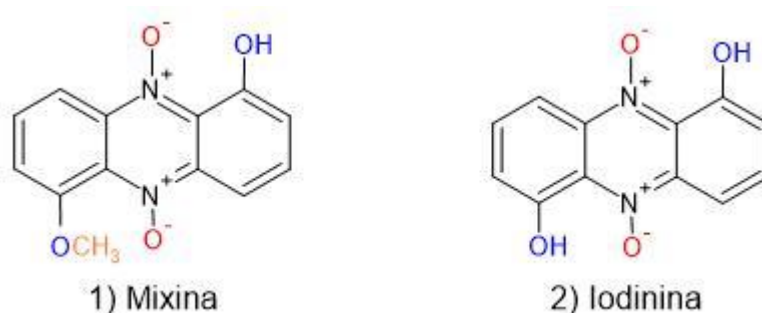
Uma característica das fenazinas é possuírem um núcleo de três anéis (dibenzopirazina), porém se diferenciam de acordo com as decorações que possuem em seus anéis. Essas decorações, incluindo grupos prenil, amida, carboxilato, hidróxi, N- metil, O-metil (metoxi), etc designam qual atividade biológica a fenazina desempenhará (PARSONS, J. F *et al.* 2008; PARSONS *et al.* 2007; GOHAIN *et al.* 2006).

Seis fenazinas foram isoladas de *Lysobacter antibioticus* OH13, e dentre essas estava um conhecido antibiótico, a mixina (1-hidroxi-6-metoxifenazina-N5,N10-dióxido), que possui atividade antimicrobiana, e é usada como antibiótico veterinário tópico de amplo espectro (PARSONS, J. F *et al.* 2008; PARSONS *et al.* 2007; GOHAIN *et al.* 2006)

Das seis fenazinas mencionadas, cinco delas contêm um ou dois grupos O-metil, mas nenhuma possui grupo N-metil. Os grupos O-metil são importantes para a atividade antibiótica. Um exemplo disso é o par de fenazinas mixina e iodina (1,6-dihidroxifenazina N5,N10- dióxido) que possuem estruturas semelhantes porém com uma pequena diferença

na iodina, em que nenhum de seus grupos hidroxila é metilado, como é possível visualizar na figura 2 (K.; LADNER, J. E.; e PARSONS, J. F, 2008; PARSONS *et al* 2007; GOHAIN *et al.* 2006; GOHAIN *et al.* 2006).

Figura 5 – 1) Estrutura da mixina e 2) estrutura iodina.
Percebe-se a diferença na decoração dos anéis aromáticos



Fonte: adaptado de JIANG *et al.*, (2018).

As moléculas de fenazinas possuem decorações específicas em seus anéis e isso é particular de cada organismo produtor. Existe um cluster de genes, o *la_phz*, encontrado na cepa *Lysobacter antibioticus* OH13, que possui quatro genes responsáveis por essas decorações em fenazinas. Um desses genes é responsável por codificar a enzima dependente de FAD, o *la_phzS*, que promove duas carboxilações oxidativas na fenazina PDC, e esta reação converte a PDC em 1,6-dihidroxi-fenazina (DHP) (IIDA *et al.* 1993; CHANDRAN *et al.* 2003).

Ainda dentro do cluster de genes *la_phz*, pode-se mencionar dois genes cuja função não está totalmente elucidada, que são o *la_phzM* e o *la_phzX*; porém o *la_phzM* possui semelhança à sequência de genes que codificam metiltransferases, como a que está presente na via de biossíntese da piocianina (IIDA *et al.* 1993; CHANDRAN *et al.* 2003).

3.3 Estratégias para produção de fenazinas

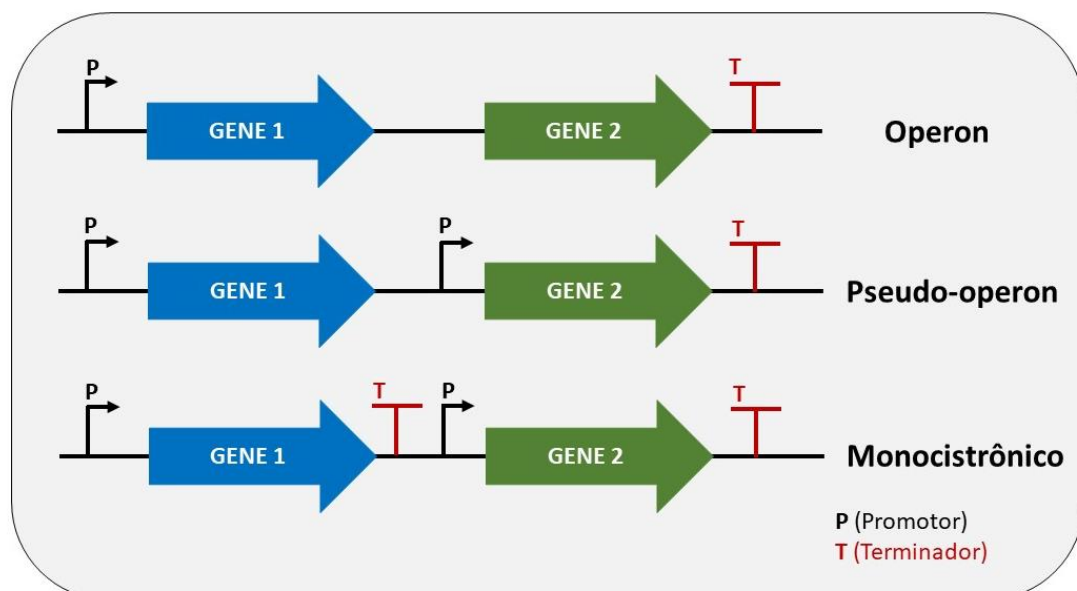
O processo de produção das fenazinas pode ser dificultado pela difícil manipulação dos microrganismos que as produzem naturalmente, por serem patogênicos ou pela limitação de ferramentas de manipulação genética dos mesmos. Frente a essa problemática surge a possibilidade de produção heteróloga desses compostos, uma vez que a utilização de técnicas de engenharia metabólica e outras células chassis pode contribuir para expressão livre de patogenicidade e de complexas redes regulatórias.

Com a utilização da engenharia metabólica é possível aumentar a produção de um

composto de interesse, por meio da otimização genética. Com essa ferramenta é possível potencializar a formação de um produto ou ainda as propriedades celulares do organismo. Assim, se faz necessário modificações específicas, como em reações bioquímicas, empregando a tecnologia do DNA recombinante.

Dentre as ferramentas disponíveis para fins de engenharia metabólica utilizando células de *E. coli*, a coleção de plasmídeos *ePathBrick* serve como plataforma para a montagem de vetores para a expressão de múltiplos genes de uma via. Utilizando o conceito *BioBricks*, os vetores utilizados possuem quatro sítios de restrição compatíveis (*AvrII*, *XbaI*, *SpeI* e *NheI*) estrategicamente posicionados. Isso permite que genes clonados sejam facilmente organizados em operons, pseudo-operons ou estruturas monocistrônicas (figura 3). Essas configurações resultam em vários níveis de expressão dos alvos escolhidos (XU et al, 2012).

Figura 3 - Possíveis configurações de clonagem pelo conjunto de vetores *ePathBricks*. Na configuração de operon, múltiplos genes são agrupados sob um único promotor e transcritos como uma unidade, permitindo a coexpressão de proteínas relacionadas, o que economiza recursos celulares. Em seguida, tem-se o pseudoperon, que por sua vez, pode imitar operons, mas pode conter elementos regulatórios adicionais que influenciam a expressão gênica de maneira mais complexa. Por fim, na configuração monocistrônica, um único gene é expresso independentemente, produzindo uma única proteína funcional.



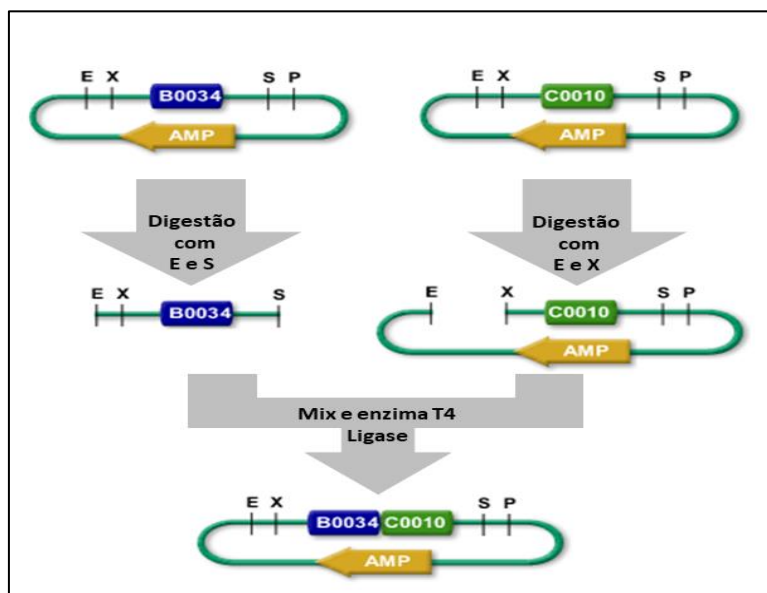
Fonte: Adaptado de Fordjour et al. (2019).

Para que o encaixe de *biobricks* em sequências nucleotídicas ocorra, fazem-se necessárias algumas características de um conjunto de enzimas de restrição. É possível observar o esquema que representa esse processo na figura 4. Ao clivarem o sítio alvo, tais

enzimas produzem extremidades de fita simples isocaudâmeras, que por sua vez são complementares entre si. A exemplo disso, observa-se a clivagem de um fragmento de DNA com sítio de restrição para *SpeI*, e um outro fragmento com *XbaI*. Como resultado de um pareamento coesivo das extremidades isocaudâmeras geradas, é obtida a ligação dos fragmentos.

Consequentemente, o método leva ao desaparecimento dos sítios de restrição de ambas as enzimas, impossibilitando que, uma vez unidos, os fragmentos sejam separados por elas. Na figura 4 observa-se a subclonagem de um gene (azul) em um novo plasmídeo através deste método. Ao cortar o inserto utilizando as enzimas hipotéticas E e S, este pode ser unido à porção do novo vetor digerido com as enzimas hipotéticas E e X. As extremidades cortadas por S e X são complementares e, ao serem ligadas, perdem os sítios de restrição para ambas as enzimas (na região entre os genes representados em azul e verde). Na extremidade proveniente de digestões com a enzima E, seu sítio é mantido, possibilitando novas inserções (XU et al., 2012).

Figura 4 - Esquema de *biobricks*. A figura ilustra o processo de digestão de DNA por enzimas de restrição, envolvendo as enzimas E, X, S e P, demonstrando o reconhecimento e clivagem específica de seqüências de nucleotídeos. Onde B0034 e C0010 são genes que serão subclonados em um único plasmídeo como vetor, com a enzima de ligação T4 ligase. AMP representa a resistência ao antibiótico ampicilina.



Disponível em: https://parts.igem.org/Assembly:Standard_assembly. Acesso em: 06 de janeiro de 2022.

3.4 Aplicações das fenazinas

O amplo potencial de aplicações das fenazinas ocorre devido as mais variadas funções biológicas que essas moléculas desempenham nos microrganismos naturalmente produtores.

Duas dessas funções podem ser destacadas, sendo a regulação celular do próprio produtor e a interação e/ou influência que essas moléculas possuem sobre outros microrganismos (CHINCHOLKAR, S., THOMASHOW, T, 2013).

As fenazinas ainda são capazes de promover a regulação da expressão gênica, regulação da fisiologia celular voltada para a homeostase, promovem a captação de ferro, auxiliam na viabilidade celular em ambientes com pouco oxigênio e contribuem na formação e arquitetura de biofilme (CHINCHOLKAR, S., THOMASHOW, T, 2013). Em estudo realizado por Das, T.; Manefield, M.; Rohde, H, (2012) descobriu-se que a fenazina piocianina (PYO) exerce papel fundamental na formação do biofilme de *P. aeruginosa*, pois PYO promove a liberação de DNA extracelular (eDNA), que estabiliza os biofilmes bacterianos, protegendo-os contra estresse físico e químico.

Uma atividade promissora desempenhada pelas fenazinas é a atividade anticancerígena. Inicialmente, um problema encontrado foi a intercalação não seletiva do DNA, quando aplicadas fenazinas como agentes anticancerígenos, pois estas desencadeavam uma toxicidade geral.

Porém esse problema pode ser contornado, uma vez que sua seletividade pode ser aumentada usando derivados de fenazinas, de forma a não utilizar apenas sua “estrutura plana”. Para isso, foram encontradas estruturas com potencial aplicação, por exemplo, portadores de um grupo protonável ou estruturas diméricas. Fenazinas sintéticas e naturais têm sido testadas para fim anticancerígeno (GUTTENBERGER, N.; BLANKENFELDT, W.; BREINBAUER, R, 2017; KENNEDY *et al.* 2015). A PCA, por exemplo, desempenhou atividades protetoras e anticancerígenas contra a linhagem celular de melanoma da pele humana (SK-MEL-2.47).

Outra aplicação de destaque vai de encontro à necessidade crescente por novos antibióticos, uma vez que patógenos têm aumentado sua resistência a esse tipo de composto e tendo em vista que esses antibióticos são baseados em estruturas identificadas no século passado. Nesse cenário, as fenazinas surgem como promissoras candidatas no desenvolvimento de novos antibióticos (PUOPOLO *et al.* 2013).

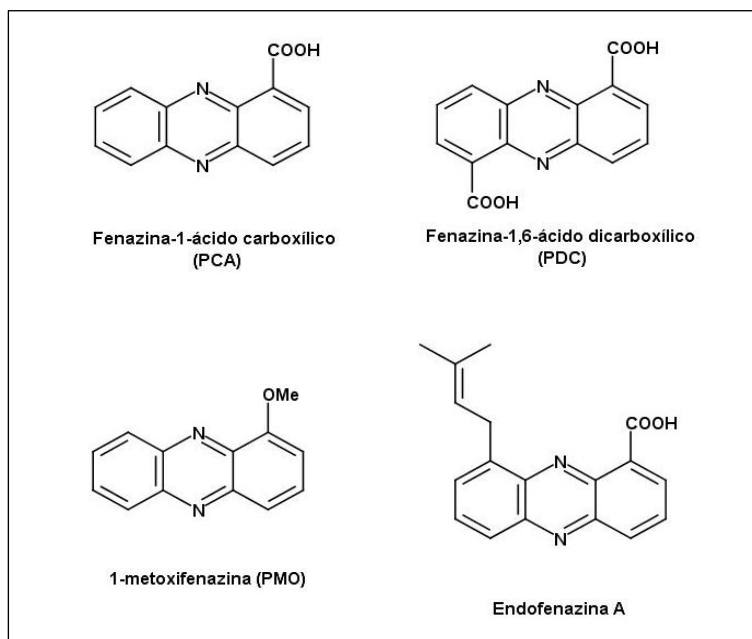
A utilização de fenazinas em dispositivos eletroquímicos também aparece como uma aplicação potencial dessa classe de moléculas, e isso se deve à suas capacidades de sofrer reações reversíveis de óxido-redução. Nesse sentido, a literatura traz exemplos do uso de fenazinas para o desenvolvimento de biossensores (JAYASEELAN *et al.*, 2014), células combustíveis microbianas (RABAEY *et al.*, 2005) ou como mediadoras de elétrons em sistemas de eletrofermentação, por exemplo (MORRISON *et al.*, 2018).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estratégias abordadas para produção das fenazinas

A figura 5 apresenta as estruturas das fenazinas escolhidas, e a seguir são detalhadas algumas características das mesmas.

Figura 5 – Fenazinas selecionadas para produção heteróloga em *Escherichia Coli*



Fonte: Autor

A fenazina-1-ácido carboxílico (PCA) é a precursora das demais fenazinas de *Pseudomonas* e de alguns outros microrganismos e será o ponto de partida para esta para a obtenção das demais fenazinas. Sua produção depende da expressão do *operon phzABCDEFG* de *P. aeruginosa*, e sua produção já vem sendo estudada em nosso grupo como fenazina-modelo.

A ocorrência da 1-metoxifenazina (PMO) foi descrita em *Streptomyces sp.* (ROY, P.; GHORAI, 2010) mas sua biossíntese não foi relatada posteriormente. Entretanto, após a descoberta da enzima *laphzM* de *Lysobacter antibioticus*, que realiza a metilação não seletiva de grupos hidroxilas na molécula de iodinina (JIANG *et al.* 2018), acreditamos que a biossíntese de PMO pode ser realizada a partir da 1-hidroxifenazina, e essa hipótese é o ponto de partida para produção dessa molécula.

A fenazina-1,6-ácido dicarboxílico (PDC), é precursora das fenazinas de várias espécies de *Streptomyces sp.* entre outras. Apesar de sua moderada solubilidade em água, este composto foi selecionado pois é necessário para a síntese de outra fenazina de interesse.

Informações da literatura indicam que sua produção é favorecida, frente à PCA, quando os genes do *operon phz* são expressos na ausência do gene *phzA* (S. GUO *et al.* 2017).

A endofenazina A trata-se de uma fenazina prenilada produzida a partir de PCA por *Streptomyces anulatus* e por *Streptomyces cinnamonensis*. A adição do grupo prenil é realizada pela enzima codificada pelos genes *ppzP* ou *epzP* de *S. anulatus* ou *S. cinnamonensis*, respectivamente (O. SALEH, B. GUST, B. BOLL, H.-P. FIEDLER, L. HEIDE, 2009; KERSTIN *et al.* 2011).

4.2 Linhagens bacterianas e meios de cultivo

A linhagem de *E. coli* DH5 α foi empregada para os procedimentos de clonagem dos plasmídeos de expressão. Uma vez que os plasmídeos foram construídos empregou-se a linhagem de *E. coli* QH4 que é derivada da ATCC31884 e possui deleção dos genes *pheA* e *tyrA*, que convertem corismato (precursor das fenazinas) em prefenato, além das linhagens de *E. coli* W, BL21(DE3), K-12 MG1655 e ROSETTA para os testes de produção das fenazinas de interesse.

Para o cultivo da linhagem DH5 α foi utilizado o meio LB (*Lysogeny-Broth*) composto por 10 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ de NaCl, com as células incubadas a 37°C e agitação de 225 rpm. Para o plaqueamento, o meio LB foi acrescido com 15 g.L⁻¹ de ágar.

Para os cultivos de produção utilizou-se o meio TB (24 g.L⁻¹ extrato de levedura, 12 g.L⁻¹ triptona, 0,17 M KH₂PO₄ e 0,72 M K₂HPO₄, suplementado com 20 g.L⁻¹ glicerol, pH 7,0) e as células foram incubadas sob agitação de 225 rpm a 30°C.

No procedimento de transformação das linhagens, é necessário a recuperação do crescimento celular após a etapa de eletroporação. Nesse sentido, foram utilizados o meio SOB (preparado com 20 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g.L⁻¹ de NaCl, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM) e SOC (derivado do SOB, porém com adição de glicose 20 mM). Já para recuperação do crescimento após transformações por choque térmico, somente o meio SOC foi utilizado.

De acordo com o plasmídeo transformado em cada linhagem foi feita adição de antibióticos na concentração final de 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ampicilina), 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (cloranfenicol), e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (anidrotetraciclina). As células transformadas, tiveram sua transcrição induzida por IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 1 mM. Para a produção da 1-metoxifenazina foi realizado um teste da influência da concentração de IPTG, conforme descrito a seguir no item 4.7.2.

Para os procedimentos de rotina de biologia molecular, como as transformações e purificações de gel, foram seguidos protocolos padrão (SAMBROOK, 2001).

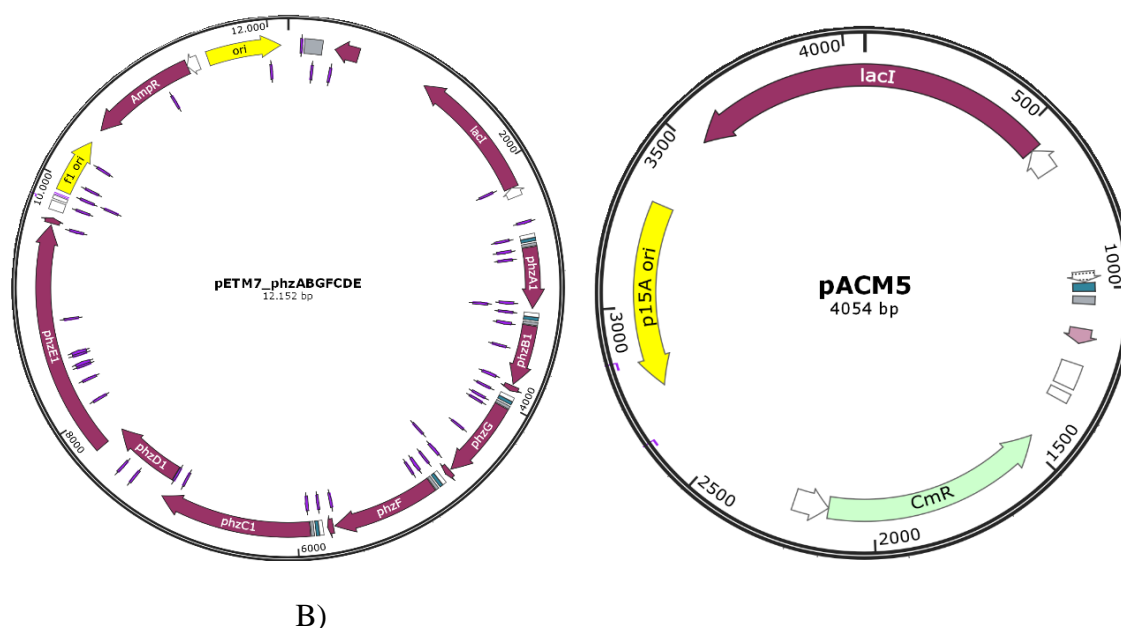
4.3 Genes acessórios para obtenção das fenazinas de interesse

Para obtenção dos genes acessórios, necessários para produção de alguns dos compostos de interesse, foram sintetizados e importados os genes *ppzP* de *Streptomyces anulatus*, e *laphzM*, *laphzS* e *laphzNO1* de *Lysobacter antibioticus*, que vieram alocados no plasmídeo *pUC18* que possui resistência ao antibiótico ampicilina. Logo em seguida, esses genes foram subclonados para o plasmídeo *pACM5*, da série *ePathBrick*, para posterior expressão dos genes acessórios nas linhagens produtoras. Esses genes foram sintetizados por uma empresa especializada (*GenScript*®).

4.4 Extração dos plasmídeos *pETM7_phzABGFCDE* e *pACM5*

Para obtenção dos vetores a serem usados nas clonagens (figura 6), foram preparados inóculos de 5 mL (meio LB) de células de *E. coli* DH5 α previamente transformadas com o plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE* (SILVA *et al.*, 2021, estoque do laboratório) e outro de mesmo volume e meio com a *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo *pACM5* (XU *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2021).

Figura 6 - (A) Mapa do plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE* com suas principais características. (B) Mapa do plasmídeo *pACM5* com suas principais características.



Fonte: Autor.

Após incubação das células em *shaker overnight*, os plasmídeos foram extraídos

utilizando-se o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega®)*, conforme instruções do fabricante, eluídos em 35 µL de água ultrapura a 60°C e em seguida quantificados em *NanoDrop*. Os plasmídeos foram então armazenados em freezer -20°C.

4.5 Construção dos plasmídeos para produção da fenazina 1,6-ácido dicarboxílico (PDC)

Segundo S. Guo *et al.* (2017), a obtenção da fenazina PDC deve ser possível a partir da expressão dos genes *phzBCDEFG* de *P. aeruginosa*. Dessa forma, foram avaliadas diferentes abordagens para eliminação do gene *phzA* do plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE* (utilizado para produção da fenazina PCA).

4.5.1 Construção do plasmídeo *pETM7_phzBGFCDE* por CPEC

Com a intenção de remover o gene *phzA* do plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE*, inicialmente foi empregada a técnica de clonagem CPEC (*Circular Polymerase Extension Cloning*), em que foram amplificadas duas partes do plasmídeo molde (chamadas de “Vetor” e “Fragmento”), de modo que os amplicons não possuíssem a sequência do gene *phzA*. Os primers utilizados (Fragment_delA_FOR, Fragment_delA_REV, Vector_delA_REV e Vector_delA_FOR) e suas sequências encontram-se na tabela 1, assim como os demais primers utilizados neste trabalho. Após a amplificação dos fragmentos foi realizada a ligação e recircularização de ambos.

Tabela 1 – Primers utilizados para amplificação dos produtos de DNA

Primer	Sequência
Fragment_delA_FOR	5'gctacatggcaatgaatagccgttccgcaaataaaacgt3'
Fragment_delA_REV	5'cagggcgcggtcccattcgccaa3'
Vector_delA_FOR	5'gcgaatgggacgcgcctgta3'
Vector_delA_REV	5'tatttgcggaacggctattcattgccatgtagcgtccac3'
mut_stop_phzA_Rev	5'gaaaaccaggggtgagccgcttccgtgg3'
mut_stop_phzA_For	5'ccacggaaagcggctaaccctggttttc3'
phzA_KO_F	5'gaacccgatacagaaactgcgtgc'
phzA_KO_R	5'PO ₄ -ccctgtaccgctgaccgttc 3'
fragmentFOR	5'atgaacggtcagcgggtacaggatgggggcatcatccatg3'
fragmentREV	5'aggtagcgggtgcttccagccttatcagggtgcagggcg 3'
VectorFOR	5'ggctggaagcaccgctac3'
VectorREV	5'cctgtaccgctgaccgttca3'
pBRrevBam	5'ggtgatgctggcgatatagg3'
rrnBT1term_R	5'gagagcgttcaccgacaaac3'

■ Mutação de uma base

Para as amplificações, foram preparadas duas rea es de PCR, uma para o fragmento e outra para o vetor (1:1). Foram preparadas rea es com aproximadamente 50 ng.µL⁻¹ do plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE*, 2,5 µL do mix dos primers correspondentes com concentra o de 10 pmol.µL⁻¹ cada, 25 µL de tampão *2X Platinum™ SuperFi™ II PCR Master Mix* (Invitrogen), já contendo a enzima Taq DNA polimerase, além de água para completar 50 µL.

Com as rea es de PCR montadas foi possível submeter as mesmas por ciclos térmicos com a seguinte configura o: Um ciclo a 98 C, por 30 segundos; 30 ciclos com duas etapas,

sendo a primeira de 98°C por 10 segundos, e a segunda a 72°C, por quatro minutos; e ao final, um ciclo de 72°C, por cinco minutos. Após o final dos ciclos térmicos, as amostras foram resfriadas a 4°C e foi adicionado 1 µL da enzima *DpnI* (*FastDigest*, *Thermo Scientific*), e as reações foram incubadas por 1 hora a 37°C. Esta etapa é necessária para digestão dos moldes plasmidiais utilizados, em seus sítios de restrição metilados para a enzima.

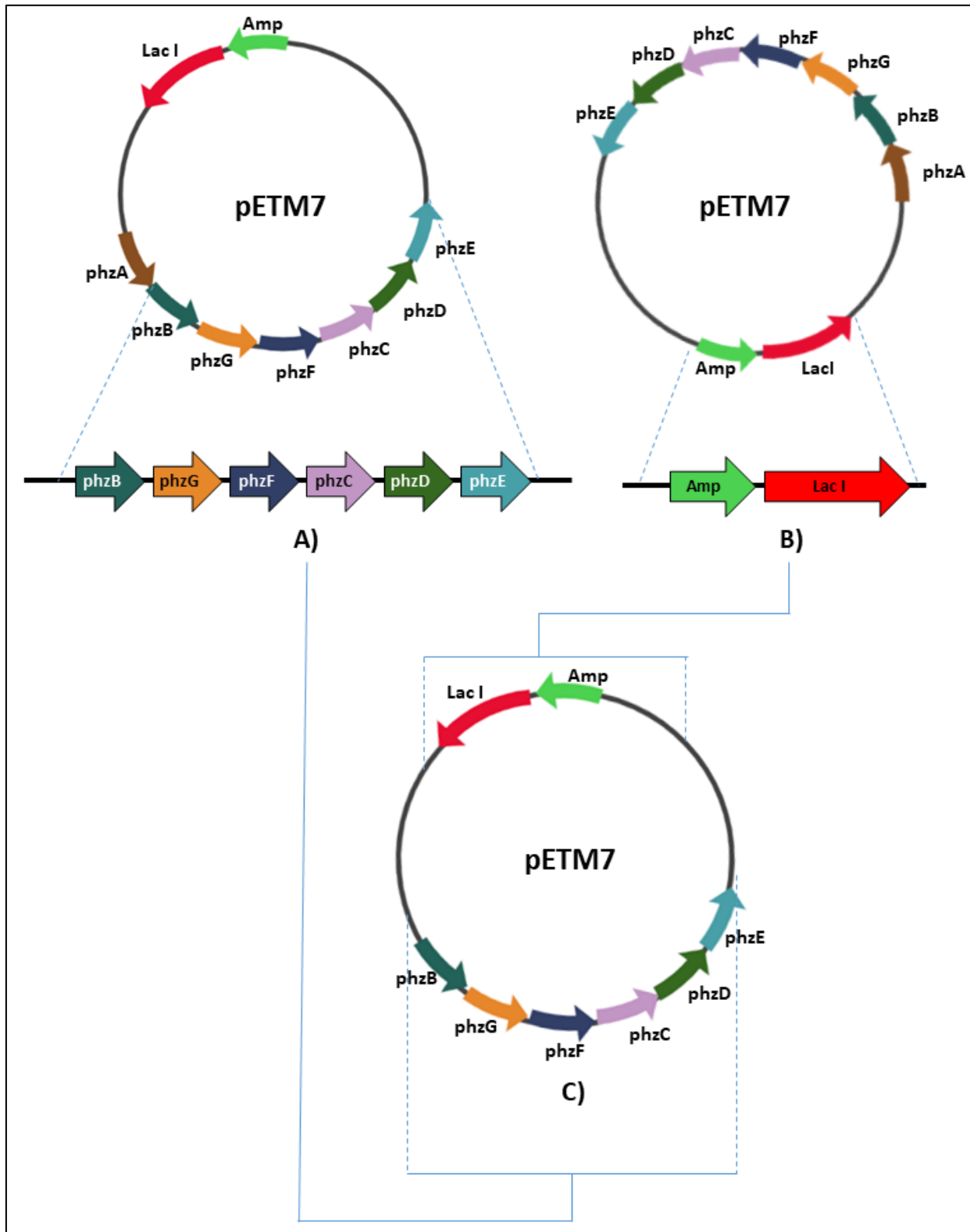
Foi realizada a purificação dos produtos da PCR usando-se o kit Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega®), segundo instruções do fabricante, e os amplicons foram eluídos em 35 µL de água ultrapura a 60°C e quantificados em *NanoDrop*.

Por fim, o inserto e o vetor compartilham sequências sobrepostas em ambas as extremidades. Após desnaturação e hibridização, a inserção e o vetor hibridizarão e se estenderão usando um ao outro como um modelo para formar um plasmídeo de fita dupla completo, deixando apenas um corte em cada fita, para isso foi misturado o vetor linearizado com o inserto, sem adicionar nenhum iniciador de PCR, em uma mistura de reação de PCR típica.

As regiões de sobreposição entre o inserto e o vetor foram projetadas para ter temperaturas de fusão semelhantes (T_m), que estavam normalmente entre 60-70 ° C. Foi realizada a clonagem de CPEC da mesma forma que se execulta um ciclo de PCR usando uma DNA polimerase de alta fidelidade.

O esquema a seguir (figura 7) mostra a simulação e amplicons que deveriam ser obtidos após a etapa de PCR, e a representação da ligação dos fragmentos.

Figura 7 - Representação da clonagem por *CPEC*. A) Amplificação do vetor, contemplando os genes do operon, exceto o *phzA*. B) Amplificação do inserto, além de gene de resistência ao antibiótico ampicilina; C) A ligação e recircularização do plasmídeo, gerando a construção *pETM7_phzBGFCDE*.



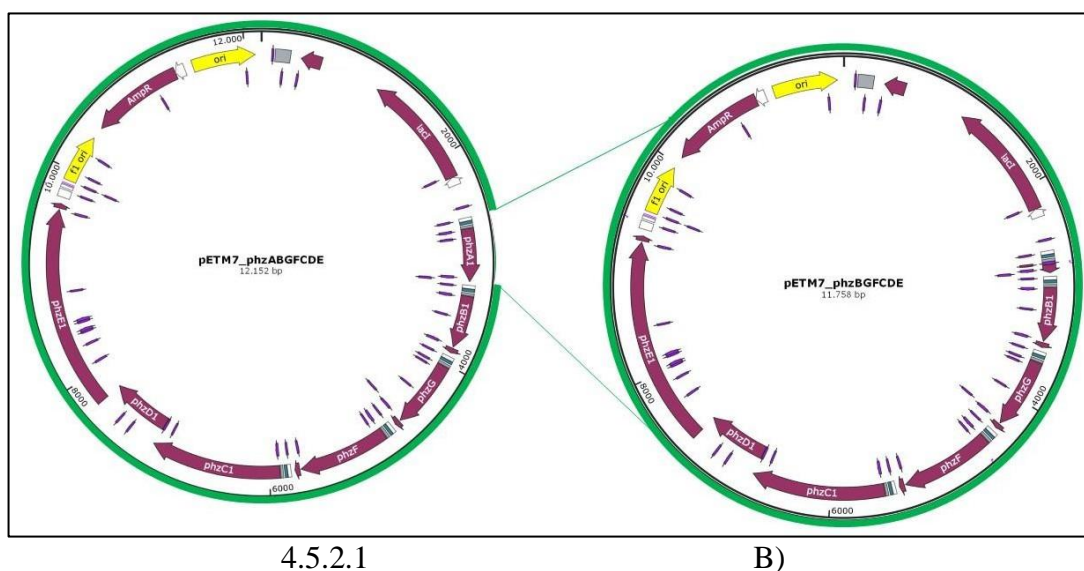
4.5.2 Construção do plasmídeo *pETM7_phzBGFCD* pela técnica “Round the horn”

Ainda em relação à remoção do gene *phzA* do plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE*, propôs-se aqui a aplicação da clonagem via *Round the Horn*, também descrita na literatura para introduzir mutações dirigidas (MOORE E PREVELIGE, 2002). Nessa técnica, é feita uma reação de PCR para amplificar apenas a região desejada do vetor usado como molde. Além disso, o primer reverso deve possuir uma fosforilação em sua extremidade 5'. Dessa forma, após a amplificação, é possível fazer a ligação das extremidades dos amplicons, gerando o plasmídeo recircularizado.

Para essa etapa foram desenhados os primers *phzA_KO_F* e *phzA_KO_R* (Tabela 1), no sentido de amplificar toda a região do plasmídeo menos a sequência correspondente ao gene *phzA*.

