

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Biochemijos studijų programos magistrantas

Aurimas KOPŪSTAS

Magistrinis darbas

**Orientuotos minkštosios DNR užuolaidos pavienių molekulių sąveikų
tyrimams**

Darbo vadovas:

Dr. Mindaugas Zaremba

Konsultantas:

Dr. Marijonas Tutkus

Vilnius 2021

**Orientuotos minkštosios DNR užuolaidos pavienių molekulių sąveikų
tyrimams**

Darbas atliktas Biotechnologijos instituto Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų
skyriuje

Aurimas Kopūstas _____

Darbo vadovas:

Leisti / neleisti gintis:

Dr. Mindaugas ZAREMBA _____

Irašo data

TURINYS

Santrumpos	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Pagrindiniai pavienių baltymų ir DNR sąveikų tyrimo metodai	8
1.1.1. Pririštos dalelės judėjimas	10
1.1.2. Optiniai pincetai	11
1.1.3. Magnetiniai pincetai	12
1.1.4. Atominės jėgos mikroskopija	13
1.1.5. Pavienių molekulių Forsterio rezonansinės energijos pernaša	15
1.1.6. DNR ištempimo tėkme analizė	17
1.2. „DNR užuolaidų“ platforma	19
1.2.1. „DNR užuolaidų“ technologinis pagrindas ir jų gamybos būdai	19
1.2.2. Konfigūracinė „DNR užuolaidų“ įvairovė	24
1.2.3. „DNR užuolaidų“ technologijos praktinio pritaikymo galimybės	27
1.3. Visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinė mikroskopija	29
1.4. Cas9 endonukleazė	32
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	38
2.1. Medžiagos	38
2.1.1. Cheminiai reagentai	38
2.1.2. Fermentai, buferiai ir rinkiniai	38
2.1.3. Kiti tirpalai	39
2.1.4. Plazmidės ir kita DNR	40
2.1.5. DNR oligonukleotidai	40
2.2. Metodai	41
2.2.1. Traptavidino gamyba ir gryninimas	41
2.2.2. DNR gamyba	42
2.2.4. Minkštųjų „DNR užuolaidų“ surinkimas	43
2.2.5. DNR molekulių imobilizacija	46
2.2.6. SpCas9 fluorescencinis žymėjimas, komplekso surinkimas ir sąveikos su DNR tyrimas vienos molekulės lygyje	46
2.2.7. Objektyvu paremta visišką vidaus atspindžio fluorescencinė mikroskopija	47
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	49
3.1. Spaudimo jėgos optimizavimas	49
3.2. Fiksuotų DNR molekulių paviršinės imobilizacijos trukmės didinimas	50
3.3. Abiejų λ DNR molekulių galų kryptinga imobilizacija	54
3.4. Dviem galais fiksuotų λ DNR molekulių orientacijos charakterizavimas ir jų imobilizacijos trukmės įvertinimas	56
3.5. SpCas9 endonukleazės sąveikos su DNR tyrimas vienos molekulės lygyje	59
3.6. Rezultatų aptarimas	61
IŠVADOS	67
SANTRAUKA	68
SUMMARY	69
PADĖKA	70
LITERATŪROS SĄRAŠAS	71

Santrumpos

1D	Viendimensinis
2D	Dvidimensinis
3D	Tridimensinis
AJM	Atominės jėgos mikroskopija
anti-dig	Antikūnai prieš digoksigeniną
bp	Bazių pora
bt-anti-dig	Biotinilinti antikūnai prieš digoksigeniną
Cas	Su CRISPR susijęs (angl. <i>CRISPR Associated</i>)
CRISPR	Susitelkę reguliariai pertraukti trumpi palindrominiai pasikartojimai (angl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
crRNR	CRISPR RNR
dgDNR	Dvigrandininė DNR
dig	Digoksigeninas
DTT	Ditiotreitolis
EDTA	Etilendiamintetraacto rūgštis
eGFP	Sustiprintas žaliai fluorescuojantis baltymas (angl. <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)
gRNR	Vedančioji RNR (angl. <i>guide RNA</i>)
MP	Magnetiniai pincetai
nt	Nukleotidas
OP	Optiniai pincetai
PAM	Proskirtukui gretimas motyvas (angl. <i>Protospacer Adjacent Motif</i>)
PDJ	Prištos dalelės judėjimas (angl. <i>Tethered Particle Motion</i>)
PEG	Polietilenglikolis
PM	Pavienių molekulių
PMMA	Polimetilmetakrilatas
REazė	Restrikcijos endonukleazė
RNP	Ribonukleoproteinas
RPA	Replikacijos baltymas A (angl. <i>Replication Protein A</i>)
sAv	Streptavidinas
SG	SYTOX Green
Si	Silicis
smFRET	Pavienių molekulių Forsterio rezonansinės energijos pernaša (angl. <i>Single-molecule Förster Resonance Energy Transfer</i>)
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9
tAv	Traptavidinas
tracrRNR	Transaktyvuojanti CRISPR RNR
vgDNR	Viengrandininė DNR
VVAF	Visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinė (angl. <i>Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF</i>)

ĮVADAS

Baltymų ir DNR sąveikos yra vienas iš esminių gyvybės biologinių variklių, kurio dėka gyvųjų organizmų ląstelėse gali vykti įvairūs molekuliniai procesai, tokie kaip DNR replikacija, rekombinacija, reparacija, transkripcija ir jos valdymas. Be to, su DNR sąveikaujantys baltymai daugelyje prokariotų užtikrina sklandų šiems organizmams būdingų apsauginių sistemų, pavyzdžiui, susitelkusių reguliariai pertrauktų trumpų palindrominių pasikartojimų (angl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR*)-su CRISPR susijusių (angl. *CRISPR associated, Cas*) ir restrikcijos-modifikacijos sistemų, veikimą, kas bakterijoms ir archėjoms leidžia išlikti nuolat kintančioje bei priešiškoje aplinkoje. Būdamos tokia galinga ir nepakeičiama gyvosios gamtos varomąja jėga, baltymų-DNR sąveikos yra itin patrauklus daugelio mokslinių tyrimų objektas. Ilgą laiką šių sąveikų nagrinėjimui buvo naudojami įvairūs klasikiniai biocheminiai metodai, kurie išlieka ne ką mažiau svarbūs ir šiomis dienomis. Vis dėlto šie metodai leidžia atlikti tik molekulių ansamblio matavimo eksperimentus, kuriuose įprastai yra tiriamos didžiulio molekulių kiekio savybės. Galutinis tokių eksperimentų rezultatas – išmatuotos vidurkinės pasirinktos molekulių charakteristikos ir prarasta visa informacija apie tiriamosios molekulių populiacijos heterogeniškumą. Dėl šių priežasčių baltymų ir DNR sąveikų studijoms buvo pradėti taikyti įvairūs pavienių molekulių (PM) tyrimo metodai. Jie suteikia galimybę atskirai manipuluoti individualiomis tiriamosiomis molekulėmis, todėl šių metodų dėka tampa įmanoma detalai charakterizuoti kiekvieną bandinyje esančią unikalią molekulę, sekti jos reakcijos trajektoriją, realiu laiku stebėti jos molekulių virsmų dinamiką ir tokiu būdu identifikuoti skirtingas tiriamajame mėginyje egzistuojančias molekulių subpopuliacijas.

