

USO DE CÉLULAS FANTASMAS DE *Escherichia coli* COMO MICRORREATORES RECICLÁVEIS PARA A SÍNTESE DE RNAs TERAPÊUTICOS

MODALIDADE
DA BOLSA
PIBIC - CNPq

Raquel Calloni, Adriana Gava, Diego Bonatto
Laboratório de Genética Toxicológica – Instituto de Biotecnologia



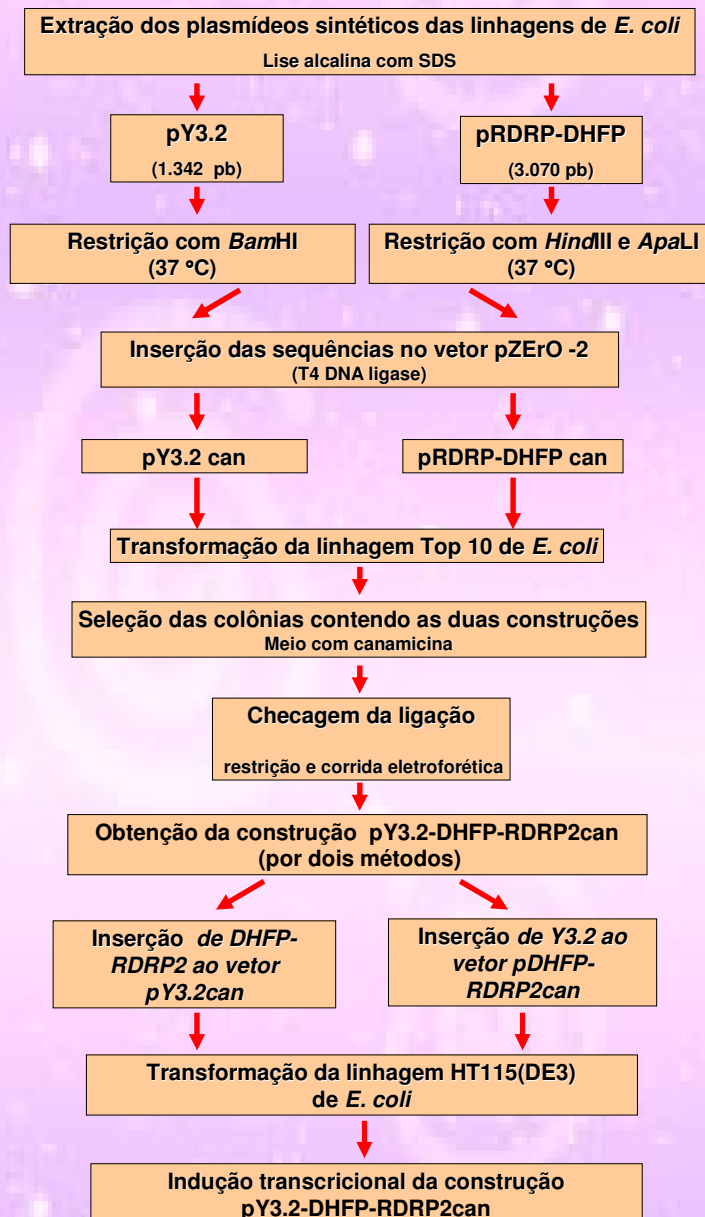
CONTEXTO: A Terapia Gênica é uma área de pesquisa voltada para a síntese e produção de sistemas terapêuticos utilizados para o tratamento das mais diferentes doenças de base genética. Uma das possíveis formas de fazê-lo é empregando sistemas não-virais contendo ácidos nucleicos, como lipossomos.

PROBLEMA: os processos comumente usados para a síntese in vitro de ácidos nucleicos, especialmente de RNAs terapêuticos, esbarra em uma série de problemas de escalonamento industrial tornando o produto muito caro para aplicações comerciais.

OBJETIVO DO PROJETO: com o propósito de sintetizar RNAs em quantidades suficientes para aplicações em terapia gênica e para processos de escalonamento industrial, o projeto do qual esse trabalho faz parte busca utilizar as células de *E. coli* como microrreatores recicláveis para a produção de RNAs. Para tanto, a primeira etapa na construção dos microrreatores é a ancoragem, no envoltório celular de *E. coli*, de uma RNA polimerase dependente de RNA que permitirá a síntese de RNAs específicos em larga quantidade.

OBJETIVO DO TRABALHO: construir um plasmídeo contendo as seqüências sintéticas Y3.2 (codificante para a proteína fluorescente verde ou GFP fusionada a uma seqüência ligadora à RNA polimerase dependente de RNA) e DHFP-RDRP2 (contendo aRNA polimerase dependente de RNA do virion L-A de *S. cerevisiae*). Estas seqüências sintéticas foram manipuladas in vitro para a obtenção de plasmídeos necessários para a transformação de diferentes linhagens de *E. coli* para a obtenção de microrreatores.

2. MATERIAIS E MÉTODOS



3. RESULTADOS

O desenvolvimento deste trabalho culminou nos seguintes resultados:

- Seleção de 10 colônias com a construção pY3.2can e três colônias com a construção pRDRP-DHFP can, na seleção feita em meio contendo canamicina;
- verificação de que o processo de inserção do fragmento Y3.2 no vetor pRDRP-DHFP can é o mais eficaz para a obtenção da construção pY3.2-RDRP-DHFP can;
- obtenção de sete colônias da linhagem HT115 (DE3) de *E. coli* transformadas com a construção pY3.2-RDRP-DHFP can;
- Os dados preliminares de expressão em *E. coli* mostram a manutenção do sistema após a sua indução transcricional da construção pY3.2-RDRP-DHFP can.

4. PERSPECTIVAS

Atualmente, está sendo realizada a análise da expressão da GFP em *E. coli* na presença de plasmídeo pY3.2-DHFP-RDRP2 e na ausência dessa construção. Após a confirmação da expressão de GFP, será quantificado o nível de RNA e de GFP produzido pelo sistema após indução e perda plasmideal.

APOIO:

