Nome do Projeto: Redesenho de scaffolds de sgRNAs para a otimização de aplicações de CRISPR(i) multiplex na cianobactéria modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803

Orientadores/ Equipa: Dr. Filipe Pinto e Prof. Paula Tamagnini (i3S/IBMC, UP)

Requisitos Mínimos:

- 2º ou 3º ano de licenciatura

Critérios de Preferência:

- Alguma experiência em técnicas de Biologia Molecular

Entrevista	CV	Carta de Motivação
Sim	Sim	Sim

Número de Estudantes a Receber: 1 estudante;

Número de Horas de Contacto: 1-2 dias/semana;

Modo de Contacto: Presencial

Duração do Estágio: 4-5 meses / Até ao mês de julho 2025;

Descrição do que o estudante fará no estágio:

O CRISPR-Cas9 (acrónimos de "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" e "CRISPR-associated protein 9") é uma ferramenta de Biologia Molecular versátil e programável que permite a edição de sequências de DNA complexas, tais como genomas. A proteína Cas9 associa-se a uma pequena sequência de RNA (sgRNA) que a guia para a sequência alvo de DNA. Variações desta tecnologia permitem reprimir (CRISPRi) ou ativar (CRISPRa) a expressão de genes, utilizando para isso uma variante da proteína Cas9 sem atividade catalítica (dCas9). A repressão/ativação simultânea de vários genes é ainda possível utilizando múltiplos sgRNAs que direcionam moléculas de dCas9 para diversos alvos, facilitando abordagens mais complexas de engenharia metabólica. Contudo, as sequências repetitivas presentes em conjuntos de vários sgRNAs podem criar instabilidade genética dos construtos, resultando em fenómenos de recombinação que levam à inativação do sistema por perda ou substituição dos sgRNAs.
De forma a estabilizar os conjuntos de sgRNAs, novos "scaffolds" de sgRNA foram desenhados e sintetizados, e serão caracterizados na cianobactéria modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803. Para tal, plasmídeos contendo os novos sgRNAs que guiam a dCas9 para o locus genético do gene *glgC* serão introduzidos num mutante de *Synechocystis* que expressa a proteína dCas9 a partir do cromossoma (*Synechocystis*::dCas9). A eficácia de cada sgRNA na repressão do *glgC* será avaliada através de um ensaio de depleção de azoto do meio de cultura. Nestas condições, a repressão do gene *glgC* evita que as células de *Synechocystis* entrem em clorose (perda da cor verde característica).

Neste projeto, o estudante irá:

- purificar os plasmídeos contendo os diferentes sgRNAs a partir de *Escherichia coli*;
- transformar células de *Synechocystis*::dCas9 com os vários plasmídeos;
- realizar ensaios de depleção de azoto do meio de cultura de *Synechocystis* e avaliar o fenótipo dos mutantes.

Outros Detalhes:

- A parte experimental será realizada no i3S, no Grupo “Bioengineering and Synthetic Microbiology”