Na figura 8 encontra-se a simulação realizada na plataforma *SnapGene*® para a clonagem em que se tem o plasmídeo molde *pETM7_phzABGFCDE* (A) e a linha verde indica a região amplificada na reação de PCR, resultando no plasmídeo *pETM7_phzBGFCD*.

Figura 8 - Simulação (*SnapGene*®) da amplificação do plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE* sem o gene *phzA*. (A) *pETM7_phzABGFCDE* (B) *pETM7_phzBGFCD*



4.5.2.1

B)

Fonte: Autor.

A reação para clonagem foi preparada com 1 μL do plasmídeo molde *pETM7_phzABGFCDE* (concentração = $141 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 2,5 μL do mix dos primers *phzA_KO_F* + *phzA_KO_R* com concentrações $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ cada, 25 μL de tampão 2X *Platinum™ SuperFi™ II PCR Master Mix (Invitrogen)*, já contendo a enzima *Taq DNA polimerase*, além de 21,5 μL de água para completar 50 μL .

A condição utilizada para a PCR foi em seu primeiro ciclo adotar a temperatura de 98°C por um minuto; em seguida, no segundo estágio, aplicou-se 26 ciclos reduzindo temperatura para 96 °C por 30 segundos seguidos de redução da temperatura para anelamento dos primers a 57°C durante 30 segundos e 72°C por 6 minutos; por fim, no último estágio foi mantida por 5 minutos a temperatura de 72°C, sendo resfriada a amostra até 4°C. Após acabar a reação de PCR foi adicionado 1 µL da enzima *DpnI* (endonuclease de restrição que reconhece e cliva sequências de DNA específicas que contêm um sítio de metilação específico). As amostras foram então visualizadas em gel de agarose e purificadas seguindo protocolo da *Promega*® (*Wizard*® *SV Gel and PCR Clean-Up System*).

4.5.3 Recombinação homóloga

Para promover a produção da fenazina PDC, além da deleção do gene *phzA*, foi encontrado na literatura (RUI *et al.*, 2012) que a deleção dos genes *phzB* e *phzG* aliados a adição dos genes *esmA1* e *esmA2* poderiam potencializar a produção desse composto. Os genes *esmA1* e *esmA2* são oriundos da bactéria *Streptomyces antibioticus* Tu 2706, e fazem parte do cluster gênico para produção da fenazina esmeraldina. Para testar essa hipótese, os genes *esmA1* e *esmA2* foram sintetizados (*GenScript*®) para subclonagem no plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE*. Essa subclonagem foi planejada de forma a eliminar os genes *phzA*, *phzB* e *phzG* do plasmídeo utilizando a clonagem por recombinação homóloga em *E. coli* (JACOBUS E GROSS, 2015).

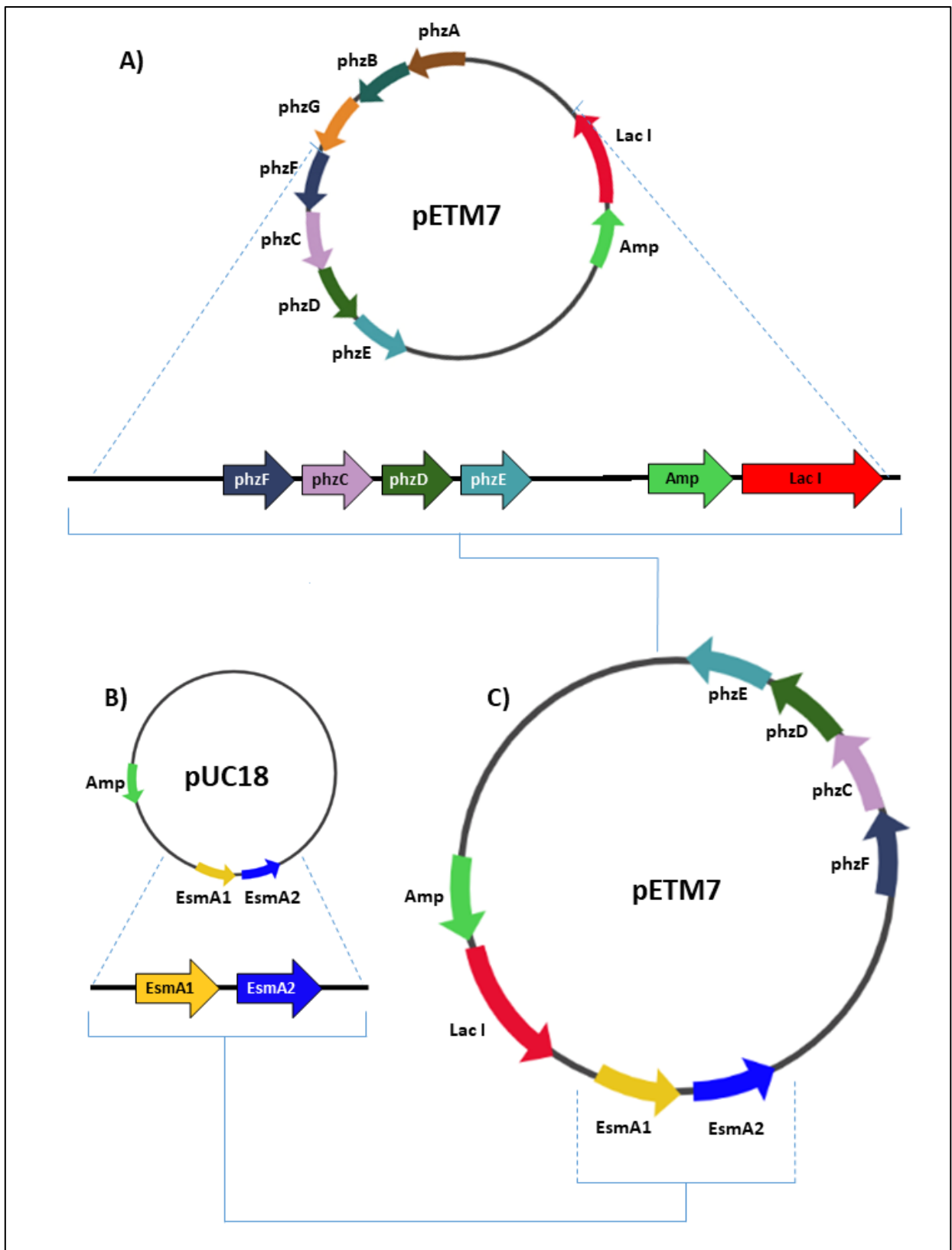
Nessa técnica, é feita a amplificação por PCR do inserto de interesse e do plasmídeo desejado e, para isso, são utilizados primers desenhados de tal forma que o inserto e o plasmídeo amplificados possuam extremidades complementares entre si.

A amplificação de PCR dos plasmídeos receptores foi realizada a partir de 0,5 ng de DNA de molde, o vetor *pETM7_phzABGFCDE*, em um volume de reação de 50 µL, assim como para o inserto *pUC18_esmA1esmA2*. A etapa de PCR foi realizada segundo recomendação da enzima *Taq Platinum™ SuperFi™ II PCR Master Mix (Invitrogen)*, utilizando os primers foram projetados para se parearem especificamente com sequências adjacentes ao local de inserção desejado no DNA alvo, permitindo a amplificação seletiva dessa região específica para facilitar a inserção do inserto através da recombinação homóloga

Após purificação dos amplicons, ambos foram misturados e utilizados para transformar células de *E. coli* DH5α competentes, e a própria maquinaria da célula recombina o inserto e o vetor linear a partir de suas extremidades complementares, gerando um plasmídeo circular

fechado. Na tabela 1 pode-se observar os primers desenhados para a realização dessa clonagem, seguida da figura 9 que representa o esquema da clonagem.

Figura 9 – Esquema da amplificação do vetor e do inserto por recombinação homóloga em *E. coli* para substituição dos genes *phzA*, *phzB* e *phzG* pelos genes *esmA1* e *esmA2*, gerando o plasmídeo *pETM7_phzEsmA12_FCDE*.



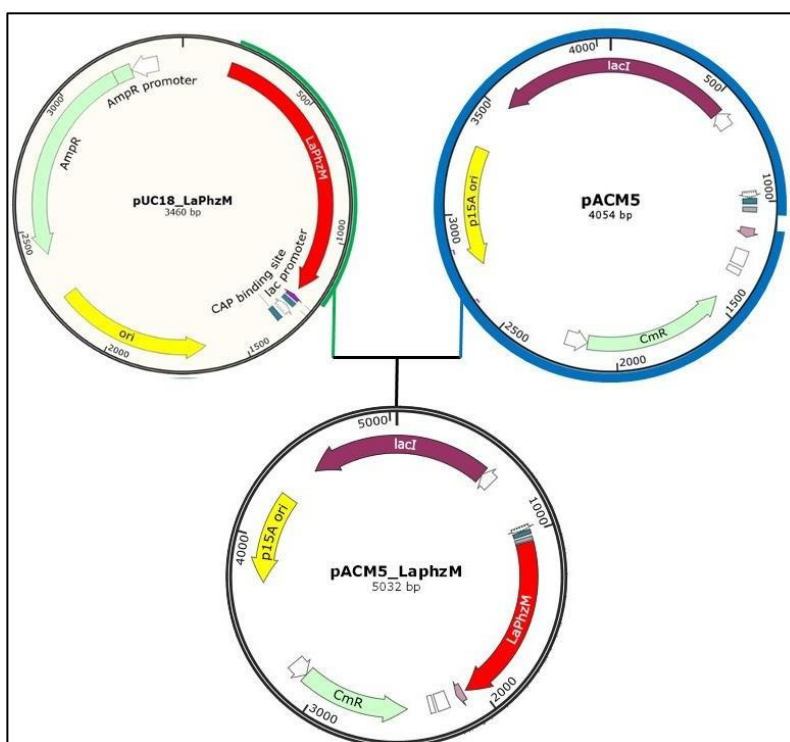
Fonte: Autor.

4.6 Construção dos plasmídeos para produção da 1-metoxifenazina (PMO)

A fenazina PMO (Metoxifenazina) é derivada da PCA e, por isso, se faz necessário o plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE* juntamente com os genes acessórios responsáveis pela conversão da PCA em 1-hidroxifenazina (POH) e por fim em PMO. Os genes acessórios correspondem ao *phzS* de *P. aeruginosa*, para conversão da PCA em 1-hidroxifenazina (POH), e o gene *laphzM* de *Lysobacter antibioticus* para conversão da POH em PMO. O gene *phzS* já se encontrava clonado no plasmídeo *pACM5* (estoque do laboratório), e o gene *la_phzM* foi sintetizado por uma empresa especializada (*GenScript®*) utilizando o vetor *pUC18*.

Após inserir o *pUC18_laphzM* em células de *E. coli* DH5 α , por choque termico, para sua propagação, foi feita a extração do plasmídeo e o gene de interesse (*laphzM*) foi recuperado por digestão utilizando as enzimas *NdeI* e *KpnI*. As mesmas enzimas foram utilizadas para digestão do plasmídeo a ser utilizado neste trabalho, o *pACM5*. Após a purificação dos produtos das reações de digestão, foi feita a ligação e transformação de células competentes para obtenção do plasmídeo *pACM5_laphzM*, conforme ilustrado pelo esquema da figura 10 que representa o processo da subclonagem desse gene.

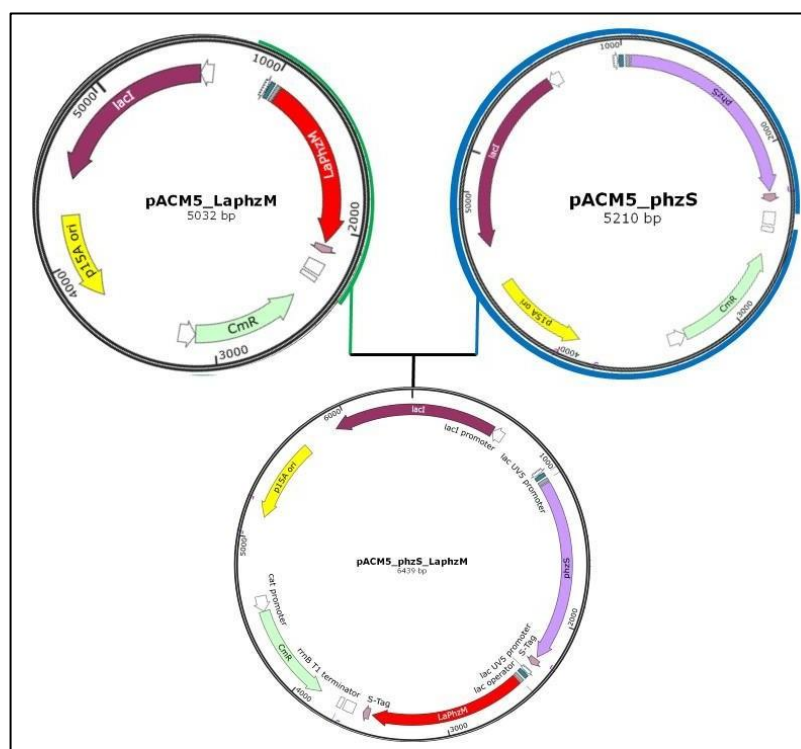
Figura 10 – Esquema da clonagem do gene *laphzM*, a partir do plasmídeo *pUC18* por digestão usando as enzimas de restrição (*NdeI* e *KpnI*) para um novo vetor, o plasmídeo *pACM5*, que foi linearizado utilizando as mesmas enzimas de restrição citadas. Resultando no *pACM5_laphzM*.



Fonte: Autor.

Uma vez que o gene foi realocado no *pACM5*, foi então construído de forma pseudo-operon o plasmídeo *pACM5_phzS_laphzM* na configuração de pseudo-operon, para que cada gene possua seu próprio promotor e compartilhem um mesmo terminador ao final. Para isso, utilizou-se o protocolo descrito por Xu et al., (2012), com o plasmídeo *pACM5_phzS* sendo digerido com as enzimas *SpeI* e *SalI*, e o plasmídeo *pACM5_laphzM* digerido com *AvrII* e *SalI*. Os produtos das digestões foram ligados, dando origem ao plasmídeo *pACM5_phzS_laphzM*, conforme ilustrado na figura 11.

Figura 11 – Esquema da clonagem do plasmídeo *pACM5_phzS_laphzM*. Foram utilizadas as enzimas de restrição *AvrII* e *SalI* para isolar o gene *laphzM* e as enzimas *SpeI* e *SalI* para linearizar o plasmídeo *pACM5_phzS*, novo vetor para ambos os genes. Assim resultou no produto *pACM5_phzS_laphzM*.



Fonte: Autor.

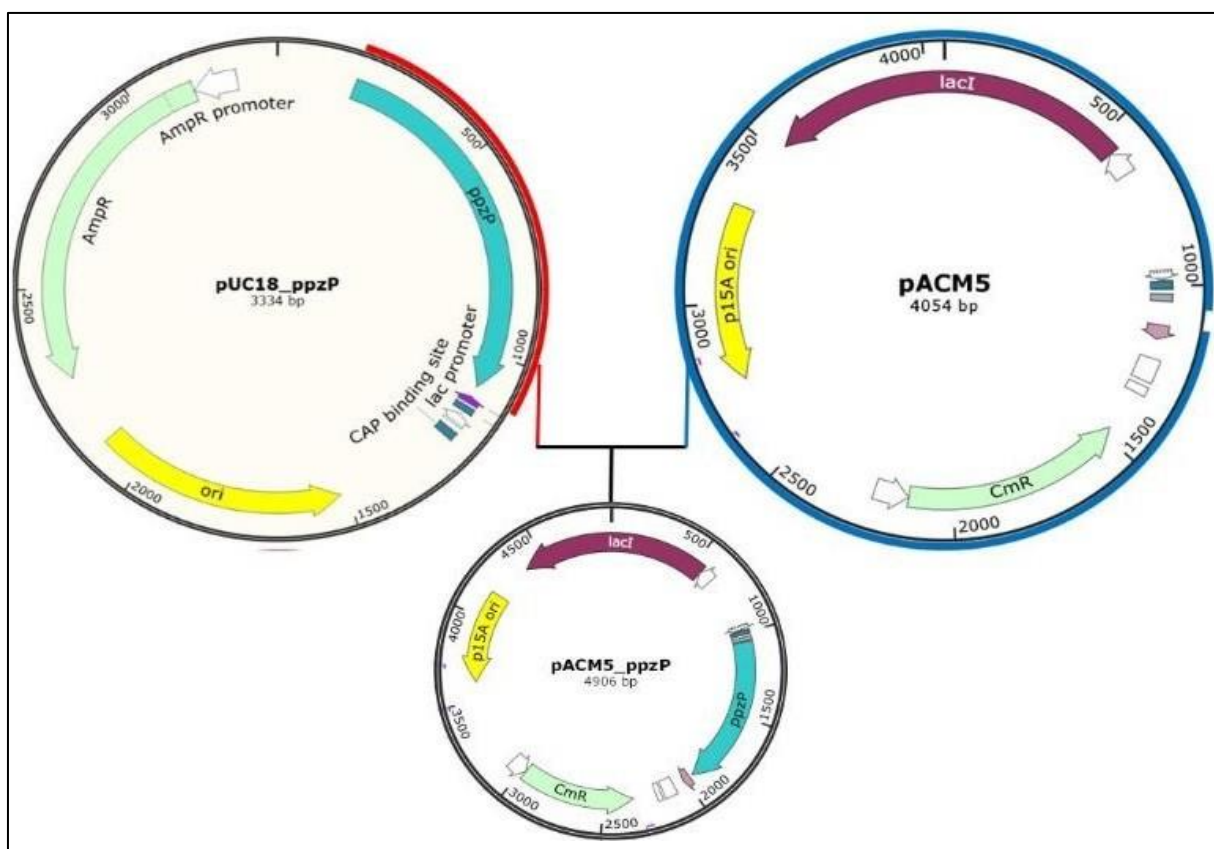
Uma vez construído o plasmídeo que carrega os genes acessórios para conversão da PCA em PMO, este foi transformado na linhagem de *E. coli* QH4-PCA (linhagem QH4 carregando o plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE*, que codifica os genes para produção da PCA).