Baltymų-DNR sąveikos vienos molekulės lygyje gali būti nagrinėjamos visa eile PM tyrimo metodų – optiniais pincetais (OP) ar magnetiniais pincetais (MP), atominės jėgos mikroskopija (AJM), PM Forsterio rezonansinės energijos pernaša (angl. *single-molecule Förster resonance energy transfer, smFRET*) ir kitais būdais. Tačiau dauguma jų vienu metu leidžia manipuluoti tik viena tiriamąja molekule, todėl siekiant šių metodų pagalba surinkti pakankamai didelį statistinių duomenų kiekį, reikia atlikti daug nepriklausomų vienodo pobūdžio eksperimentų. Pastarąją problemą labai efektyviai išsprendžia didelio našumo „DNR užuolaidų“ technologija, skirta baltymų ir DNR tarpusavio sąveikų tyrimams vienos molekulės lygyje. Neseniai mes sukūrėme minkštųjų „DNR užuolaidų“ eksperimentinę platformą, kuri, taip pat kaip ir tradicinis „DNR užuolaidų“ įrankis, fluorescencinės mikroskopijos dėka leidžia vizualizuoti didelį kiekį sąveikų, vykstančių tarp pavienių tiriamojo baltymo molekulių ir šimtų

ant stiklo paviršiaus imobilizuotų lygiagrečiai išlygiuotų ir ištiestų įvairaus ilgio individualių DNR molekulių, bei tokiu būdu vieno eksperimento metu sukaupti išties nemažą statistinių duomenų rinkinį. Lyginant su visais iki šiol sukurtais įprastinės „DNR užuolaidų“ technologijos variantais, iš kurių didžioji dauguma yra paremta atraminio lipidų dvisluoksniu ir metalinių, lipidų difuziją sutrikdančių barjerų naudojimu, mūsų sukurtas minkštųjų „DNR užuolaidų“ įrankis yra pagrįstas chemiškai modifikuoto stiklo paviršiaus nanostruktūrizavimu streptavidinu (sAv), ant kurio suformuotų paviršinių nanometrinių matmenų linijų yra imobilizuojamos pavienės biotininios DNR molekulės. Toks minkštųjų „DNR užuolaidų“ funkcionavimo principas užtikrina šios eksperimentinės platformos paprastumą, pigumą ir technologiškai prieinamumą.

Pasitelkę BfiI restrikcijos endonukleazę, mes jau anksčiau pademonstravome, jog minkštosios „DNR užuolaidos“ gali būti sėkmingai pritaikytos pavienių baltymų ir DNR sąveikų tyrimams. Tačiau efektyvų mūsų sukurtos eksperimentinės platformos panaudojimą minėtose studijose šiuo metu labiausiai riboja keletas esminių trūkumų. Ant paviršiaus fiksuotų individualių DNR molekulių kiekis pagrindine priklauso nuo suformuotų baltyminių linijų kokybės, kurią nulemia tokie veiksniai kaip sAv koncentracija polidimetilsiloksano (PDMS) spaudo rašalavimo tirpale ar paviršinė biotin-polietilenglikolio (PEG) molekulių koncentracija. Šiuos faktorius mes optimizavome ankstesnių savo darbų metu, tačiau vis dar nesame optimizavę vieno iš svarbiausių veiksnių – stiklo paviršiaus nanostruktūrizavimo metu veikiančios spaudimo jėgos, kas mums galimai leistų ant paviršiaus suformuoti dar geresnės kokybės baltymines linijas. Be to, eksperimento metu bendras ant paviršiaus imobilizuotų pavienių DNR molekulių skaičius ilgainiui mažėja, kadangi įvykus sAv-biotino komplekso disociacijai, DNR molekulės atsijungia nuo baltyminių nanostruktūrų ir nudifunduoja toliau nuo stiklo paviršiaus. Būtent dėl šios priežasties dažniausiai labai nukenčia ilgų trukmės eksperimentų informatyvumas. Galiausiai, pagrindinis mūsų sukurtos minkštųjų „DNR užuolaidų“ technologijos trūkumas yra toks, jog dviem galais ant gretimų sAv linijų imobilizuotų individualių abiejuose galuose biotininčių DNR molekulių orientacija nukleotidų sekos atžvilgiu yra neapibrėžta ir neretai skirtinga, kas dažnu atveju sukelia nemažai sunkumų analizuojant tokio pobūdžio eksperimentų metu surinktus duomenis. Taigi, išsprendus šias tris esmines problemas, minkštosios „DNR užuolaidos“ taptų dar labiau patrauklesniu ir efektyvesniu įrankiu baltymų ir DNR sąveikų tyrimams vienos molekulės lygyje.

Darbo tikslas:

Pagaminti orientuotas minkštąsias „DNR užuolaidas“, kurios leistų vienos molekulės lygyje efektyviai atlikti baltymų ir DNR sąveikų tyrimus.

