

Uso de Células Fantasmas de *Escherichia coli* como Microrreatores Recicláveis para a Síntese de RNAs Terapêuticos

Raquel Calloni (PIBIC-CNPq), Adriana Gava, Diego Bonatto (orientador) - playquel@yahoo.com.br

A Terapia Gênica é, atualmente, uma das principais áreas de pesquisa da Biotecnologia voltada para a síntese e produção, em larga escala, de sistemas terapêuticos utilizados para o tratamento das mais diferentes doenças e síndromes de base genética. Esses sistemas terapêuticos podem ser divididos em dois grupos, cada um possuindo vantagens e desvantagens importantes: (i) os sistemas virais, que são altamente específicos em termos celulares, mas cuja manipulação é problemática em termos de segurança e (ii) sistemas não-virais, menos específicos mas facilmente manipuláveis, sem gerar maiores riscos aos manipuladores e aos pacientes. De todos os sistemas não-virais hoje utilizados, os que empregam ácidos nucleicos (DNA e RNA) representam o estado-da-arte em pesquisas de terapia gênica. Infelizmente, os processos comumente usados para a síntese de ácidos nucleicos *in vitro*, especialmente RNAs terapêuticos, esbarra em uma série de problemas de escalonamento industrial como, por exemplo, ausência de reciclagem dos sistemas enzimáticos utilizados para a síntese de RNA, tornando o produto muito caro para aplicações comerciais. Assim, com o propósito de sintetizar RNAs em quantidades suficientes para aplicações não-virais de terapia gênica e para processos de escalonamento industrial, esse projeto busca utilizar as células de *E. coli* como microrreatores recicláveis usando, para tanto, sistemas plasmídeos contendo construções sintéticas que codificam para: (i) o centro catalítico da RNA polimerase dependente de RNA (RNA dependent RNA polymerase; RDRP) do virióide de *S. cerevisiae* L-A fusionado a um peptídeo sintético denominado de DHFP (RDRP-DHFP) e (ii) construções, sintéticas ou não, que codificam para o RNA terapêutico de interesse. Para os ensaios iniciais, foi utilizado o quadro aberto de leitura codificante para a proteína verde fluorescente (GFP) fusionado às seqüências 5' e 3' do virióide X de *S. cerevisiae*, que reconhece a enzima RDRP e promove a sua manutenção celular (seqüência Y3.2). As construções foram sintetizadas *in vitro* e, por meio de técnicas de biologia molecular, foi construído o plasmídeo pY3.2-DHFP-RDRP2, o qual contém as duas seqüências sintéticas. Os dados preliminares de expressão em *E. coli* mostram a manutenção do sistema após a sua indução transcricional. Além disso, experimentos de perda plasmídeo estão em andamento para verificar a manutenção do sistema de expressão e a capacidade de síntese de RNAs na ausência de plasmídeo.

Palavras-chave: síntese de RNAs, genes sintéticos, microrreatores.

Apoio: UCS, CNPq.