4.7 Construção dos plasmídeos para produção da endofenazina A

A endofenazina A é uma fenazina terpenóide derivada da PCA que apresenta um grupo

prenil em sua estrutura. Para adição dessa modificação no anel, é necessária a expressão do gene *ppzP* de *S. anulatus* que codifica uma preniltransferase. Esse gene acessório foi sintetizado (*GenScript*®) no vetor *pUC18*. Após propagação deste plasmídeo em *E. coli* DH5 α , o mesmo foi extraído e digerido com as enzimas *NdeI* e *KpnI*, e ligado ao plasmídeo *pACM5* previamente digerido com as mesmas enzimas, conforme ilustrado na figura 12.

Figura 6 – Esquema da clonagem do plasmídeo *pACM5_ppzP*. O gene foi isolado de seu vetor (*pUC18*) utilizando as enzimas de restrição (*NdeI* e *KpnI*) para um novo vetor, o plasmídeo *pACM5*, que também foi linearizado utilizando as mesmas enzimas de restrição citadas. Resultando no *pACM5_ppzP*



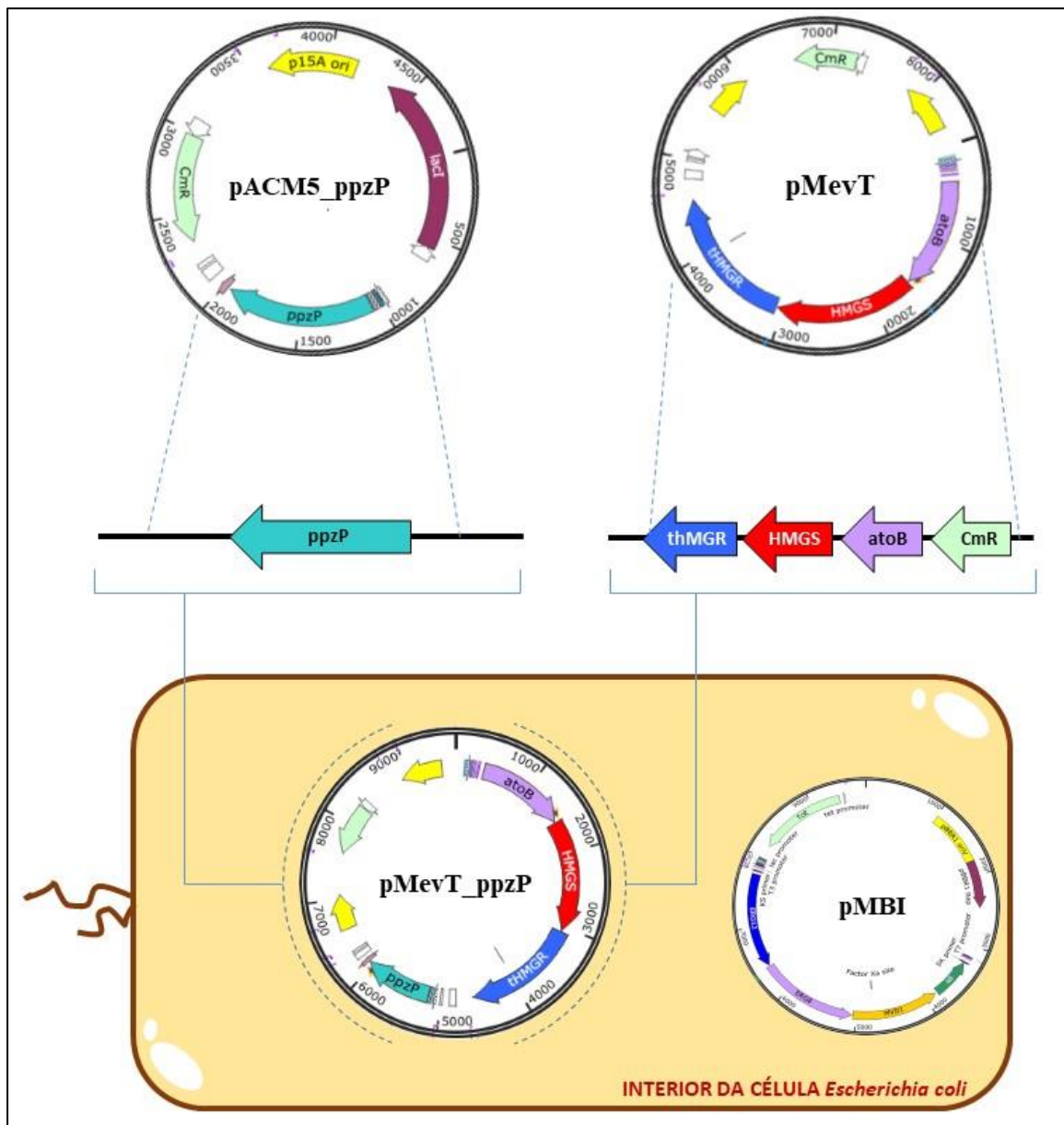
Fonte: Autor.

O grupo prenil que deve ser adicionado à PCA para formação da endofenazina A é o composto dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (SALEH *et al.*, 2009), que é um isômero do isopentenil pirofosfato (IPP), ambos sendo os precursores universais da biosíntese de isoprenóides. O DMAPP é naturalmente produzido por *E. coli*, porém em baixas concentrações. Para aumentar a disponibilidade deste precursor para a biosíntese da endofenazina A, foram adquiridos os plasmídeos *pMevT* (Addgene #17815) e *pMBI*

(Addgene #17816) que codificam a via do mevalonato de *S. cerevisiae* para produção do DMAPP (MARTIN *et al.*, 2003). Assim como a subclonagem mencionada, o *pMBI* foi transformado juntamente com o *pMevT_ppzP* em células de *E. coli*.

A partir da técnica de clonagem por recombinação homóloga (JACOBUS e GROSS, 2015) e da utilização dos primers descritos na tabela 1, foi realizada a subclonagem do gene *ppzP* oriundo do *pACM5_ppzP* para o plasmídeo *pMevT*, dando origem à construção *pMevT_ppzP*. Na figura 13 é possível visualizar como se deu a clonagem e o produto final.

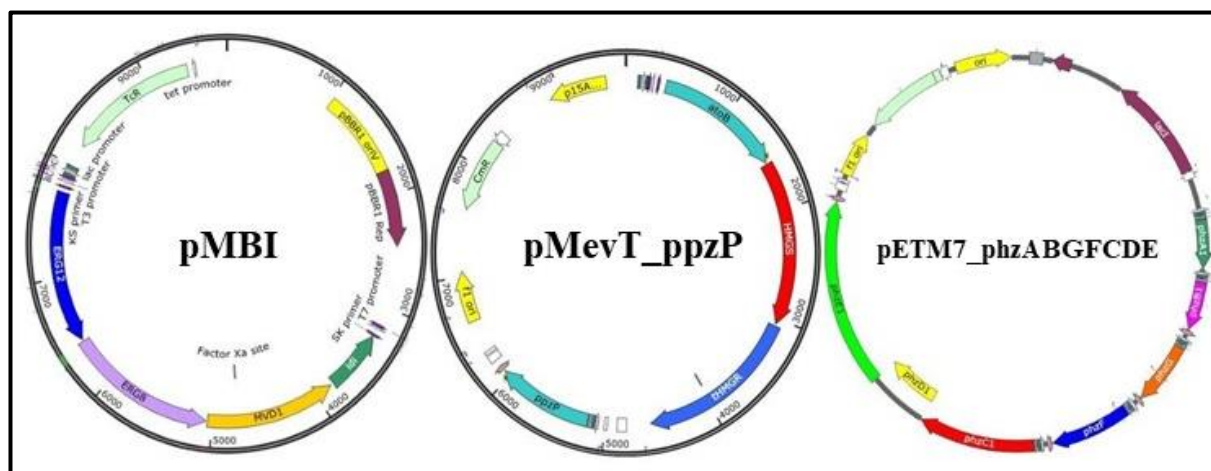
Figura 13 7- Construção do plasmídeo *acessório pMevT_ppzP* para produção da endofenazina. Na primeira PCR é amplificado apenas o gene de interesse *ppzP*, em paralelo é realizado uma segunda PCR para amplificação do veto. A ligação ocorre por homologia no interior da célula.



Fonte: Autor.

A figura 14 apresenta o esquema dos três plasmídeos necessários para a produção da endofenazina A em *E. coli* utilizados neste trabalho.

Figura 14 - plasmídeos utilizados para transformação na *E. coli* QH4: *pMBI*, *pMevT_ppzP* e *pETM7_phzABGFCDE*



Fonte: Autor.

4.8 Etapa de ligação de inserto e vetor com T4 ligase

Após a digestão do vetor e do inserto com as enzimas de restrição apropriadas, os produtos da reação são tratados com enzima de ligação T4. Para preparar a reação de ligação, é recomendado usar uma proporção vetor:inserto de 3:1, onde a quantidade de vetor é três vezes maior do que a quantidade de inserto. Por exemplo, para uma reação de 20 μ L, pode-se usar 150 ng de vetor e 50 ng de inserto.

Os componentes da reação incluem o vetor digerido, o inserto digerido, *buffer* de ligação T4, ATP e a enzima T4 ligase. A mistura é incubada em temperatura adequada, geralmente 16°C a 22°C por um período de tempo determinado, neste caso, foi deixado a reação *overnight* (16h). Após a incubação o produto final da ligação foi usado diretamente para transformação bacteriana, por choque térmico ou eletroporação.

4.9 Cultivos em frascos agitados para produção das fenazinas

Após as transformações da linhagem de *E. coli* QH4-PCA com os plasmídeos construídos com os genes acessórios, foram realizados cultivos para avaliação da produção das fenazinas aqui estudadas. Os inóculos foram preparados em tubos fálcon com 5 mL de meio LB + antibiótico(s), e as células provenientes dos estoques congelados a -80°C foram incubadas por 16 h a 30°C, 225 rpm. Volumes de 1 mL foram utilizados para inocular os

frascos da etapa seguinte.

Cada cultivo foi realizado em duplicata, a 30°C, 225 rpm, utilizando erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio TB, além de antibióticos correspondentes aos genes de resistência de cada plasmídeo. A densidade ótica (DO) foi acompanhada em 600nm até que esse valor estivesse entre 0,8 e 1 para que a concentração de 1mM do indutor IPTG fosse adicionada para indução da expressão gênica.

Ao término dos cultivos foram separadas amostras para análises no espectro de massas para confirmação ou não da produção da fenazina desejada. As amostras foram centrifugadas a 15000 rpm e o sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa 0,22 µm e enviado para análise de espectrometria de massas pela técnica Thais Castral do Centro de Processos Catalíticos e Biotecnológicos (CPCB) do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

As amostras coletadas também foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (sistema Shimadzu, Bombas HPLC 510, Injetor W717, refratômetro W410 e leitor de UV PDA W996), utilizando a coluna C18 (Sunfire Waters, Milford, EUA) a 25 °C conectada ao detector UV/VIS 365 nm, solução A: H₂O contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético, e solução B: Acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético, ambas com vazão de 0,6 mL/min. O gradiente utilizado encontra-se na tabela 2. Todas as amostras foram filtradas previamente em filtro PVDF 0,22 µm.

Tabela 2 – Gradiente das fases móveis utilizadas na quantificação das amostras de fenazinas em cromatografia líquida de alta eficiência

Tempo (minutos)	Solução	
	A(%)	B(%)
0	98	2
2	85	15
14	17	83
16	98	2
20	98	2

Para a produção da fenazina PMO, foram realizados experimentos adicionais para avaliar a influência da linhagem de *E. coli* utilizada para produção, bem como a influência da concentração do indutor e do momento de indução, conforme descrito a seguir.

4.9.1 Avaliação das linhagens de *E. coli* para produção da fenazina PMO

Para o teste das cepas, foram empregadas seis linhagens de *E. coli* disponíveis no Laboratório de Fábricas Celulares (LaFaC) do Departamento de Engenharia Química da UFSCar. Para isso, foram realizadas transformações com os dois plasmídeos (*pACM5_phzS_laphzM* e *pETM7_phzABGFCDE*) nas seguintes linhagens: QH4, DH5 α , BL21(DE3), K-12 MG1655, W e Rosetta.

Após todas as transformações foram feitos estoques para armazenamento a -80°C, posteriormente utilizados para preparação dos inóculos em 5 mL de meio LB com os antibióticos adequados. Os cultivos foram realizados em duplicata a 30°C e 225 rpm, conforme descrito, e a concentração da fenazina PMO foi determinada por CLAE.

4.9.2 Avaliação do efeito do indutor na produção da fenazina PMO

Foi avaliada a produção da fenazina PMO em diferentes concentrações do indutor IPTG utilizando uma placa de 48 poços em que cada poço foi alimentado com 5 mL de meio TB mais antibiótico. O teste foi realizado em triplicata com seis concentrações de indutor diferentes 0,0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mM. Todas as amostras foram induzidas no mesmo tempo em que chegaram na DO variando de 0,8 a 1 em absorbância de 600nm. O cultivo durou 45 horas e foram retiradas amostras de 100 μ L a cada 12 horas a partir da indução.

Cultivos em erlenmeyers agitados também foram empregados para avaliação de diferentes concentrações do indutor IPTG, sendo elas 0,25 mM, 0,5 mM e 1,0 mM. Esse ensaio ocorreu nas condições de cultivo citadas no item 4.7 porém com variação do IPTG. Ao final do cultivo as amostras foram coletadas, filtradas e submetidas a quantificação em cromatografia líquida.

Também foram avaliados diferentes tempos de indução com o IPTG. Foram realizados cultivos em placa de 48 poços, com 5 mL de meio TB por poço e os antibióticos adequados. Neste experimento a concentração de IPTG foi fixada em 1 mM porém variou-se o tempo de indução e consequentemente a DO em que as células se encontravam. Foram avaliadas as DOs de 600 nm estando entre 0,5 e 0,8 (o que levou aproximadamente 2 horas após o inóculo); DO entre 0,8 e 1 (aproximadamente 4 horas após o inóculo) e por fim com a DO estando entre 1 e 1,2 (por volta de 6 horas após iniciar o cultivo).

4.9.3 Avaliação da fonte de carbono na produção das fenazinas

Nesta etapa, foram estudadas variações na fonte de carbono, tendo sido testados xilose (12g.L⁻¹), glicose (10g.L⁻¹) e glicerol (20g.L⁻¹). Apesar da variação na massa de cada fonte de carbono, o equilíbrio químico permanece inalterado para ambas as fontes, indicando que

as mudanças na concentração desses compostos não afetam significativamente as proporções dos produtos e reagentes envolvidos nas reações metabólicas.

Os cultivos foram realizados em duplicata para cada fonte de carbono e as condições foram temperatura de 30°C, agitação de 225 rpm, utilizando erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio TB, além de antibióticos correspondentes aos genes de resistência de cada plasmídeo. A DO foi acompanhada em 600nm até que esse valor estivesse entre 0,8 e 1 para que a concentração de 1mM do indutor IPTG fosse adicionada para a produção das fenazinas. Por fim, as amostras foram quantificadas em cromatografia líquida.

4.9.4 Avaliação das fenazinas produzidas em espectrometria de massas

As fenazinas foram analisadas por espectrometria de massas utilizando-se o sistema Xevo-TQD (Waters, Milford, USA) com fonte de ionização a pressão atmosférica do tipo electrospray (ESI), operando no modo positivo. O espectro de massas foi registrado através do software *MassLynx*.

Para a otimização das condições de ionização, foi retirada diretamente do meio de cultivo 1,0 mL de amostra, no tempo aproximado de 45 h, em seguida filtrada e diluída aliquotando-se 60 µL e transferindo para eppendorf contendo 5000 µL de água ultra-pura. Esta solução diluída foi infundida no sistema a uma vazão de 50 µL.min⁻¹ e as condições estabelecidas foram: voltagem do capilar 3,6 kV, temperatura de dessolvatação 400 °C, vazão do gás de dessolvatação 1000 L.h⁻¹. A energia de colisão (CE) e a voltagem do cone foram otimizadas, para cada transição, utilizando-se o software *MassLynx* através da ferramenta de ajuste automático *Intellistart*. O espectrômetro de massas foi operado no modo *selected reaction monitoring* (SRM).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

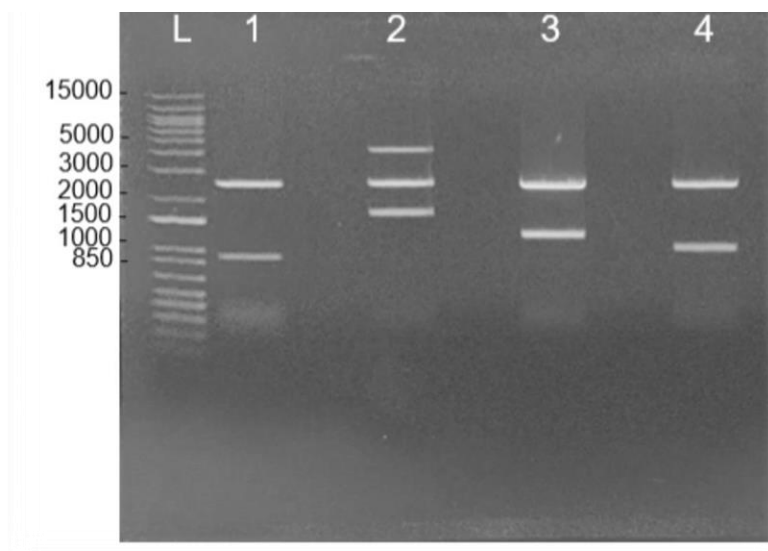
5.1 Subclonagem dos genes sintéticos

Após os genes acessórios (*ppzP*, *laphzS*, *laphzM* e *laphzNOI*) serem sintetizados, foi realizada a digestão do plasmídeo *pUC18* carregando cada um destes genes com as enzimas de restrição *NdeI* e *KpnI*. A tabela 3 lista o tamanho de cada gene sintetizado, e a figura 15 apresenta o resultado das digestões realizadas. Desconsiderar os genes *laphzS* e *laphzNOI*, pois os mesmos fazem parte de outra pesquisa, porém a eletroforese foi realizada em conjunto com genes aqui abordados.