Darbo uždaviniai:

1. Optimizuoti baltymų atkeliamojo mikrokontaktinio antspaudavimo metu veikiančią spaudimo jėgą, kuri turi įtakos ant paviršiaus suformuojamų baltyminių linijų kokybei.
2. Padidinti ant paviršiaus fiksuotų DNR molekulių imobilizacijos trukmę.
3. Užtikrinti apibrėžtą ir nukleotidų sekos atžvilgiu vienodą abiem galais ant paviršiaus imobilizuotų DNR molekulių orientaciją.
4. Pademonstruoti, jog patobulinta orientuotų minkštųjų „DNR užuolaidų“ eksperimentinė platforma gali būti sėkmingai taikoma pavienių baltymų-DNR sąveikų tyrimams atlikti.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

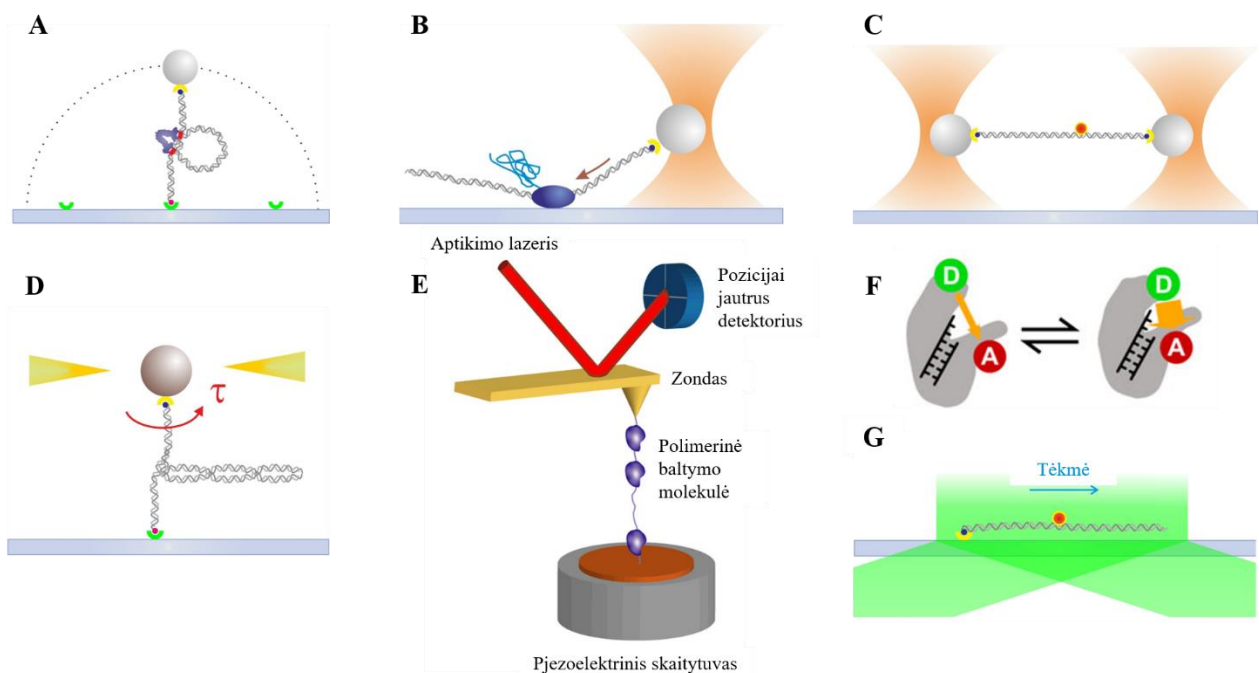
Šioje dalyje itin didelis dėmesys yra skiriamas pagrindiniams pavienių baltymų-DNR sąveikų tyrimo metodams – jų funkcionavimo principams, suteikiamoms galimybėms, privalumams ir trūkumams. Plačiausiai šiame skyriuje yra nagrinėjama „DNR užuolaidų“ eksperimentinė platforma – jos koncepcija ir pranašumai prieš kitus metodus, įvairūs šios technologijos variantai ir jų realizavimo būdai, skirtingos galimos „DNR užuolaidų“ konfigūracijos, šios platformos suteikiamos informacijos apie baltymų-DNR sąveikas pobūdis ir šios technologijos pritaikymo realioje praktikoje pavyzdžiai. Čia taip pat trumpai yra apžvelgiamas ir vienas iš esminių šio baigiamojo darbo metu naudotų metodų – visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinė (VAAF) mikroskopija. Likusioje šio skyriaus dalyje yra glaustai pristatoma Cas9 endonukleazė, kuri šiame darbe buvo pasitelkta kaip kontrolinis tyrimo objektas.

1.1. Pagrindiniai pavienių baltymų ir DNR sąveikų tyrimo metodai

Baltymų ir DNR sąveikos yra kertinė visų gyvųjų organizmų funkcionavimo ašis, dėka kurios ląstelėje gali vykti tokie biologiniai procesai kaip genetinės medžiagos kompaktizacija ir rekombinacija, DNR replikacija bei reparacija, transkripcija ir jos reguliacija. Be to, baltymų gebėjimas specifiskai sąveikauti su konkrečiomis DNR sekomis kartu yra ir įvairių apsaugos sistemų (restrikcijos-modifikacijos, CRISPR-Cas ir kitų), kurias bakterijos bei archėjos pasitelkia kovai su bakteriofagų infekcijomis, pagrindas (Isaev et al., 2021). Dėl šių priežasčių baltymų-DNR sąveikų tyrimai įgauna ypatingą reikšmę, siekiant geriau suprasti minėtus fundamentinius gyvybės procesus ir norint nuodugniau pažinti tam tikrų mikroorganizmų esminius priešfaginių apsaugos mechanizmų komponentus.

Yra eilė klasikinių biocheminių metodų, kurie leidžia identifikuoti bei nagrinėti baltymų ir DNR tarpusavio sąveikas: elektroforetinio judrumo poslinkio analizė (angl. *EMSA*), DNR pėdsekiavimas (angl. *DNA footprinting*), chromatino imunoprecipitacijos tyrimas, eksponentiniu praturtinimu paremta ligandų sisteminė evoliucija (angl. *SELEX*), DNR ir baltymo susiuvimas (angl. *cross-linking*) bei kitokie būdai (Guille ir Kneale, 1997; Das et al., 2004). Visi pastarieji metodai yra paremti didelį mastą apimančių (angl. *bulk*) eksperimentų atlikimu, kuomet tirpale vienu metu yra matuojamos didžiulio molekulių kiekio savybės. Vis dėlto kiekviena iš šių molekulių bet kuriuo laiko momentu yra unikali tuo aspektu, jog ji yra dinamiška ir kad ji nuolat sąveikauja su kitomis tokiomis molekulėmis bei su tirpikliu. Minėti ansamblio

