

Proposta para estágio de Mestrado

Supervisor(s): Dr. Sandra Viegas & Dr. Ana Filipa Rodrigues

Contacto Supervisor(s): sviegas@itqb.unl.pt & anafr@itqb.unl.pt

Lab/Instituição: Laboratório de Expressão Génica (ITQB NOVA) em colaboração com o Laboratório de Desenvolvimento de Linhas celulares e Biotecnologia Molecular (iBET/ITQB-NOVA)

TÍTULO: Optimização da produção de vectores lentivirais através de elementos sintéticos estabilizadores de RNA

INTRODUÇÃO

A terapia génica é considerada uma abordagem revolucionária da medicina do século XXI, capaz de providenciar soluções terapêuticas a um largo espectro de doenças. Entre os vectores utilizados em terapia génica, os vectores lentivirais (LVs) posicionam-se como a primeira escolha para aplicações onde é necessária a expressão permanente do gene terapêutico. Contudo, a produção de LVs ainda enfrenta vários desafios, incluindo uma baixa produtividade.

Os mRNAs de elementos chave da produção dos LVs são reconhecidos por duas importantes exoribonucleases – XRN1 e XRN2 – como parte da resposta imunitária inata. Porém, a contribuição destes mecanismos de degradação do RNA e seu impacto nas baixas produtividades não foi, até hoje, tido em consideração. Explorar e contra-actuar nestes mecanismos abre novas possibilidades para melhorar a produção de LVs.

Uma abordagem possível para proteger o mRNA dos ataques das exoribonucleases consiste na manipulação da região não traduzida a 5' do transcripto que leve à formação de regiões estruturadas bloqueando o acesso das nucleases. Em trabalho prévio do Laboratório de Expressão Génica, desenvolvemos novos elementos de biologia sintética (S-Loops) que, quando adicionados à região não traduzida a 5' do transcripto, resultam num efeito de estabilização e aumento de expressão em sistemas procarióticos. Neste projecto, propomo-nos a avaliar potencial dos S-Loops como elementos de estabilização em sistemas de expressão eucarióticos, especificamente, em células humanas, e explorar este potencial numa vertente aplicada à terapia génica, em colaboração com o Laboratório de Desenvolvimento de Linhas Celulares e Biotecnologia Molecular.

OBJECTIVO

Este projecto tem por objectivo avaliar a utilização de elementos de biologia sintética de estabilização do mRNA (S-Loops) em células humanas e explorar o seu potencial para a optimização da produção de vectores lentivirais utilizados em terapia génica.

DESCRIÇÃO DO PROJECTO

O projecto inicia-se com a construção de um painel de vectores de expressão génica em células de mamífero. Neste painel, cada vector terá uma diferente combinação de S-Loops e promotores de expressão génica. Os níveis de expressão obtidos por cada vector serão avaliados em células humanas

transfectadas transientemente e também seleccionadas de forma estável. Adicionalmente, serão caracterizados os potenciais mecanismos de aumento de expressão génica. Desta análise, serão escolhidos os melhores S-Loops para aplicação nas construções lentivirais. As construções lentivirais melhoradas com os S-Loops seleccionados serão então utilizadas para a produção de LVs como prova de conceito. Avaliaremos potenciais aumentos de produtividade por comparação com produções controlo feitas em paralelo com as construções originais.

Tarefa 1 – Aprendizagem de técnicas de biologia molecular; clonagem, produção de plasmídeos de expressão em células de mamífero. Leitura de bibliografia. Construção de uma biblioteca de vectores de expressão génica em células de mamífero com diferentes S-Loops e promotores.

Tarefa 2 – Aprendizagem de técnicas de cultura de células animais: trabalhar em condições de esterilidade numa câmara de fluxo laminar, propagação de células, contagem de células, congelamento de células. Transfecção de células animais com vectores otimizados com elementos sintéticos. Análise de células por citometria de fluxo, quimioluminescência, microscopia de fluorescência.

Tarefa 3 – Caracterização dos mecanismos de metabolismo de RNA – subjacentes a potenciais efeitos de estabilização existentes em vectores otimizados – por técnicas de biologia molecular (e.g.: qPCR, northern blotting).

Tarefa 4 – Aprendizagem de técnicas de biologia molecular e cultura celular para a produção de vectores lentivirais. Construção de vectores otimizados com elementos sintéticos escolhidos com base nos resultados das tarefas 2 e 3. Produção de vectores lentivirais por transfecção transiente. Transdução de células com vectores lentivirais, titulação e caracterização da estabilidade intracelular do vector.

Tese – Escrita da tese de Mestrado.

Planeamento

	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	Mês 7	Mês 8	Mês 9	Mes 10	Mês 11	Mês 12
Tarefa 1												
Tarefa 2												
Tarefa 3												
Tarefa 4												
Escrita tese												