Tabela 3 – Número de pares de base dos genes acessórios para produção de diferentes fenazinas

Inserto	Pares de base
<i>ppzP</i>	900
<i>laphzM</i>	1026
<i>laphzNOI</i>	1629
<i>laphzS</i>	1224

Figura 15 - Eletroforese da digestão dos plasmídeos com os genes sintéticos para produção das fenazinas de interesse. Coluna L (*Invitrogen 100 bp DNA Ladder*); coluna 1: *ppzP*; coluna 2: *laphzNOI*; coluna 3: *laphzS*; coluna 4: *laphzM*. A banda entre 2 e 3 kpb corresponde ao vetor *pUC18* linearizado que possui 2686 pb. Desconsiderar colunas 2 e 3 que não serão abordadas neste estudo.



Fonte: Autor.

Após eletroforese, os genes foram purificados e quantificados em *Nanodrop*. Posteriormente, foram subclonados no plasmídeo *pACM5*, que foi digerido com as mesmas enzimas de restrição (*NdeI* e *KpnI*) e tiveram sua ligação promovida pela enzima T4 DNA ligase resultando nos plasmídeos listados abaixo na tabela 4.

Tabela 4 – Plasmídeos *pACM5* com genes acessórios para produção das fenazinas de interesse.

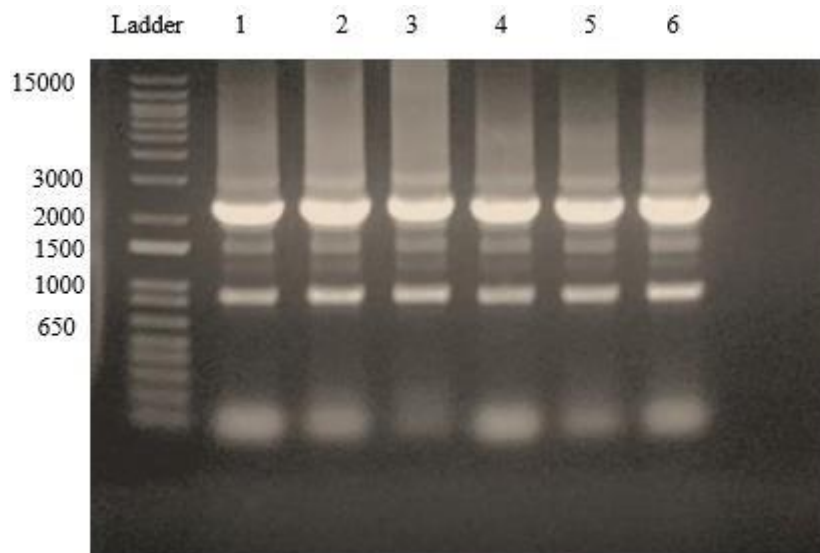
Plasmídeo construído (vetor + inserto)	Número total de pares de base
<i>pACM5_ppzP</i>	4906
<i>pACM5_laphzM</i>	5032

5.2 Produção da Fenazina-1,6-ácido dicarboxílico (PDC)

Eliminação do gene phzA via CPEC

Ao realizar a CPEC para remoção do gene *phzA* do plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE* não foram gerados resultados como os esperados pela simulação no *SnapGene*®, que seriam um produto de 6766 pb para o fragmento, e de 5082 pb para o vetor. Foram geradas bandas inespecíficas como é possível ver no gel de agarose na figura 16. É possível que os primers tenham se anelado em regiões inespecíficas e assim amplificaram bandas diferentes das necessárias para a construção do plasmídeo *pETM7_phzBGFCE*.

Figura 16 – Eletroforese do rodutos de PCR de colônias. O tamanho das bandas esperadas era de 6914 pb, porém foram geradas bandas de aproximadamente 2100pb. Coluna Ladder (Invitrogen 100 bp DNA Ladder), coluna 1-6 amostras de colônias após transformação



Fonte: Autor.

Foram realizados seis ensaios de seis diferentes colônias que cresceram na placa, para amplificação das bandas desejadas para a clonagem via CPEC e todas se comportaram da mesma forma, gerando um produto muito diferente do esperado.

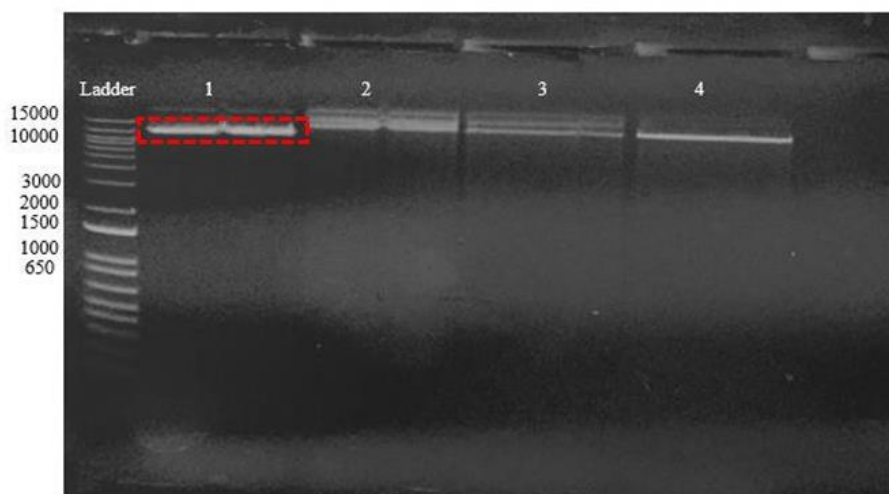
Ainda foram testadas variações nas condições de PCR do método CPEC, como variação na temperatura de anelamento, redução no volume de reação, porém continuava-se com a amplificação de produtos inespecíficos.

Dessa forma, uma abordagem alternativa à remoção do gene *phzA* via CPEC foi avaliada. A nova estratégia adotada foi a mutação sítio-dirigida, com o intuito de inserir um códon de parada no interior da sequência do gene *phzA* a fim de promover o efeito de inativação do gene.

Eliminação do gene phzA via Round the horn

Alternativamente, foi realizada a técnica de clonagem via “Round the horn” para remoção do gene *phzA* do plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE*. Após a realização da PCR foi possível identificar a banda referente ao plasmídeo sem o gene *phzA* (650 pb) que antes era de 12466 pb para o *pETM7_phzABGFCDE* e passou a ser de 11789 pb (*pETM7_phzBGFCE*) como pode ser inferido pela figura 17.

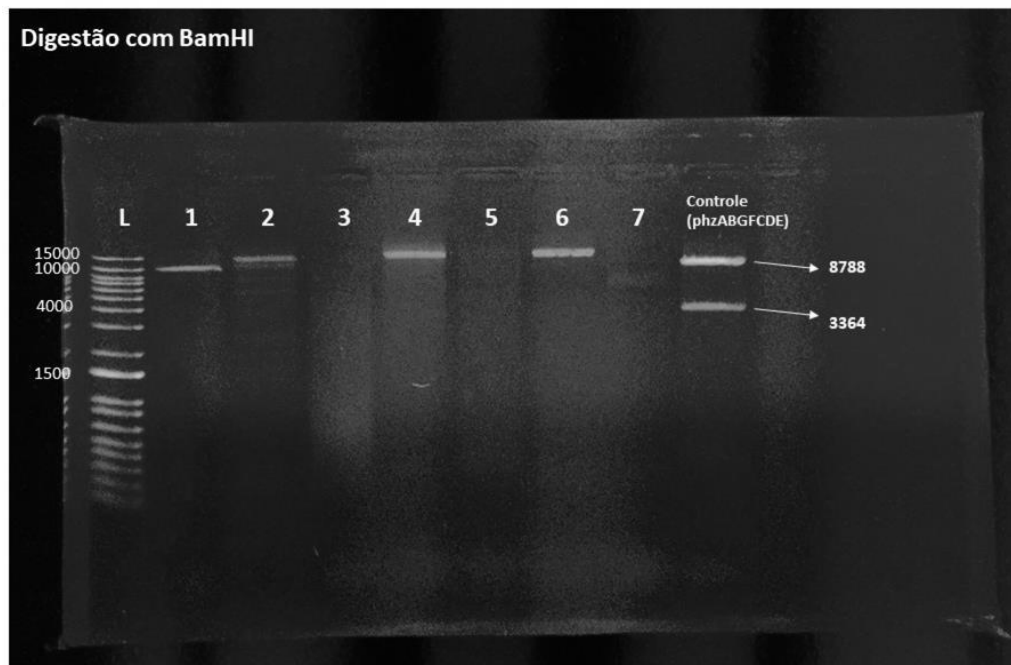
Figura 17 – Eletroforese de produto de PCR *Round the Horn*. A seta indica a amostra de 11789 pb do *pETM7_phzBGFCE*. Coluna Ladder (Invitrogen 100 bp DNA Ladder), coluna 1-4 amostras após PCR. Em tracejado vermelho: amostra recuperada do gel.



Fonte: Autor.

Uma vez que a clonagem se mostrou eficiente, essa massa de DNA foi recuperada (representado em traços vermelhos, na amostra 1) do gel, purificada e quantificada em nanodrop. O plasmídeo purificado foi utilizado para transformação de células de *E. coli* QH4. Foi realizada a extração dos plasmídeos de algumas das colônias que cresceram na placa e promovida uma digestão para análise dos plasmídeos. Identificou-se pelo mapa do plasmídeo que havia um sítio de restrição da enzima *Bam*HI no meio do gene *phzA* além de apenas mais um sítio dessa mesma enzima no restante do plasmídeo. Então, uma forma de confirmação de que o gene *phzA* não estava presente no plasmídeo obtido foi realizar a digestão com a enzima *Bam*HI: os plasmídeos que eventualmente ainda possuíam o gene *phzA* seriam digeridos em duas regiões enquanto que o plasmídeo sem o gene *phzA* seria digerido em apenas uma região. Foi feita a análise de quatro amostras mais o plasmídeo molde como controle. A figura 18 mostra o resultado da eletroforese, com produtos da digestão.

Figura 8 - Digestão das amostras de *pETM7_phzABGFCDE* e *pETM7_phzBGFCDE* com enzima de restrição *BamHI*. Coluna Ladder (Invitrogen 100 bp DNA Ladder), coluna 1-7 amostras após PCR com produto (*pETM7_phzBGFCDE*) de 11758 pb e na coluna 8 (controle) *pETM7_phzABGFCDE* com duas bandas, respectivas aos tamanhos de 8788 e 3364 pb.

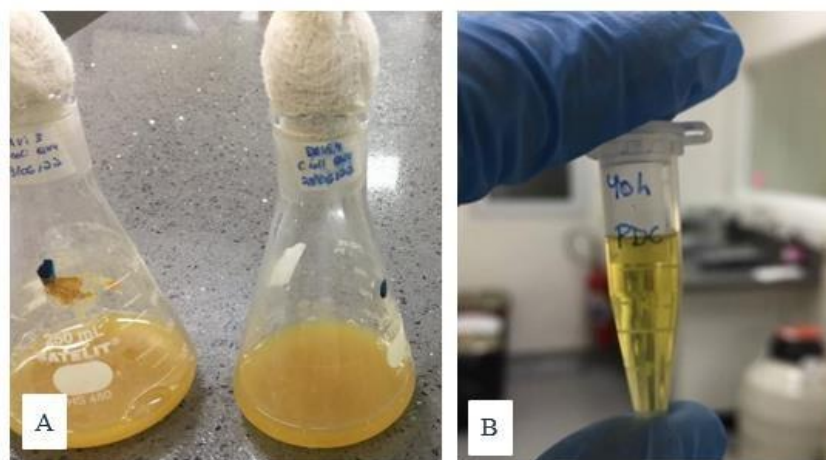


Fonte: Autor

Como esperado, as amostras de *pETM7_phzBGFCDE* apresentaram apenas uma banda e de tamanho compatível com o plasmídeo sem o gene *phzA*, enquanto que o molde teve seus dois sítios digeridos com bandas de 3364 e 8788 pb pois ainda possuía o gene *phzA* em sua sequência.

Após a confirmação de que a remoção do gene *phzA* havia sido eficiente, foi promovido um cultivo das amostras 1,2,4 e 6, para análise do sobrenadante por espectrometria de massas. É possível visualizar o cultivo na figura 19 em A) erlenmeyer após 40 h de cultivo com células e sobrenadante e B) o sobrenadante após a centrifugação e a separação das células.

Figura 19 - Cultivo da fenazina 1-6-ácido dicarboxílico. A) cultivo à 30°C em meio TB após 40 h com células em erlenmeyer. B) Sobrenadante em eppendorf de 1,5mL



Fonte: Autor.

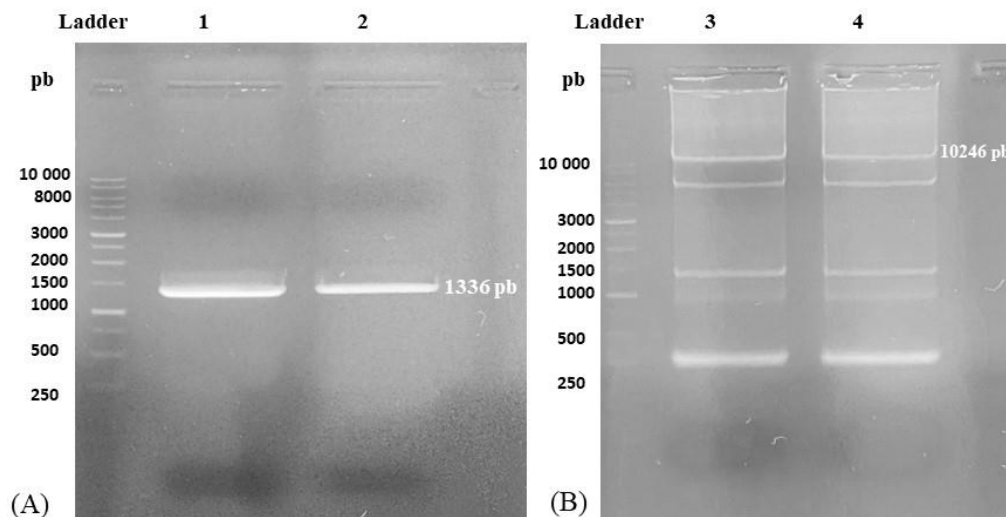
Após análise do sobrenadante em espectrometria de massas não foi possível identificar a molécula PDC.

Recombinação homóloga

Novos esforços foram realizados em relação a produção dessa fenazina. De acordo com as informações publicadas por Rui e colaboradores (2012), a expressão dos genes *phzCDEF* de *P. aeruginosa* em conjunto com os genes *esmA1* e *esmA2* de *S. antibioticus* levam à produção da fenazina PDC. Dessa forma, conforme descrito no item 4.4.3, a intenção seria promover a substituição dos genes *phzABG* do plasmídeo *pETM7_phzABGFCDE* pelos genes sintéticos *esmA1* e *esmA2* a fim de viabilizar a produção da PDC, e futuramente da fenazina iodinina.

Após a realização da PCR para amplificação dos insetos *esmA1* e *esmA2*, figura 20 (A) e do vetor *pETM7_phzFCDE* (B), foi realizada eletroforese para identificação e posterior recuperação dos amplicons. Após simulação no software SnapGene, verificou-se que os amplicons teriam 1336 pares de base para o inserto e 10246 para o vetor. Após a eletroforese essas massas de DNA foram purificadas do gel e quantificadas.

Figura 20 - (A) Eletroforese desenvolvida com os produtos de PCR do inserto *esmA1esmA2*, equivalente à 1336pb. 1 e 2 são duplicatas. (B) Eletroforese do vetor *pETM7_phzFCDE*, também feito em duplicata, 3 e 4, correspondente à 10246 pb.

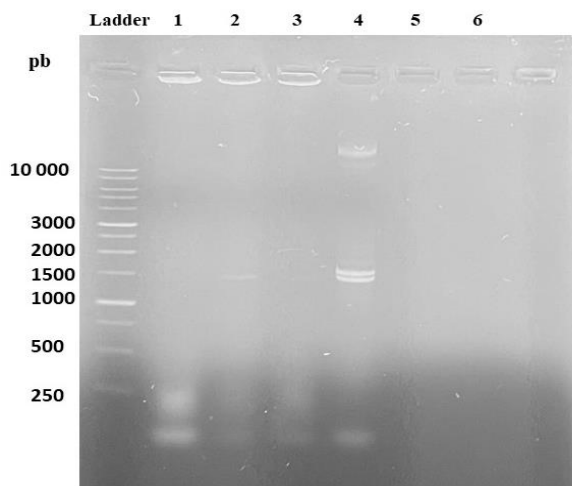


Fonte: Autor.