matavimai (angl. *ensemble measurements*) dažniausiai užmaskuoja šiuos molekulinės dinamikos procesus, kadangi tam tikra išmatuota charakteristika iš tikrųjų yra kiekvienos mėginyje esančios molekulės indėlio nesinchronizuotas vidurkis (Tinoco ir Gonzalez, 2011). Palyginimui, PM metodai leidžia sekti individualių molekulių reakcijos trajektorijas bei tokiu būdu atskleisti net ir pačias smulkiausias daugiapakopių vyksmų detales. Kitaip tariant, šie metodai suteikia galimybę tyrinėti PM realaus laiko dinamiką ir įvertinti visos tiriamosios molekulių populiacijos heterogeniškumą (Hill et al., 2017). Šiuo metu baltymų ir DNR sąveikų tyrimams vienos molekulės lygyje dažniausiai yra pasitelkiami bei tarpusavyje nuolatos kombinuojami tokie pagrindiniai metodai (1.1 pav.), kaip pririštos dalelės judėjimas (PDJ), OP, MP, AJM, smFRET ir DNR ištempimo tėkme analizė.



1.1 pav. Pagrindiniai pavienių baltymų-DNR sąveikų tyrimo metodai. (A) Pririštos dalelės judėjimas. Tamsiai mėlyna spalva žymi baltymo molekulę, raudona – baltymo atpažįstamas DNR sekas, pilkas rutuliukas simbolizuoja prie DNR molekulės pririštą dalelę, o punktyrinė linija – leistiną dalelės difuzijos diapazoną. (B) Viengubi optiniai pincetai. Sufokusuotas lazerio spindulys yra pažymėtas oranžine spalva. Žydra spalva žymi RNR polimerazės sintetinamą informacinės RNR molekulę. (C) Dvigubi optiniai pincetai. Raudonu tašku yra nuspalvinta fluoroforu pažymėta individuali baltymo molekulė. (D) Magnetiniai pincetai. Geltoni trikampai žymi nuolatinčius magnetus, τ raidė su raudona rodykle – sukimo momentą. (E) Atominės jėgos mikroskopija. (F) Pavienių molekulių Forsterio rezonansinės energijos pernaša. A raide yra pažymėtas akceptorinis fluoroforas, D raide – donorinis fluoroforas, pilka spalva – su DNR susijungusi baltymo molekulė. (G) DNR ištempimo tėkme analizė. Žalia spalva žymi evanescentinę bangą. (A), (B), (C), (D), (G) iliustracijos yra parengtos pagal (Monico et al., 2013), (E) – pagal (Neuman ir Nagy, 2008), (F) – pagal (Farooq et al., 2014).

1.1.1. Pririštos dalelės judėjimas

PDJ (1.1 pav., A) analizė leidžia aptikti prie vieno DNR galo prijungtos dalelės poziciją, kuomet kitas DNR galas yra pritvirtintas prie paviršiaus. Individualios DNR molekulės pririšimas prie paviršiaus apriboja dalelei būdingą Brauno judėjimą vandeniniame tirpale. Pastarasis suvaržymas yra proporcingas DNR molekulės ilgiui, dėl to dalelės Brauno judesių mastas suteikia informacijos apie vykstančius DNR sutrumpėjimo įvykius. Todėl šis PM metodas puikiai tinka dinamikos tyrimams tų baltymų, kurie išlenkia, kilpoja arba translokuojasi ant DNR molekulės ir tokiu būdu ją sutrumpina. Pavyzdžiui, PDJ buvo panaudotas RecBCD helikazės, kuri yra atsakinga už dvigrandininių DNR trūkių taisymo iniciaciją homologinės rekombinacijos metu, procesyvumo stebėjimui. Šio tyrimo metu buvo nustatyta, jog RecBCD gali translokuotis išilgai DNR molekulės ir kad šio baltyminio komplekso sąveika su reguliacine 8 nukleotidų (nt) Chi seka (5'-GCTGGTGG-3') nepakeičia jo translokacijos greičio (Hughes et al., 2014). PDJ taip pat buvo pasitelktas pavienių RNR polimerazių, transkribuojančių DNR, procesyvumo tyrimui, LacI vykdomiems DNR kilpų formavimui ir suardymui tirti, lambda represoriaus katalizuojamo DNR kilpojimo dinamikos nagrinėjimui, dvi DNR surišimo vietas turinčių restrikcijos endonukleazių (REazių), tokių kaip NarI, NaeI bei FokI, studijoms (Monico et al., 2013).

DNR ilgio pokyčiai, atsirandantys dėl atitinkamo baltymo poveikio, gali būti aptinkami realiu laiku, pasitelkiant diferencinio interferencijos kontrasto, VVAF, tamsaus lauko arba tiesiog transmisijos (šviesaus lauko) mikroskopijas, kurių pagalba yra sekamos dalelės leidžiamo judrumo ribos (Monico et al., 2013). Bendru atveju, PDJ pasižymi 10-15 nm (60-70 bp) erdvine skiriamąja geba ir yra jautrus DNR ilgio pokyčiams tuomet, kai imobilizuotų DNR molekulių dydis siekia nuo 100 iki 4000 bp (Mohapatra et al., 2020). PDJ turi nemažai privalumų – tai yra paprastas ir nebrangus metodas su pakankamai aukšta laikine skiriamąja geba, kas leidžia aptikti sparčią kinetinę individualių molekulių elgseną. Be to, PDJ nereikalauja jokios išorinės jėgos, tokios kaip buferio tėkmė, ir gali būti apjungiamas su kitais metodais, pavyzdžiui, OP ar MP (Hughes et al., 2014). Vis dėlto PDJ iš esmės yra tinkamas tyrinėti tik tiems baltymams, kurie sukelia pakankamai ženklius DNR molekulės ilgio pokyčius (įprastai DNR kilpojimą). Pavyzdžiui, norint iširti baltymo slydimą DNR molekule, baltymas turi būti imobilizuotas ant paviršiaus tam, jog jo mechaninis aktyvumas galėtų būti aptinkamas per dalelės judrumo pokyčius, tačiau tiesioginis baltymo pritvirtinimas prie paviršiaus dažnu atveju yra žalingas fermento aktyvumui. Kitas žymus PDJ trūkumas yra žema šio PM metodo laikinė skyra, kurią

apriboja laikas, reikalingas dalelei išnaršyti DNR molekulės ilgio nulemtą pusrutulinį regioną (Monico et al., 2013).

