



CONSTRUÇÃO DE INTERRUPTORES GENÉTICOS BASEADOS EM SERINAS INTEGRASES PARA CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

THAIS TORQUATO SALES; MAYNA DA SILVEIRA GOMIDE; CINTIA MARQUES COELHO;
MARTIN HERNAN BONAMINO; ELIBIO LEOPOLDO RECH FILHO

INTRODUÇÃO: As serinas integrases são proteínas de bacteriófagos responsáveis pela integração do DNA viral no genoma bacteriano. Essa inserção ocorre por interações com o DNA viral, em uma sequência denominada attP (phago attachment site), e com o DNA bacteriano, em um sítio denominado attB (bacterial attachment site). Após a recombinação mediada pela integrase, o DNA viral é incorporado ao genoma da bactéria, formando os novos sítios mesclados attL (left attachment site) e attR (right attachment site). Baseado nessas características, as serinas integrases podem ser utilizadas como ferramenta biotecnológica para construção de interruptores genéticos. **OBJETIVO:** avaliara funcionalidade de duas serinas integrases para inversão de sequência genética flanqueada pelos sítios de reconhecimento attP/attB integrados no genoma de células humanas (HEK293T). **METODOLOGIA:** Os experimentos foram realizados para avaliar a ação das integrases Int9 e Int13 em gene integrado ao genoma de células humanas. O gene codificador da proteína repórter GFP, em sentido reverso complementar e flanqueado pelos sítios de uma das integrases, foi introduzido no genoma da célula no safe harbor AAVS1. A integração foi mediada por clivagem com sistema CRISPR-Cas9 e por braços de homologia para recombinação homóloga. Após confirmação da integração da sequência, foi realizada a transfecção nas células com o vetor para expressão das integrase Int9 ou Int13 em cada linhagem celular já contendo seus respectivos sítios flanqueadores para promoverem a inversão da sequência codificadora de GFP. A funcionalidade do sistema foi verificada pela emissão de fluorescência, analisada em microscópio de fluorescência. **RESULTADOS:** As células cotransfectadas com o gene repórter gfp, que foi integrado ao genoma de HEK293T por meio de recombinação homóloga e, posteriormente, cotransfectadas com a integrase Int13, apresentaram fluorescência quando observadas ao microscópio. **CONCLUSÃO:** Os resultados observados têm potencial para a modulação da expressão gênica e para ampliar as possibilidades de design e aplicação de circuitos genéticos sintéticos em células de mamíferos.

Palavras-chave: Bacteriófago, Integrase, Circuito genético, Interruptores genéticos, Recombinação sítio-específica.