Uma vez que as amostras de DNA foram purificadas, o inserto e o vetor foram misturados em uma única solução, para posterior transformação em células competentes de *E. coli* DH5 α . Após a transformação, observou-se uma quantidade muito pequena de colônias na placa, mas mesmo assim essas colônias foram analisadas.

Foi realizado PCR de colônias com os primers pBRrevBam e rrnBT1term_R (amplicon esperado de 6697 pb), porém como é possível visualizar na figura 21 nenhum resultado positivo foi obtido nas seis colônias que haviam crescido na placa.

Figura 21 – Eletroforese de produtos de PCR de colônia de *E. coli* DH5 α recombinantes (*pETM7_phzFCDE_esmAIA2*). Ladder está à esquerda. De 1-6 encontram-se as colônias testadas.



Fonte: Autor.

Percebe-se que as colônias testadas apresentavam apenas resultados negativos ou não esperados. Apesar dos esforços e da aplicação de diversas estratégias de clonagem, alguns resultados não alcançaram as expectativas previstas.

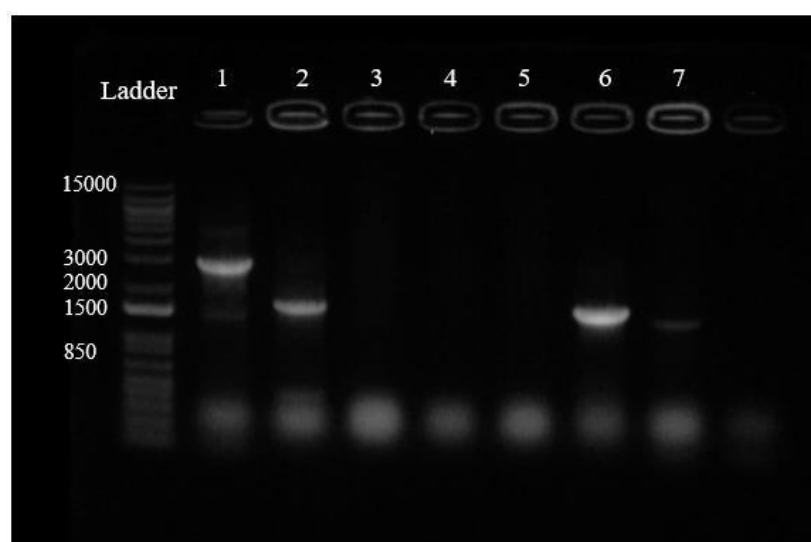
Além disso, tentativas de otimização das condições de reação, como variação na relação vetor:inserto e ajustes em suas concentrações, não produziram os resultados esperados em termos de eficiência de clonagem.

Esses resultados destacam a necessidade contínua de investigação e refinamento de metodologias para alcançar o sucesso desejado na construção de vetores e na obtenção de clones recombinantes.

5.3 Produção da 1-metoxifenazina (PMO)

Com a construção do *pACM5_phzS_laphzM* (figura 22), confirmada pela eletroforese de produtos de pcr de colônia, foi possível dar início à produção da metoxifenazina (PMO). Esse plasmídeo foi inserido nas células de *E. coli* QH4, que já possuem o plasmídeo responsável pela produção da fenazina PCA, por choque térmico

Figura 22 - Eletroforese de produtos de PCR de colônia do *pACM5_phzS_laphzM* (primers: *rrnBT1term_R* e *pBRrevBam*). Em simulação no *SnapGene*® esperava-se banda de 2841pb, confirmada na amostra da coluna 1. Coluna Ladder (Invitrogen 100 bp DNA Ladder), coluna 1-7 amostras após PCR de colônias isoladas.



Fonte: Autor.

. Após a transformação foi realizado o plaqueamento em LB ágar com os antibióticos adequados (cloranfenicol e ampicilina), e as colônias cresceram indicando que a transformação havia dado certo. Foi realizado então um cultivo de 40 horas, figura 23, em erlenmeyer de 250 mL com volume de meio de 50 mL, com indução em DO de 600 nm entre

0,8 e 1,0.

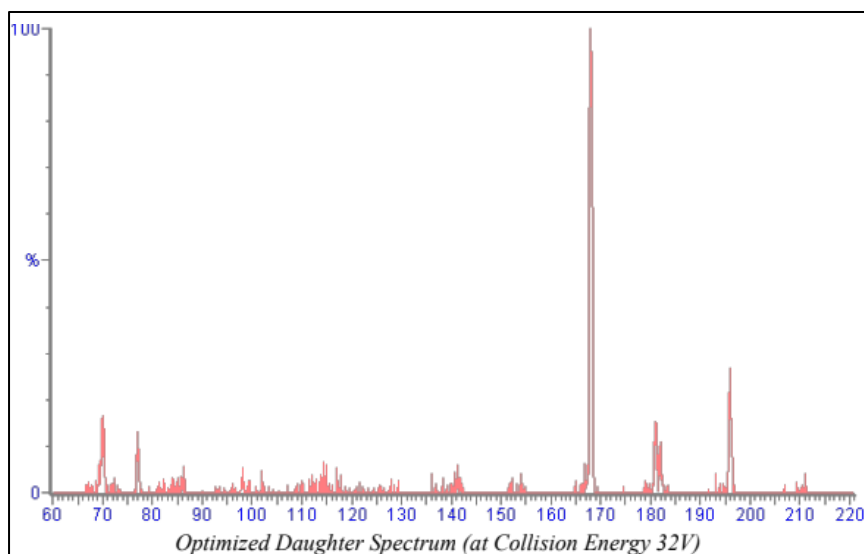
Figura 23 - Cultivo em duplicata de *E. coli* QH4 para produção de metoxifenazina (PMO), após 40h de cultivo à 30°C em meio TB.



Fonte: Autor.

Ao final do cultivo as células foram separadas do sobrenadante e esse material foi filtrado para posterior análise em espectrometria de massas. A análise foi feita pela técnica Thais Castral do CPCB do DEQ/UFSCar, que confirmou a massa da metoxifenazina produzida de forma heteróloga por *Escherichia coli* de 210,2 g/mol como reportam os bancos de dados (PUBCHEM, 2022) A análise permitiu observar as transições 210,98 → 168,03 cone: 46 V CE: 32 V e 210,98 → 196,03 cone: 32 V CE: 32 V como é possível observar na figura 24.

Figura 24 - Espectro de massas de íons produzidos referentes a fragmentação da massa 210,98 Da (PMO) utilizando energia de colisão de 32 V

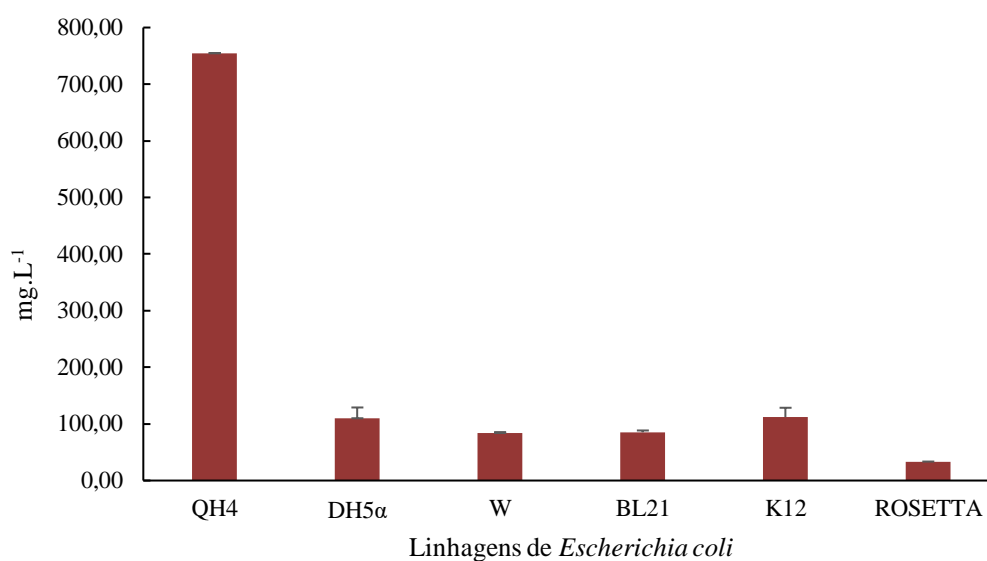


Fonte: Autor.

Ainda em relação a produção da PMO, decidiu-se testar a produção dessa molécula nas linhagens disponíveis no laboratório. Então foram realizadas transformações por eletroporação em seis diferentes linhagens, posteriormente cultivadas em shaker (225 rpm, 30°C).

Após o cultivo, as amostras foram analisadas por CLAE para avaliar se o genótipo da cepa pode exercer alguma influência na produção do composto de interesse. A seguir, na figura 25 é possível ver a produção após 40 h de cultivo de todas as linhagens avaliadas. É notável que houve grande diferença na concentração final de PMO entre as diferentes linhagens, com os valores atingidos variando entre 33 e 750 mg.L⁻¹. Esse resultado reforça as observações descritas por J.M. Monk et al., (2016), de que as diferenças de regulação e expressão gênica entre diferentes linhagens de *E. coli* costumam ter um impacto significativo na produtividade, rendimento e concentração final de produtos metabólicos.

Figura 25 – Concentrações de metoxifenazina produzida por diferentes linhagens de *E. coli*



Fonte: Autor.

A partir dos resultados observou-se que a linhagem que mais produziu o composto foi a QH4. Essa linhagem possui a deleção dos genes *pheA* e *tyrA*, responsáveis por converter o corismato em pefenato, que é um precursor para a biossíntese de aminoácidos aromáticos. Pelo fato do corismato ser também o precursor direto das fenazinas, é intuitivo que a eliminação de uma via competitiva que consome este composto deve aumentar sua disponibilidade para produção das fenazinas, e este fato poderia justificar o desempenho tão superior da linhagem QH4 frente as demais. De fato, a linhagem QH4 vem sendo usada em nosso grupo de pesquisa para produção de outras fenazinas, como a piocianina (SILVA et

al., 2021) e a PCA (ALTMANN, 2021), entre outras (dados não publicados).

Ainda em relação aos cultivos da PMO, pretendeu-se estudar o efeito do indutor na produção da molécula alvo. Para isso, inicialmente foram feitos cultivos com diferentes concentrações de indutor IPTG utilizando uma placa de 48 poços. Na tabela 5 é possível ver os valores da concentração de metoxifenazina após o final do cultivo de 40 horas em diferentes concentrações de IPTG.

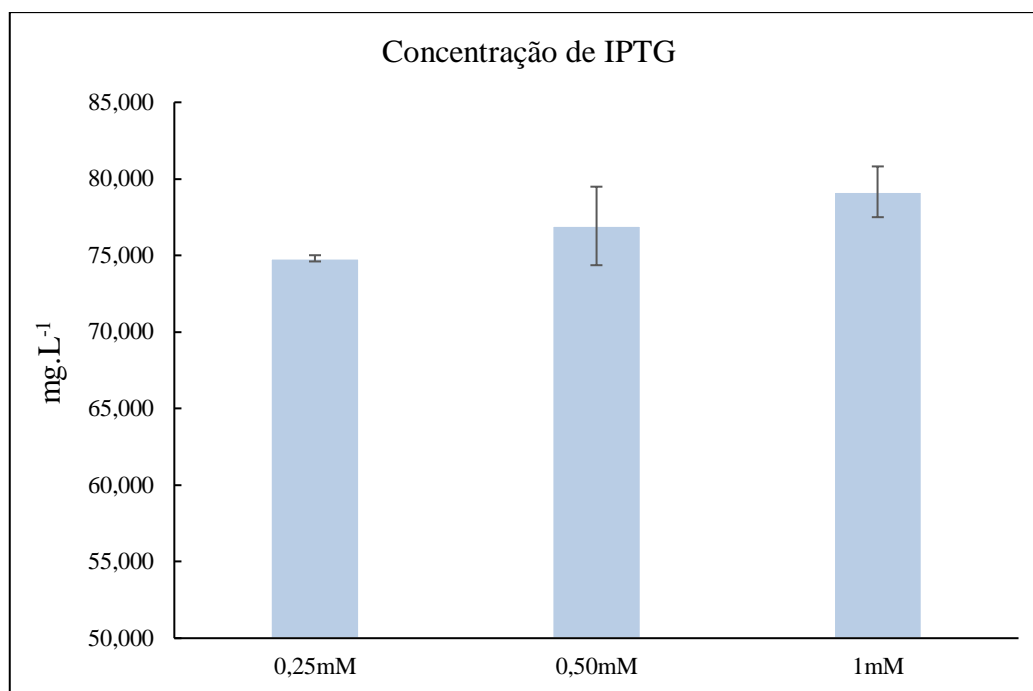
Tabela 5 - Cultivo para produção da PMO com diferentes concentrações de IPTG

Concentração de indutor (mM)	Concentração PMO (mg/L)
0	33,4 ± 0,0001
0,1	42,7 ± 0,0002
0,25	43,4 ± 0,0002
0,5	42,9 ± 0,0012
0,75	43,8 ± 0,0006
1	41,6 ± 0,0002

Nota-se que não há uma grande variação no valor das concentrações obtidas com diferentes concentrações de IPTG, com exceção da condição sem IPTG onde se atingiu a menor produção, 33,4 mg.L⁻¹. Observou-se também que os valores obtidos se mostraram bastante inferiores aos atingidos nos cultivos em frascos agitados, o que deve ser um reflexo direto da oxigenação consideravelmente menos efetiva no cultivo em placa. Como visto na figura 1, o oxigênio participa das três últimas reações da via de biossíntese da PCA, molécula precursora da PMO.

Desta forma, foi realizado um cultivo com frascos agitados, em que houvesse uma maior oferta de oxigênio. Nesta etapa, os ensaios ocorreram com apenas três variações da concentração do indutor. Os resultados encontram-se no gráfico da figura 26.

Figura 26 - Concentrações finais de metoxifenazina produzidas pela *E. coli* QH4 com variação na concentração do indutor IPTG.



Fonte: Autor

Há uma pequena variação nas concentrações finais da molécula PMO, sendo essa concentração um valor abaixo do esperado para o cultivo dessa molécula em frascos agitados, uma vez que quando estudada a fonte de carbono do meio de cultivo, concentrações mais altas foram encontradas, como será apresentado a seguir. No entanto, a maior concentração de fenazina PMO produzida nesse ensaio foi de aproximadamente 80 mg.L⁻¹, obtida a partir da concentração de indutor de 1,0 mM.

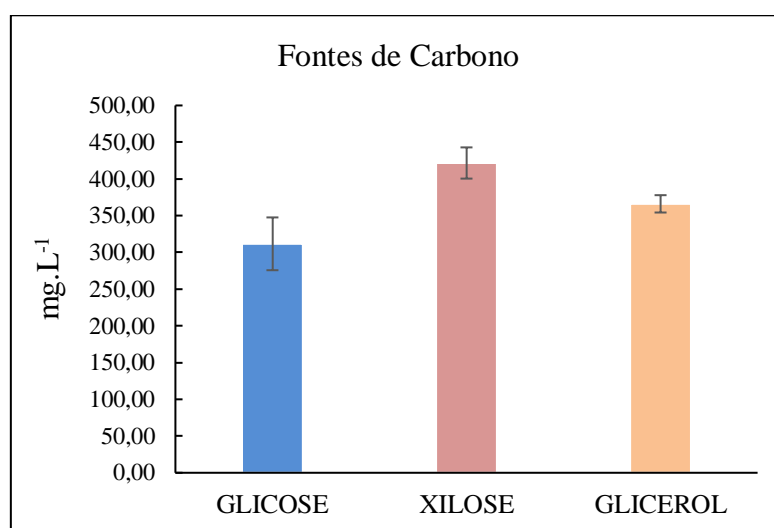
Um último cultivo relacionado ao estudo do IPTG foi realizado, porém para avaliar o efeito do momento de indução na formação da PMO. Neste experimento foi mantido o valor da concentração de indutor em 1,0 mM. Inicialmente foi realizada a indução com DO_{600 nm} entre 0,5 e 0,8, o que levou aproximadamente três horas após a inoculação do cultivo. Em seguida, após mais 1 hora de cultivo, foi realizada a indução do segundo cultivo (DO entre 0,8 e 1,0) e, por fim, após duas horas do início do primeiro cultivo foi realizada a indução do terceiro cultivo, cuja DO estava entre 1 e 1,2.

Tabela 6 – Concentrações de metoxifenazina (PMO) em diferentes tempos de indução

DO de indução (600nm)	Concentração PMO (mg.L ⁻¹)
0,5 e 0,8	42,7 ± 0,0009
0,8 a 1	43,4 ± 0,0001
1 a 1,2	47,3 ± 0,0008

Pelos resultados apresentados na tabela 6 foi possível observar que as concentrações finais da PMO não variaram significativamente com os diferentes tempos de indução.

Com relação ao estudo da fonte de carbono para produção da fenazina PMO foram avaliados glicose, xilose e glicerol. Pode-se visualizar na figura 27 que a xilose apresentou destaque quanto a maior produção de metoxifenazina, com concentração final de 421 mg.L⁻¹. Esse valor representa um ganho de 15,19 % em relação ao valor médio obtido na condição com glicerol, e 35,30 % em relação à média obtida no cultivo com glicose.

Figura 27 - Concentrações finais de metoxifenazina produzidas pela *E. coli* QH4 com variação na fonte de carbono.