1.1.2. Optiniai pincetai

OP (1.1 pav., B, C), kitaip dar vadinami optiniai spąstais, yra vienas iš universaliausių PM manipuliacijos metodų, kurie dėl tam tikrų savo savybių puikiai tinka jėgos ir judesio matavimams realiu laiku. Optiniai spąstai yra sukuriama didelės skaitmeninės apertūros mikroskopo objektyvu sufokusuojant lazerio spindulį į difrakcijos apribotą tašką (Neuman ir Nagy, 2008). Šalia fokuso vietos yra suformuojamas labai stiprus elektrinio lauko gradientas. Dielektrinės dalelės (pavyzdžiui, polistireno arba kvarco mikrosferos), esančios netoli spindulio fokuso, dėl judesio kiekio perdavimo iš krintančių fotonų sugerties arba sklaidos patiria optinę jėgą, kuri įprastai susideda iš dviejų komponentų. Pirmoji komponentė yra sklaidanti jėga, kuri stumia dielektrinę dalelę išilgai šviesos sklaidimo krypties, o antroji – gradientinė jėga, kuri traukia dielektrinę dalelę išilgai erdvinio šviesos gradiento krypties. Tam, kad dalelę būtų galima stabiliai pagauti ir išlaikyti erdvėje, yra reikalinga pusiausvyra tarp gradientinės jėgos ir sklaidančios jėgos. Šis balansas nulemia, jog į spąstus pakliuvusi dalelė yra išstumama į ašinę pusiausvyrinę poziciją, kuri yra išsidėsčiusi pasroviui nuo tikslios lazerio fokuso vietos (Zhao et al., 2018). Esant nedideliems sugautos dalelės poslinkiams nuo jos pusiausvyrosios padėties, dalelę veikianti jėga yra tiesiškai proporcinga patirtam išstūmimui, todėl optiniai spąstai gali būti pakankamai gerai aproksimuojami kaip linijinė spyruoklė (Neuman ir Nagy, 2008).

OP yra plačiai naudojami baltymų-DNR sąveikų studijoms, kadangi šis PM metodas leidžia tirti minėtų molekulių biofizikines savybes ir suteikia galimybę mechanistiniu požiūriu nagrinėti šių biologinių makromolekulių sąveikas. Tipiškai, vienas individualios DNR molekulės galas per tam tikrą jungtuką yra pritvirtinamas prie dielektrinės dalelės, kuri, kaip jau minėta prieš tai, yra įkalinama didelės galios lazerio spinduliu. Tuo tarpu likęs DNR galas yra imobilizuojamas ant stiklo paviršiaus (viengubi OP (1.1 pav., B)) ar prikabinamas prie kitos dielektrinės dalelės, kuri yra palaikoma mikropipete (taip pat viengubi OP) arba dar vienu lazerio spinduliu (dvigubi OP (1.1 pav., C)). Palaipsniui judinant paviršių (viengubų OP atveju) arba vieną iš įkalintų dalelių (dvigubų OP konfigūracijoje) toliau nuo kitos pagautos dalelės, nukleoproteiniam kompleksui gali būti sukeliamas vis didėjantis tempimas (Mohapatra et al., 2020). Kitaip tariant, optinių spąstų dėka pavienėms DNR arba su jomis sąveikaujančioms individualioms baltymų molekulėms galima suteikti reguliuojamas pN eilės apkrovas ir tokiu būdu tyrinėti nuo jėgos

priklausomus kinetinius reakcijų greičius. Be to, dvigubi OP leidžia tiksliai kontroliuoti atstumą tarp vienos DNR molekulės galų, nereikalauja DNR dažymo, padeda išspręsti potencialių nepageidaujamų paviršiaus efektų problemą ir suteikia stabilią, nuo dreifų ir mikroskopo staliuko mechaninių vibracijų laisvą atramą, kas dar labiau padidina šio metodo efektyvumą lokalizacijos ir sekimo eksperimentuose. Dėl šių savo savybių dvigubi optiniai spąstai tuo pačiu metu įgalina ne tik valdomų pN eilės jėgų suteikimą biomolekulėms, bet taip pat gali būti naudojami ir baltymų-DNR tarpusavio sąveikos indukuotų sub-nanometrinių poslinkių matavimui. Pasitelkus viengubus arba dvigubus OP, vienos molekulės lygyje buvo tiriama REazių, DNR reparacijos baltymų, DNR pakavimą į virusų kapsides katalizuojančių fermentų ir tokių baltymų, kaip RNR polimerazė, šerdies histonai, T7 helikazė, lambda egzonukleazė bei RecBCD helikazė, sąveika su DNR (Monico et al., 2013). Optiškai homogeninių preparatų ir itin grynų mėginių reikalingumas, dėl didelio intensyvumo lazerio naudojimo atsirandantis lokalus įkaitimas, deguonies nulemti fotopazaidų procesai įkalintose biomolekulėse – visa tai yra tik keletas iš kitų nepaminėtų OP trūkumų ir apribojimų (Neuman ir Nagy, 2008). Vis tik pagrindinis optinių spąstų trūkumas yra žemas šio PM metodo našumas (Mohapatra et al., 2020).

1.1.3. Magnetiniai pincetai

MP (1.1 pav., D) atveju vienas individualios DNR molekulės galas yra imobilizuojamas ant paviršiaus, o kitas jos galas yra pritvirtinamas prie mikrometrinių matmenų paramagnetinės dalelės. Tuomet kelių milimetrų atstumu virš tokio paviršiaus yra pastatomi du nuolatiniai magnetai arba elektromagnetai. Jų sudaromas magnetinis laukas sukuria jėgas, kurios vertikalčiai traukia magnetinę dalelę, kas kartu nulemia ir DNR molekulės išsitemimą. Keičiant magnetų atstumą nuo paviršiaus, sukeliamos jėgos gali būti pasirinktinai varijuojamos 0,001-100 pN intervale tam, jog būtų išgautas norimas DNR ištiesimas. Be to, sukant magnetus x-y plokštumoje, DNR molekulei yra suteikiamas sukimo momentas, todėl šis PM metodas gali būti naudojamas dvigrandinės DNR (dgDNR) molekulės susukimui arba išvyniojimui su sąlyga, kad abejos DNR grandinės viename gale yra fiksuotos ant paviršiaus, o kitame – ant magnetinės dalelės (Hilario ir Kowalczykowski, 2010; Tinoco ir Gonzalez, 2011).

MP leidžia matuoti lėtus molekulinis procesus, kuriuose pasireiškia tiek tam tikros jėgos, tiek ir sukimo momentas. Dėl suteikiamos galimybės tiksliai valdyti sukuriamą tempimą ir teigiamų bei neigiamų susisukimų kaupimąsi ant DNR molekulės, MP puikiai tinka DNR topologijos ir fermentų katalizuojamų mechanizmų, kurie moduliuoja DNR superspiralizaciją,

tyrimams (Monico et al., 2013). Šiuo metodu vienos molekulės lygyje buvo tyrinėjama topoizomerazių, polimerazių, REazių, DNR helikazių, dalyvaujančių DNR reparacijoje, ir kitų baltymų sąveika su DNR (Hughes et al., 2014). Pavyzdžiui, MP buvo tiriami superspiralizuotos DNR relaksacijos procesai, kuriuos sukelia I tipo topoizomerazių šešėimui priklausanti topoizomerazė V. Šios studijos metu mokslininkams pavyko realiu laiku stebėti daugybę skirtingo dydžio susukimo-atpalaidavimo (angl. *turn-relaxation*) įvykių (Zhao et al., 2018). Eksperimentų, paremtų MP, metu DNR ir baltymo molekulės dažniausiai nėra tiesiogiai vizualizuojamos. Vietoje to, įprastai šviesaus lauko mikroskopijos pagalba yra stebimi prie DNR pririštos magnetinės dalelės vertikalios poslinkio pokyčiai, kas leidžia atskleisti baltymo veikimo ant DNR mechaninius padarinius (Hilaro ir Kowalczykowski, 2010).

Lyginant su optiniais spąstais, MP aparatūros sumontavimas yra sąlyginai paprastas. Kitas MP privalumas yra tas, jog jie iš pagrindų veikia kaip jėgos gnybtų (angl. *force-clamp*) prietaisai. Vis tik didžiausias šio PM metodo pranašumas – galimybė atlikti eksperimentus su daugeliu molekulių lygiagrečiai (Monico et al., 2013). Kadangi magnetų sukuriama magnetinis laukas yra vienodas dideliame plote, vienu metu yra įmanoma vizualizuoti ir manipuluoti dideliu kiekiu magnetinių dalelių, kurios yra pritvirtintos prie DNR, todėl MP gali būti sėkmingai realizuoti kaip didelio našumo PM metodas. Kita vertus, MP nėra iš tolo nėra toks įvairiapusiškas metodas, kaip OP, kurie leidžia nepriklausomai judinti kiekvieną spąstą, kai tuo tarpu MP užtikrina tik izotropinę visų magnetinių dalelių manipuliaciją (Hughes et al., 2014).

1.1.4. Atominės jėgos mikroskopija

AJM (1.1 pav., E) yra vienas iš skenuojančio zondo mikroskopijos variantų, kuriame paviršiaus savybės yra tiriamos naudojant atomiškai aštrią galvutę, kas leidžia kartografuoti bandinio paviršiaus charakteristikas sub-nanometriniu skiriamąja geba (Neuman ir Nagy, 2008). Prie AJM zondo pritvirtinta galvutė, kurios ilgis yra mikroskopinio masto, o kreivumo spindulys – nanometrinių matmenų, įprastai yra pagaminta silicio (Si) pagrindu (pavyzdžiui, iš Si nitrido) ir sąveikauja su mėginio paviršiumi veikiant tokioms nekovalentinėms jėgomis, kaip elektrostatinė sąveika, van der Valso traukos jėga ir Pauli arba Kulono stūma. Traukiančiosios sąveikos pakreipia zondą link bandinio paviršiaus, o stūmos sąveikų jėgos nukreipia zondą nuo paviršiaus. Zondo nuokrypis dažniausiai yra aptinkamas optinės sistemos pagalba, pasitelkiant lazerio spindulį, kuris atsispindi nuo zondo nugarėlės ir yra suprojektuojamas ant pozicijai jautraus fotodetektoriaus. Grįžtamojo ryšio sistema suvaržo sąveikos jėgas tarp zondo galvutės ir mėginio

paviršiaus atitinkamai reguliuodama atstumą tarp galvutės ir bandinio. Iš grįžtamojo ryšio kilpos ateinantis signalas taip pat indikuoja apie mėginio aukštį kiekvienoje pikselio pozicijoje ir tarnauja kaip pamatas, pagal kurį yra sugeneruojamas bandinio topografinis žemėlapis (Miller et al., 2017; Bangalore et al., 2018).

AJM gali būti pritaikyta tiek jėgos matavimams, tiek ir vaizdinimo tikslams. Jėgos matavimo eksperimentų metu AJM zondas juda vertikaliai per pjezoelektrinę pavara. Zondo galvutė yra pririšama prie biomolekulės tam, jog pastaroji po to galėtų būti traukiama bei stūmiama siekiant nustatyti jėgos poslinkio kreivę, iš kurios galima spręsti apie biologinio mėginio molekulinės konformacijos pokyčius. Kaip jau minėta prieš tai, AJM vaizdinimo metu zondas atlieka dvidimensinį (2D) skenavimą per bandinio paviršių ir tokiu būdu sugeneruoja mėginio paviršiaus profilį (Miller et al., 2017). AJM vaizdinimas gali būti atliekamas vienu iš šių trijų veikimo režimų: kontaktiniu režimu, bekontakčiu režimu arba virpančio zondo režimu (angl. *tapping mode*). Kontaktinio režimo metu zondo galvutė skenuoja paviršių ir yra tiesioginiame sąlytyje su bandiniu. Bekontakčiame režime zondo galvutė yra virpinama virš mėginio paviršiaus jai tiesiogiai nesiliečiant su bandiniu, o nuskaitymo proceso metu atsirandančios traukiančiosios sąveikos tarp galvutės ir mėginio yra aptinkamos kiekvienoje pikselio pozicijoje. Virpančio zondo režimo metu galvutė taip pat yra virpinama virš mėginio paviršiaus, tačiau kiekvieno osciliacijos ciklo žemutinėje amplitudėje zondo galvutė tiesiogiai priliečia (patapšnoja) bandinio paviršių. Šiame veikimo režime yra aptinkamas virpesių amplitudės sumažėjimo, kuris atsiranda dėl vykstančių sąveikų tarp zondo galvutės ir mėginio paviršiaus, laipsnis (Bangalore et al., 2018). Baltymų ir DNR tarpusavio sąveikų tyrimams ir kitoms biologinėms studijoms atlikti AJM vaizdinimas įprastai yra atliekamas virpančio zondo režimu, kadangi šis AJM veikimo režimas ne tik leidžia didesniu jautrumu matuoti paviršines sąveikas, bet jis taip pat sukelia mažiau žalos biologiniam mėginiui bei suteikia galimybę atlikti ilgesnės trukmės vizualizaciją (Mohapatra et al., 2020).