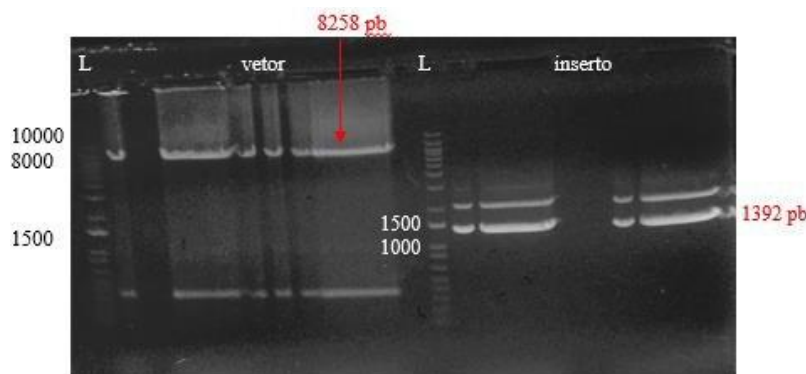
Fonte: Autor

5.4 Produção da endofenazina A

Para a produção da endofenazina A, inicialmente foi realizada a clonagem por recombinação homóloga em *E. coli* para inserção do gene *ppzP* no plasmídeo *pMevT*. Para

isso, foram realizadas reações de PCR para amplificação de ambas as partes. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose (figura 28) onde é possível identificar pelo número de pares de base o vetor (8268 pb) nas duas primeiras colunas e o inserto de 1392 pb nas duas últimas colunas do gel.

Figura 28 - Eletroforese com vetor de 8258 pares de base nas duas primeiras colunas e inserto com 1392 pares de base na terceira e quarta coluna. Ladder representado por L à esquerda.

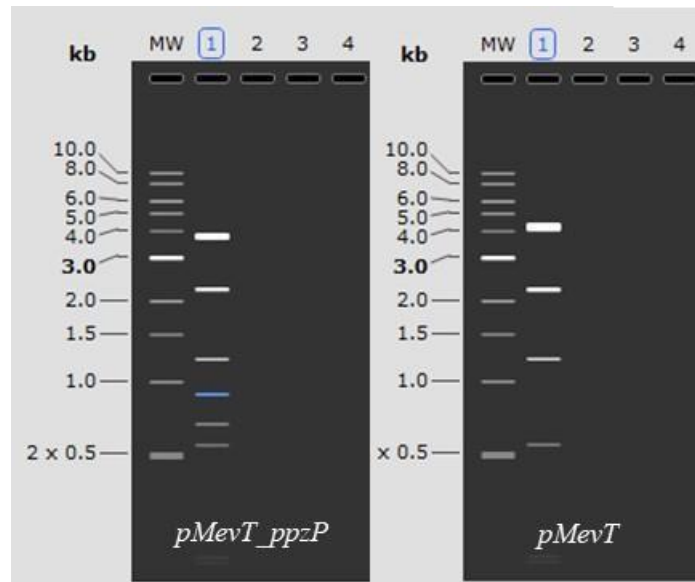


Fonte: Autor

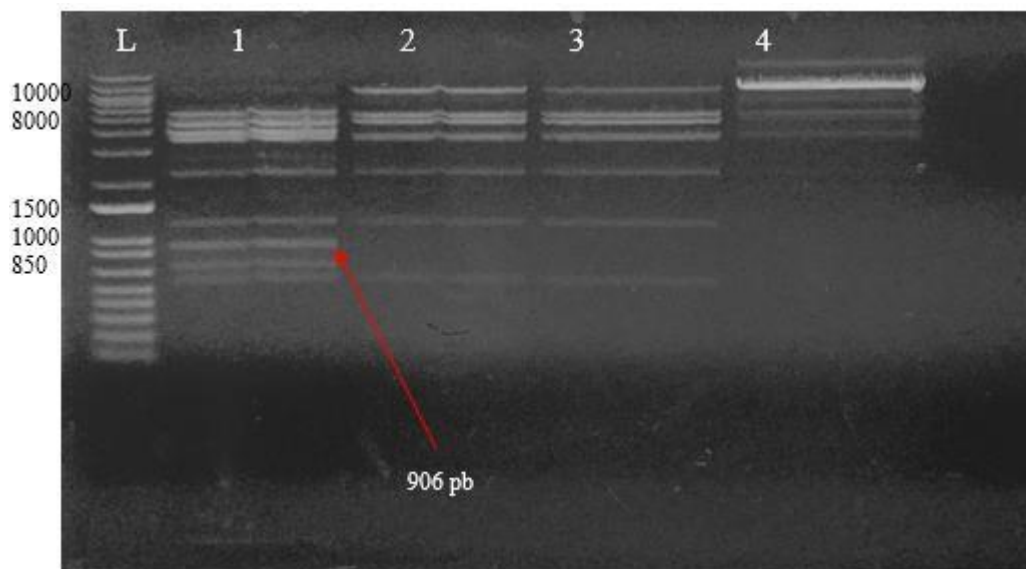
As bandas desejadas foram excisadas do gel e purificadas. Em seguida, foram utilizadas diretamente para transformação das células de *E. coli* competentes, e no dia seguinte foi realizada extração de plasmídeo de quatro colônias. Os plasmídeos obtidos foram digeridos com as enzimas *KpnI* e *NdeI*. Com essa digestão esperava-se que o plasmídeo de interesse apresentasse algumas bandas, entre as quais uma banda específica de aproximadamente 900 pb. Na figura 29 é possível ver os quatro plasmídeos digeridos extraídos de 4 colônias diferentes e apenas na amostra 1 é possível identificar as bandas esperadas segundo a simulação realizada no *SnapGene*®.

Figura 29 - (A) Simulação em SnapGene® com enzimas de restrição *KpnI* e *NdeI* para digestão do *pMevT_ppzP* e do *pMevT*. (B) eletroforese da digestão de *pMevT_ppzP* com as enzimas mencionadas.

(A)



(B)

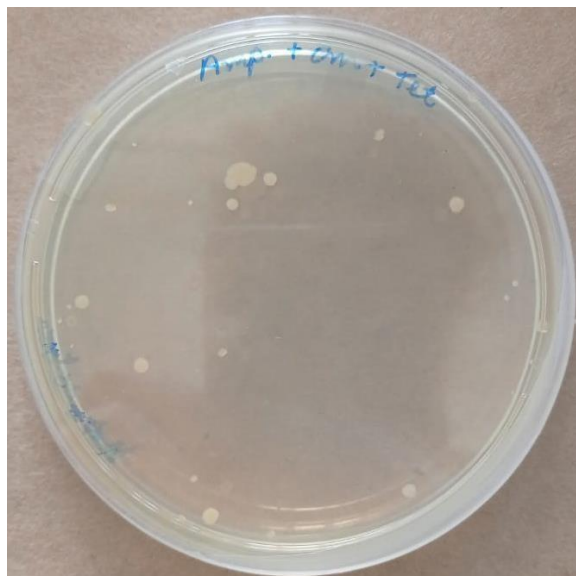


Fonte: Autor

Uma vez confirmada a construção bem-sucedida do *pMevT_ppzP* bastava apenas realizar a transformação das células de *E. coli* QH4, que já possuíam os plasmídeos *pETM7_phzABGFCDE* e o *pMBI*, por choque térmico.

Após a transformação foi possível verificar o crescimento de colônias na placa contendo os antibióticos cloranfenicol, tetraciclina e ampicilina, como indica a figura 30.

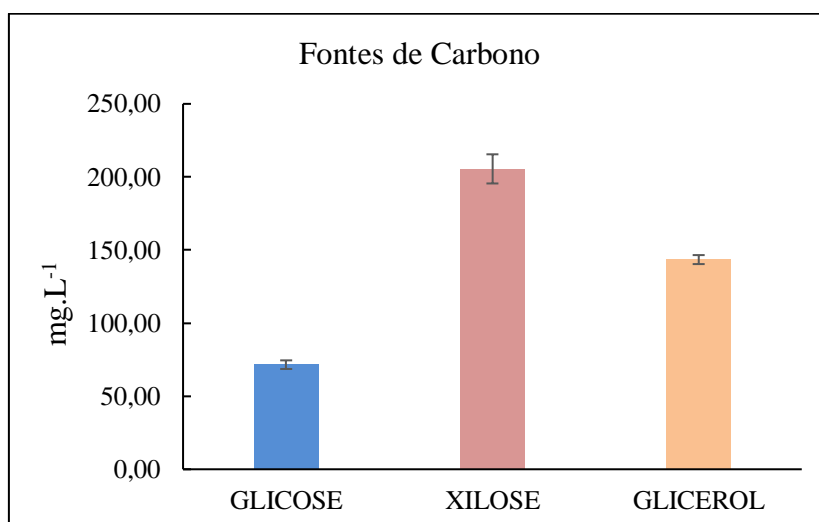
Figura 30 - Placa de Petri com meio LB+ágar (15g.L^{-1}) com antibióticos: ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol. Colônias de *E. coli* QH4 após 20 h de incubação à 37°C .



Fonte: Autor

Na produção da endofenazina A, também foram avaliadas diferentes fontes de carbono, como glicose, xilose e glicerol. No gráfico a seguir, figura 31, é possível visualizar as quantificações obtidas após análise de suas concentrações em CLAE.

Figura 31 - Concentrações finais de endofenazina A produzidas pela *E. coli* QH4 com variação na fonte de carbono.



Fonte: Autor

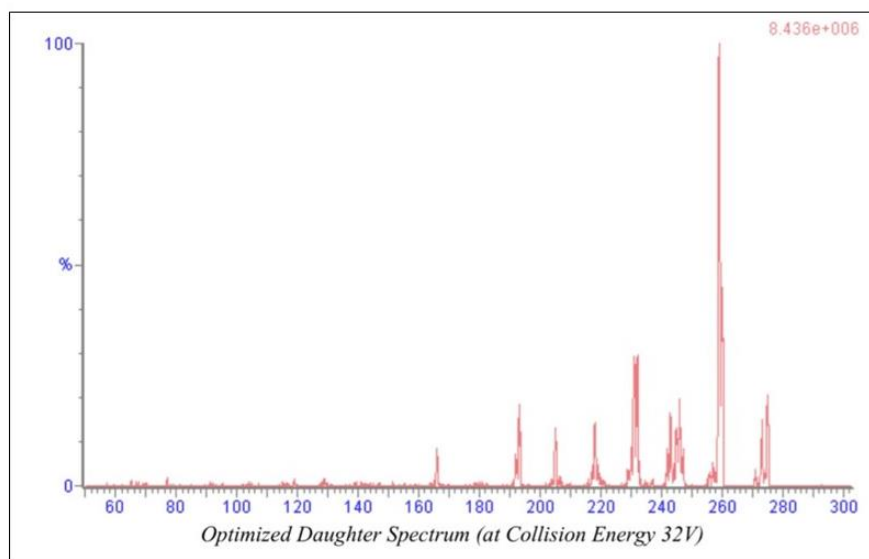
Assim como na produção da metoxifenazina (PMO), a fonte de carbono xilose destaca-se na produção da endofenazina A, obtendo-se uma concentração final levemente superior a 200 mg.L^{-1} . O mesmo foi observado em trabalhos anteriores realizados pelo grupo (NEVES,

PARANHOS, SILVA 2022), como na produção da fenazina-1-carboxiamida (PCN). Por se tratar de uma fenazina terpenóide, um aspecto crucial para a biossíntese da endofenazina A é a disponibilidade do precursor DMAPP. São conhecidas duas vias metabólicas para a síntese dos precursores IPP e DMAPP para síntese de isoprenóides, sendo a via do mevalonato (MEV) presente em eucariotos, e a via da desoxixilulose-5- fosfato (DXP) encontrada em procariotos, com algumas exceções. Em plantas, ambas as vias estão presentes (MARTIN *et al.*, 2003).

Enquanto alguns autores tentaram otimizar a via DXP, naturalmente presente em *E. coli*, para produção de carotenóides neste chassis, Martin e colaboradores (2003) realizaram a expressão da via MEV de *S. cerevisiae* em *E. coli* para evitar os mecanismos nativos de controle da via DXP que limitam a produção dos precursores IPP e DMAPP em *E. coli*. Neste trabalho, optamos por adotar a estratégia de Martin *et al.*, (2003) para a síntese do precursor DMAPP, e a produção da endofenazina A foi realizada com sucesso. Recentemente, Liu et al. (2022), realizaram a produção da endofenazina A em *Pseudomonas chlororaphis* P3 a partir da expressão do gene *ppzP* de *S. anulatus*. *P. chlororaphis* produz naturalmente a fenazina precursora PCA e também o precursor DMAPP pela via MEV, e os autores alcançaram a produção de 279,43 mg.L⁻¹ do produto de interesse.

Após a realização do cultivo da endofenazina A, foi realizado a análise em espectrometria de massa para identificação da molécula alvo, em que foi possível identificar a molécula com as transições de 293,03 → 259,14 cone: 40 V CE: 32 V e 293,03 → 231,44 cone: 40 V CE: 32 V. Na figura 32 tem-se um espectro de massas de íons produtos referentes a fragmentação da massa 293,03 Da.

Figura 32 - Espectro de massas de íons produzidos referente a fragmentação da massa 293,03 Da (Endofenazina A) utilizando energia de colisão de 32 V.

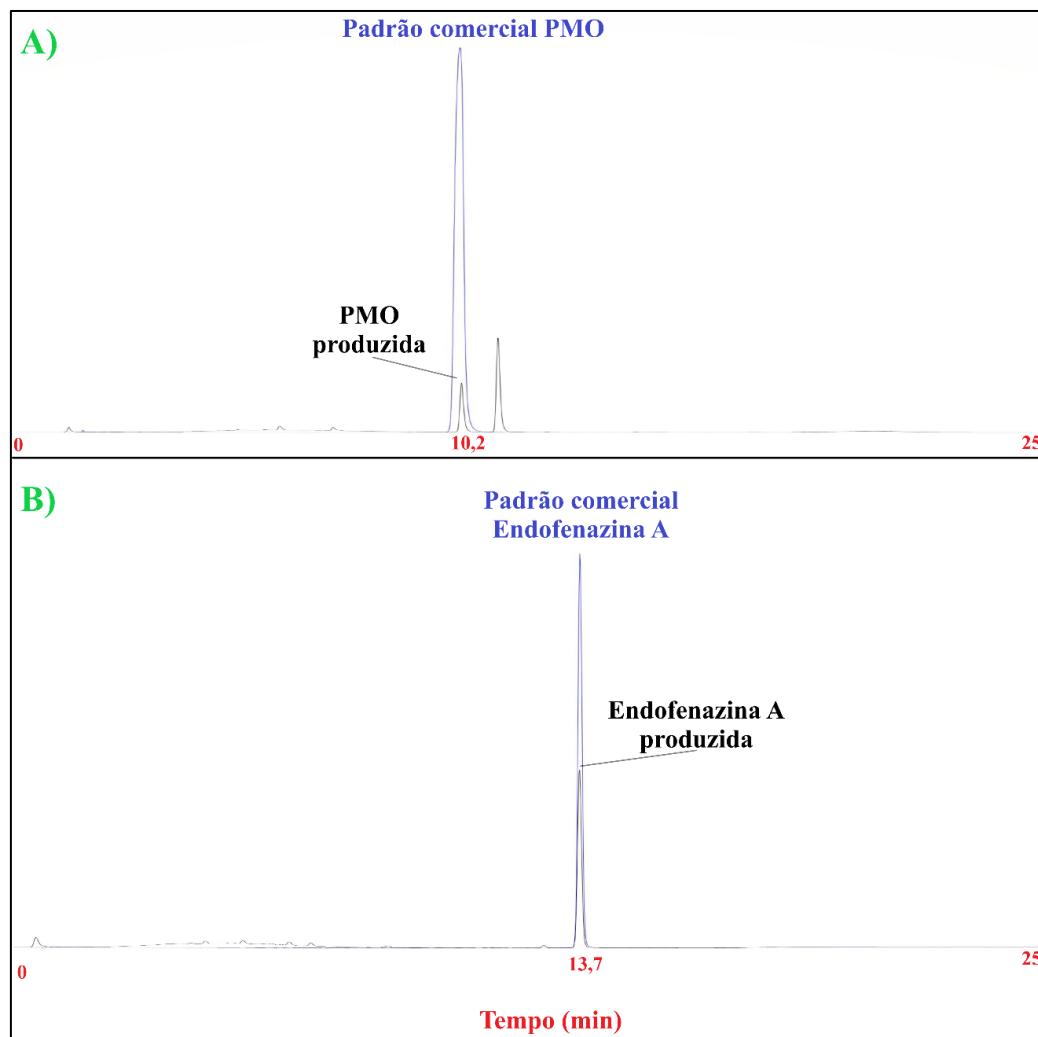


Fonte: Autor.

Na figura 33 (A), pode-se visualizar os cromatogramas resultantes da análise por CLAE, que revelaram a presença da molécula 1-metoxifenazina (PMO), conforme evidenciado pelo pico distintivo de absorção em um tempo de retenção de 10,2 minutos, o pico a seguir, pode ser referente a fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), que é sua precursora.

Já na figura 33 (B), percebe-se a presença da endofenazina A, com tempo de retenção de 13,7 minutos. Além disso, a comparação dos cromatogramas permitiu observar diferenças significativas nos padrões de eluição e na intensidade dos picos, indicando variações na composição ou na concentração dessas moléculas. Com o padrão é possível confirmar a produção de ambas as fenazinas com sucesso.

Figura 33 - Cromatogramas das Fenazinas produzidas. Tempo total de eluição. A) Comparação do tempo de retenção da 1-metoxifenazina (PMO), produzida de forma heteróloga por *E. coli* QH4 com padrão comercial (10,2 min). B) Comparação do tempo de retenção da endofenazina A, produzida de forma heteróloga por *E. coli* QH4 com padrão comercial (13,7 min). O tempo está destacado na cor vermelha.