Vienas iš pagrindinių AJM vaizdinimo, naudojamo baltymų ir DNR sąveikų tyrimams, privalumų yra nanometrinių masto individualių molekulių ir molekulinė agregatų skyra. Nors AJM ir negali sugeneruoti baltymų-DNR formuojamų kompleksų struktūrų atomine skiriamąja geba, kaip kad tą įgyvendina, pavyzdžiui, rentgenostruktūrinė analizė, tačiau AJM leidžia vienos molekulės lygiu tiesiogiai vizualizuoti baltymų ir DNR kompleksus baltymams būdingų specifinių DNR taikinių kontekste bei esant skirtingoms sąlygoms. AJM vaizdinimo metu gauti vaizdai suteikia struktūrinės informacijos apie baltymų, kurie yra prisijungę prie nespecifinių

DNR vietų, laikinus kompleksus, kas nėra prieinama atliekant kristalografinius tyrimus ar taikant kitus metodus, kurie yra paremti ansamblio matavimais. Baltymo sukelti DNR struktūriniai pokyčiai, tokie kaip DNR sutankinimas ar kilpojimas, AJM pagalba gali būti aptikti tiek tiesioginiu būdu, atliekant vizualinę analizę, tiek ir kiekybiškai, pavyzdžiui, remiantis DNR kontūro ilgių statistine analize. Šio metodo užtikrinama vienos molekulės tridimensinė (3D) skiriamoji geba taip pat leidžia spręsti apie baltymų ir DNR formuojamų kompleksų stochiometrines bei konformacines ypatybes (Bangalore et al., 2018). Be to, AJM plėtra, kas apima tokius dalykus, kaip mažesnių zondų naudojimas ir vaizdų registracijos greičio patobulinimai, dar labiau padidino šio metodo pritaikomumą pavienių baltymų ir DNR sąveikų tyrimams. Pavyzdžiui, pasitelkus didelio greičio AJM, kurio užtikrinama laikinė skyra yra sekundžių ar netgi sub-sekundžių eilės, buvo vizualizuoti skirtingi DNR surišantiems baltymams būdingi taikinio paieškos režimai, tokie kaip slydimas, šuoliavimas ir tarpsegmentinis persėdimas (Mohapatra et al., 2020).

Nors AJM pasižymi aukšta (sub-nanometrine) raiška ir sąlyginai paprastu bei greitai bandinio paruošimu, tačiau šis PM metodas vis dėlto yra apribotas savo našumo ir jėgos skiriamosios gebos atžvilgiais. Biologinių klausimų, kurie galėtų būti atsakyti taikant šį metodą, įvairovė taip pat yra pakankamai ribota dėl realaus laiko fermentų kinetikos tyrimams būdingo sudėtingumo. Galiausiai, nespecifines sąveikas tarp AJM zondo galvutės ir biologinio mėginio paviršiaus ar tam tikrus ant paviršiaus besiadorbavusius teršalus neretai yra sunku identifikuoti, kas gali komplikuoti eksperimentų rezultatus (Zhao et al., 2018; Mohapatra et al., 2020).

1.1.5. Pavienių molekulių Forsterio rezonansinės energijos pernaša

FRET yra galingas įrankis, leidžiantis kiekybiškai įvertinti baltymų konformacinius pokyčius ir numanomas tarp dviejų gretimų biomolekulių vykstančias sąveikas, tokias kaip baltymų-baltymų ir baltymų-DNR sąveikos. Tam, jog būtų galima sekti sąveiką tarp dviejų biologinių molekulių, viena iš jų yra fluorescenciškai pažymima donoriniu fluoroforu, o kita – akceptoriniu fluoroforu (Takahashi et al., 2021). Pats FRET reiškinytis apibrėžia nuo atstumo priklausomą ir nespindulinę energijos pernašą iš donorinio fluoroforo akceptoriniam chromoforui per dipolio-dipolio sąveiką. Tam, kad FRET galėtų vykti, turi būti išpildytos trys pagrindinės sąlygos: donoro emisijos ir akceptoriaus absorbcijos spektrai privalo persidengti, donoras ir akceptorius vienas nuo kito neturi būti nutolę didesniu kaip 10 nm atstumu, donoro ir akceptoriaus pereinamųjų dipolio momentų santykinė orientacija privalo leisti energijos

perdavimą (Farooq et al., 2014). Kai donoriniu ir akceptoriniu fluoroforais pažymėtas biomolekules skiria mažiau negu 10 nm, sužadintą elektroninę būseną pasiekusio donoro sužadavimo energija yra perduodama akceptoriumi per molekulinę orbitalių elektroninę rezonansą (Takahashi et al., 2021). FRET efektyvumas, arba kitaip – donoro sužadavimo įvykių, kurie pasibaigia energijos perdavimu akceptoriniam fluoroforui, dalis, vertinant apytiksliai, yra atvirkščiai proporcinga šeštuosiu laipsniu pakeltam atstumui tarp donoro ir akceptoriaus, todėl šis parametras leidžia ypatingai jautriai įvertinti atstumą tarp dviejų biomolekulių 1-10 nm intervale (Miller et al., 2017; Mohapatra et al., 2020).