Fonte: Autor.

6 CONCLUSÃO

Foi possível realizar a construção de plataformas microbianas baseadas em *Escherichia coli* para a produção de diferentes fenazinas, como a metoxifenazina e a endofenazina A. No caso da metoxifenazina, a hipótese de que a enzima *laphzM* de *Lysobacter antibioticus*, que realiza a metilação não seletiva de grupos hidroxilas, poderia converter a 1-hidroxifenazina em PMO foi confirmada, e a linhagem produtora foi capaz de produzir o produto de interesse em concentrações semelhantes à da fenazina precursora PCA.

Já para a endofenazina A, o gene *ppzP* de *S. anulatus* se mostrou funcional em *E. coli* para adicionar o grupo prenil na fenazina precursora. Além disso, a estratégia de incrementar a disponibilidade do grupo DMAPP, pela expressão heteróloga da via do mevalonato de *S. cerevisiae*, possibilitou a produção da fenazina prenilada em concentrações semelhantes à obtida por uma linhagem de *Pseudomonas* otimizada para produção deste composto. Com estudos de otimização da linhagem de *E. coli* produzida neste trabalho e avaliação de parâmetros de processo, deve ser possível atingir níveis ainda mais altos de produção da endofenazina A.

Com relação aos parâmetros de processo avaliados para a produção da metoxifenazina, observou-se que a linhagem QH4, que apresenta deleção em uma via de consumo de corismato, apresentou uma performance muito superior às demais linhagens de *E. coli* avaliadas, possivelmente por apresentar uma maior disponibilidade do precursor corismato utilizado na biossíntese das fenazinas. Em relação à concentração do indutor IPTG, ocorreu pouca variação nas concentrações finais das fenazinas produzidas, porém 1 mM teve a mais alta concentração de fenazina produzida, além dessa concentração já ser adotada como padrão no grupo de pesquisa.

Acerca da fonte de carbono avaliada neste trabalho, a xilose apresentou melhores resultados que a glicose e o glicerol quanto a produção das moléculas alvos, com uma concentração de 205 mg.L⁻¹ para a endofenazina A e de 421 mg.L⁻¹ para a metoxifenazina.

Entender bem esses compostos é crucial para desenvolver nova tecnologias, como medicamentos, materiais, entre outras aplicações. Isso ressalta a importância contínua da pesquisa da 1-metoxifenazina e endofenazina A, além de diversas outras fenazinas, que surgem como candidatos promissores para estudos futuros, oferecendo insights valiosos que têm o potencial de impulsionar avanços significativos na ciência e na sociedade em geral.

7 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

- Realizar o sequenciamento de todos os plasmídeos construídos, com o intuito de confirmar as clonagens.
- Repetir a técnica de recombinação homóloga para clonagem dos insertos *esmA1* e *esmA2* no vetor *pETM7_phzFCDE*, tendo em vista sua importancia como precursora de outras fenazinas, além de avaliar o uso do kit *NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix* para promover essa clonagem.
- Realizar cultivos adicionais das linhagens produtoras das fenazinas para avaliar a influência de diferentes parâmetros de processo na formação do produto, além de ampliar a escala de produção para biorreatores de bancada.
- Realizar a clonagem de genes acessórios, como *laphzS* e *laphzNO1* para produção de outras fenazinas a partir dos precursores PCA e PDC.

8 REFERÊNCIAS

AHUJA, E. G. ; JANNING, P. ; MENTEL, M.; GRAEBSCH, A.; BREINBAUER R, HILLER W, COSTISELLA B, THOMASHOW LS, MAVRODI DV, BLANKENFELDTW. PhzA/B catalyzes the formation of the tricycle in phenazine biosynthesis. **J Am Chem Soc** 130:17053–17061. 2008. DOI: 10.1021/ja806325k

ALTMANN, D. L. Aumento da produção de fenazina-1-ácido carboxílico em *E. coli*: efeito da superexpressão dos genes *tktA* e *ppsA*. Trabalho de conclusão de curso – Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 2021.

AVERESCH, N. J. H.; KRÖMER, J. O. Metabolic Engineering of the Shikimate Pathway for Production of Aromatics and Derived Compounds — Present and Future Strain Construction Strategies. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 6(), 32–.2018. DOI:10.3389/fbioe.2018.00032.

BLANKENFELDT, W. The purification, crystallization and preliminary structural characterization of FAD-dependent monooxygenase PhzS, a phenazine-modifying enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62, 989–992. 2006

BLANKENFELDT, W.; KUZIN, A. P.; SKARINA, T.; KORNIYENKO, Y.; TONG, L.; BAYER, P.; JANNING, P.; THOMASHOW, L. S.; MAVRODI, D.V. Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*.

Proc Natl Acad of Sci USA 101:16431–16436. 2004. DOI: 10.1073/pnas.0407371101

CHANDRAN, S. S.; YI, J.; DRATHS, K. M.; DAENIKEN, R. V.; WEBER, W.; FROST, J. W. Phosphoenolpyruvate **Availability and the Biosynthesis of Shikimic Acid**. , 19(3), 808–814. 2003. DOI:10.1021/bp025769p

CHELUVAPPA, R. “Standardized Chemical Synthesis of *Pseudomonas Aeruginosa* Pyocyanin.” *MethodsX*, vol. 1, 2014, pp. 67–73, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.07.001>.

DAS, T.; MANEFIELD, M.; ROHDE, H. Pyocyanin Promotes Extracellular DNA Release in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS ONE**, 7(10), e46718–. 2012
DOI:10.1371/journal.pone.0046718

DASGUPTA, D. ; KUMAR, A. ; MUKHOPADHYAY, B.; SENGUPTA, T. K.

“Isolation of Phenazine 1,6-Di-Carboxylic Acid from *Pseudomonas Aeruginosa* Strain HRW.1-S3 and Its Role in Biofilm-Mediated Crude Oil Degradation and Cytotoxicity against Bacterial and Cancer Cells.” **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 99, no. 20, 9 June 2015, pp. 8653–8665, <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6707-x>.

ELHADY, H.A.; EL-MEKAWY, R.E.; FADDA, A. “Valuable Chemistry of Phenazine Derivatives: Synthesis, Reactions And, Applications.” **Polycyclic Aromatic Compounds**, vol. 42, no. 5, 24 Oct. 2020, pp. 2894–2926, <https://doi.org/10.1080/10406638.2020.1833051>.

FORDJOUR, Eric; ADIPAH, Frederick Komla; ZHOU, Shenghu; DU, Guocheng; ZHOU, Jingwen. Metabolic engineering of *Escherichia coli* BL21 (DE3) for de novo production of l-DOPA from d-glucose. **Microbial Cell Factories**, vol. 18, nº 1, 25 abr. 2019. DOI

10.1186/s12934-019-1122-0.

GERBER, N. N. Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt by a Novel Genotype of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas sp.* NJ134. Newmicrobial phenazines. **J Heterocycl Chem** 6:297-300. 1969

GOHAIN, N.; THOMASHOW, L. S.; MAVRODI, D. V.; BLANKENFELDT, W. The purification, crystallization and preliminary structural characterization of PhzM, a henazinemodifying methyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. **Biol. Cryst.** Commun. 62, 887–890. 2006

GUTTENBERGER, N.; BLANKENFELDT, W.; BREINBAUER, R. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, (), S0968089616311804–. 2017 DOI:10.1016/j.bmc.2017.01.002

IIDA, A.; TESHIBA, S.; MIZOBUCHI, K. Identification and characterization of the tktB gene encoding a second transketolase in *Escherichia coli* K-12.. **Journal of Bacteriology**, 175(17), 5375–5383. 1993. DOI:10.1128/jb.175.17.5375-5383.

iGEM. Standard assembly. Disponível em:

https://parts.igem.org/Assembly:Standard_assembly. Acesso em: 06 de janeiro de 2022.

JACOBUS AP, GROSS J. Optimal cloning of PCR fragments by homologous recombination in *Escherichia coli*. **PLoS One**. 2015 Mar 16;10(3):e0119221. doi: 10.1371/journal.pone.0119221. PMID: 25774528; PMCID: PMC4361335

JAYASEELAN, S., RAMASWAMY, D., DHARMARAJ, S., 2014. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 30, 1159–1168. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1552-5>.

JIANG, J.; GUIZA BELTRAN, D.; SCHACHT, A.; WRIGHT, S.; ZHANG, L.; DU, L. Functional and Structural Analysis of Phenazine *O*-Methyltransferase LaphzM from *Lysobacter antibioticus* OH13 and One-Pot Enzymatic Synthesis of the Antibiotic Myxin. **ACS Chemical Biology**, (), acschembio.8b00062–. 2018 DOI:10.1021/acschembio.8b00062

JIN, K. M.; ZHOU, L.; JIANG, H. X.; SUN, S.; FANG, Y. L.; LIU, J. H.; ZHANG, X. H.; HE, Y. W. Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production. **Metab Eng** 32:30–38. 2015. DOI:10.1016/j.ymben.2015.09.003

J. M. MONK *et al.*, “Multi-omics Quantification of Species Variation of *Escherichia coli* Links Molecular Features with Strain Phenotypes”, **Cell Syst.**, vol. 3, no 3, p. 238-251.e12, set. 2016, doi: 10.1016/j.cels.2016.08.013

K.; LADNER, J. E.; AND PARSONS, J. F. Crystal structure of the pyocyanin biosynthetic protein PhzS. **Biochemistry** 47, 5281–5289 2008.

KENNEDY, R.; KAMARAJ; NAIK, P.; RAVINDRA; VEENA, V.; LAKSHMI, B. S.; LAKSHMI, P.; KRISHNA, R.; SAKTHIVEL, N. 5-Methyl phenazine-1-carboxylic acid: A

novel bioactive metabolite by a rhizosphere soil bacterium that exhibits potent antimicrobial and anticancer activities. **Chemico-Biological Interactions**, 231(), 71–82. 2015. DOI:10.1016/j.cbi.2015.03.002

KERSTIN SEEGER; KATRIN FLINSPACH; ELISA HAUG-SCHIFFERDECKER; ANDREAS KULIK; BERTOLT GUST; HANS-PETER FIEDLER; LUTZ HEIDE .The biosynthetic genes for prenylated phenazines are located at two different chromosomal loci of *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042. , 4(2), 252–262. 2011. DOI:10.1111/j.1751-7915.2010.00234.x

LAURSEN, JANE BUUS, AND JOHN NIELSEN. “Phenazine Natural Products: Biosynthesis, Synthetic Analogues, and Biological Activity.” **Chemical Reviews**, vol. 104, no. 3, 18 Feb. 2004, pp. 1663–1686, <https://doi.org/10.1021/cr020473j>.

LAURSEN, J.B.; NIELSEN, J. PHENAZINE natural products: Biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem. Rev.* 2004,104, 1663–1686.

LIGON, J.M.; HILL, D.S.; HAMMER, P.E.; TORKEWITZ, N.R.; HOFMANN, D.; KEMPF, H.J.; PÉE, K.H.V. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manag. Sci.* 2000, 56, 688–695.

LIU, Y., YUE, S., BILAL, M., JAN, M., WANG, W., HU, H. ZHANG, X. “Development of Artificial Synthetic Pathway of Endophenazines in *Pseudomonas Chlororaphis* P3.” **Biology**, vol. 11, no. 3, 24 Feb. 2022, pp. 363–363, <https://doi.org/10.3390/biology11030363>.

MAKGATHO, M.E.; ANDERSON, R.; O’SULLIVAN, J.F.; EGAN, T.J.; FREESE, J.A.; CORNELIUS, N.; VAN RENSBURG, C.E. Tetramethylpiperidine-substituted phenazines as novel anti-plasmodial agents. *Drug Dev. Res.* 2000, 50, 195–202.

MARTIN VJ, PITERA DJ, WITHERS ST, NEWMAN JD, KEASLING JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. **Nat Biotechnol.** 2003;21(7):796–802.

MAVRODI, D. V.; BONSALL, R. F.; DELANEY, S. M.; SOULE, M. J.; PHILLIPS, G. and THOMASHOW, L.S., Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J. Bacteriol.**, 183, 6454–6465. 2001

MAVRODI, DMITRI V., *et al.* “Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway.” **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 76, no. 3, Feb. 2010, pp. 866–879, <https://doi.org/10.1128/aem.02009-09>.

MAVRODI, D. V.; KSENZENKO, VLADIMIR N.; BONSALL, ROBERT F.; COOK, R. JAMES; BORONIN, ALEXANDER M.; THOMASHOW, LINDA S. A Seven-Gene Locus for Synthesis of Phenazine-1-Carboxylic Acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. **Journal of Bacteriology**, vol. 180, n° 9, p. 2541–2548, maio 1998.

MCDONALD; D. V. MAVRODI, L. S. THOMASHOW AND H. G. FLOSS. Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1,6-dicarboxylic acid. **J. Am.**

Chem. Soc., 123, 9459–9460. 2001.

MCDONALD, M.; WILKINSON, B.; VAN'T LAND, C. W.; MOCEK, U.; LEE, S.; FLOSS, H. G. Biosynthesis of phenazine antibiotics in *Streptomyces antibioticus*: stereochemistry of methyl transfer from carbon-2 of acetate. **J Am Chem Soc** 21:5619–5624. 1999

MENTEL, M., AHUJA, E.G., MAVRODI, D.V., BREINBAUER, R., THOMASHOW, L.S., BLANKENFELDT, W. Of two make one: the biosynthesis of phenazines. *Chembiochem Eur.* **J. Chem. Biol.** 10, 2295–2304. 2009. DOI: [10.1002/cbic.200900323](https://doi.org/10.1002/cbic.200900323)

MESSENGER, A. J.; TURNER, J. M. Phenazine-1, 6-dicarboxylate and its dimethyl ester as precursors of other phenazines in bacteria. **FEMS Microbiol Lett** 18:65–68. 1983

MOORE, S. D.; PREVELIGE, P. E. (2002). A P22 Scaffold Protein Mutation Increases the Robustness of Head Assembly in the Presence of Excess Portal Protein. **Journal of Virology**, 76(20), 10245–10255. doi:10.1128/jvi.76.20.10245-10255.2002

MORRISON, C., HEITMANN, E., ARMIGER, W., DODDS, D., KOFFAS, M., 2018. Electrochemical bioreactor technology for biocatalysis and microbial electrosynthesis. **Adv. Appl. Microbiol.** 105, 51–86. <https://doi.org/10.1016/bs.aams.2018.07.001>.

NEVES, J.D.S.; PARANHOS, T.C.C.; SILVA, A. J.; Evaluation of different carbon sources for the heterologous production of phenazine-1-carboxamide. *SINAFERM*, 2022

O. SALEH, B. GUST, B. BOLL, H.-P. FIEDLER AND L. HEIDE. Aromatic Prenylation in Phenazine Biosynthesis: DIHYDROPHENAZINE-1-CARBOXYLATE DIMETHYLALLYLTRANSFERASE FROM STREPTOMYCES ANULATUS. **J. Biol. Chem.**, 2009, **284**, 14439–14447.

PARSONS, J. F.; GREENHAGEN, B. T.; SHI, K.; CALABRESE, K.; ROBINSON, H., e LADNER, J. E. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemistry** 46, 1821–1828. 2007

PARSONS, J. F.; SONG, F.; PARSONS, L.; CALABRESE, K.; EISENSTEIN, E.; LADNER, J. E. Structure and function of the phenazine biosynthesis protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens* 2-79. **Biochemistry** 43: 12427–12435. 2004. DOI: [10.1021/bi049059z](https://doi.org/10.1021/bi049059z)

PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1659–1670, 30 mar. 2010.

PUOPOLO, G.; MASI, M.; RAI, A.; ANDOLFI, A.; ZOINA, A.; Cimmino, A.; Evidente, A. Insights on the susceptibility of plant pathogenic fungus to phenazine-1-carboxylic acid and its chemical derivatives. *Nat. Prod Res.* 2013, 27, 956–966.

RABAEY, K., BOON, N., HOFTE, M., VERSTRAETE, W., 2005. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. **Environ. Sci. Technol.** 39, 3401–3408. <https://doi.org/10.1021/es048563o>.

ROY, P.; GHORAI, B. One-pot three-component synthesis of quinoxaline and phenazine ring systems using Fischer carbene complexes. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, 6(), 52–. 2010 DOI:10.3762/bjoc.6.52

RUI, Z.; *et al.* Insights into a Divergent Phenazine Biosynthetic Pathway Governed by a Plasmid-Born Esmeraldin Gene Cluster. , 19(9), 2012- DOI:10.1016/j.chembiol.2012.07.025

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3a Ed.

S. GUO, Y. WANG, B. DAI, W. WANG, H. HU, X. HUANG AND X. ZHANG. Identification of new arylamine N-acetyltransferases and enhancing 2-acetamidophenol production in *Pseudomonas chlororaphis* HT66 **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **101**, 7165–7175. 2017

SILVA, A.J.; CUNHA, J. S.;HREHA, T.; MICOCCI, K. C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARQUERA, B.; KOFFAS, M A.G; (2021). *Metabolic engineering of E. coli for pyocyanin production* . *Metabolic Engineering*, (), –. doi:10.1016/j.ymben.2021.01.002

TURNER, J. M.; MESSENGER, A. J. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. **Adv Microb Physiol** 27:211–275. 1986.

XU, Peng; VANSIRI, Amerin; BHAN, Namita; KOFFAS, Mattheos A. G. ePathBrick: A Synthetic Biology Platform for Engineering Metabolic Pathways in *E. coli*. **ACS Synthetic Biology**, vol. 1, n° 7, p. 256–266, 4 maio 2012. DOI 10.1021/sb300016b.