Įvairūs ansamblio FRET metodai buvo panaudoti tyrinėjant biologinių sistemų dinamiką ir struktūrines ypatybes. Tačiau tiriamuose bandiniuose eksperimentų metu gali egzistuoti statinis heterogeniškumas (skirtumai tarp molekulių mėginyje) arba dinaminis heterogeniškumas (nuo laiko priklausomi individualių molekulių pokyčiai), kas turi didelės įtakos atliktų eksperimentų rezultatams ir surinktų ansamblio FRET duomenų interpretavimui. Tuo tarpu smFRET užtikrina individualios molekulės dinaminę laikinę skyrą, kas leidžia aptikti šias dvi skirtingas molekulių populiacijas (Farooq et al., 2014; Hughes et al., 2014).

SmFRET (1.1 pav., F) yra vienas iš FRET metodo variantų, kuriame donorinių ir akceptorinių fluoroforų pora yra sužadinama ir aptinkama ant vienos molekulės priešingai nuo ansamblio FRET, kuriame tai yra atliekama ant skirtingų molekulių. Prieš tai buvo minėta, jog FRET efektyvumas yra atstumo tarp donoro ir akceptoriaus funkcija. Dėl šios priežasties smFRET suteikia galimybę atlikti atstumo matavimus 1-10 nm intervale PM lygmeniu, o tai savo ruožtu leidžia stebėti vienoje molekulėje vykstančius konformacinius pokyčius (Zhao et al., 2018). Kitaip tariant, taikant šį PM metodą, galima nagrinėti ne tik molekulių heterogeninį elgesį, bet taip pat tirti ir individualių molekulių dinaminį procesus. SmFRET matavimai gali būti atliekami naudojant VVAF mikroskopą arba konfokalinį mikroskopą. Mažinant foną, abiem atvejais yra pasiekiamas pakankamai geras signalo/triukšmo santykis, tinkantis PM aptikimui. VVAF konfigūracijoje žadinančiojo lazerio intensyvumas eksponentiškai nyksta tolstant nuo paviršiaus, todėl apšvietimas iš esmės yra galimas tik ties stiklo paviršiumi, o foninis signalas, kurį sukelia tirpale esantys fluoroforai, yra sumažinamas. Konfokalinio mikroskopo konfigūracijoje fonas yra redukuojamas siauro plyšelio dėka, kuris eliminuoja nesufokusuotą šviesą (Mohapatra et al., 2020).

SmFRET buvo pritaikyta įvairių DNR helikazių, veikančių ant individualių DNR molekulių, DNR išvyniojimo mechanizmų analizei. Pavyzdžiui, naudojantis šiuo PM metodu,

buvo stebimi *S. cerevisiae* žiedo formos Mcm2-7 DNR helikazių atsivėrimas ir užsidarymas tuo metu, kai prereplikatyvinis kompleksas yra sutelkiamas prie replikacijos pradžios vietos, o tai mokslininkams po to suteikė naujų žinių apie replikacijos iniciacijos mechanizmą ir šio proceso kokybės kontrolę (Shashkova ir Leake, 2017). SmFRET taip pat buvo pasitelkta ir DNR reparacijos procesuose dalyvaujančio baltymo MutS prisijungimo ant DNR, turinčios apibrėžtą bp neatitikimą, dinamikos bei šio baltymo difuzijos tyrimams vienos molekulės lygyje (Hughes et al., 2014). SmFRET buvo sėkmingai pritaikyta nagrinėjant konformacinius pokyčius, vykstančius RNR polimerazėse, DNR polimerazėse, topoizomerazėse, rekombinazėse ir įvairiuose transkripcijos veiksmuose, bei tiriant šių baltymų sąveikas su DNR konformacinę dinamiką (Farooq et al., 2014).

1.1.6. DNR ištempimo tēkme analizė

Tēkmės indukuoto DNR išsitempimo analizės (1.1 pav., G) metu baltymų ir DNR sąveikos yra stebimos kaip baltymo pozicijos išilgai DNR molekulės funkcija (Mohapatra et al., 2020). Šis PM metodas yra paremtas individualių DNR molekulių, kurios įprastai būna pažymėtos interkaliojančiais fluorescenciniais dažikliais, imobilizavimu ant dengiamojo stikliuko paviršiaus, kur jos paskui hidrodinaminės tēkmės pagalba yra ištiesiamos išilgai savo kontūro ilgio. Leidžiant nuolatinę tēkmę, palei paviršių galima ištempti tokias DNR molekules, kurios prie stiklo paviršiaus yra pritvirtintos tik vienu savo galu. Hidrodinaminis tekėjimas taip pat gali būti panaudotas ir antrojo DNR molekulės galo specifiniam fiksavimui ant paviršiaus. Kadangi tokios ištiesios DNR molekulės yra labai arti dengiamojo stikliuko paviršiaus, DNR ištempimo tēkme analizės metodas yra puikiai suderinamas su VVAF mikroskopija, kurios dėka vienos molekulės lygyje galima vizualizuoti fluorescenciškai žymėtų baltymų ir DNR molekulių tarpusavio sąveikas (Monico et al., 2013).

Kaip alternatyvi šio PM metodo strategija, vienas individualios DNR molekulės galas gali būti pritvirtinamas prie stiklo paviršiaus, o kitas – prie superparamagnetinės dalelės. Tuomet ši dalelė veikiama magnetine jėga, kurią sukuria nuolatinis magnetas, patalpintas virš dengiamojo stikliuko. Dalelės levitacija eksperimento metu leidžia sumažinti nespecifines sąveikas tarp paviršiaus ir magnetinės dalelės (Zhao et al., 2018). Paleidus laminarinę vandeninio buferio tēkmę, dalelę pradeda veikti kontroliuojama žemų pN eilės (0,1-10 pN) tempimo jėga, kuri yra proporcinga tēkmės greičiui ir dalelės skersmeniui. Šios jėgos veikiama magnetinė dalelė kartu nulemia ir pririštos DNR molekulės išsitemimą. Minėtos dalelės vaizdinimas su labai dideliu

signalu/triukšmo santykiu yra atliekamas naudojant tamsaus lauko mikroskopiją. Dalelės judėjimas suteikia informacijos apie DNR ilgio pokyčius, kuriuos sukelia dgDNR ir viengrandinės DNR (vgDNR) tarpusavio virsmai, su DNR sąveikaujančių baltymų indukuota kompaktizacija arba įvairių topologinių ypatybių, tokių kaip kilpos ir superspiralės, susidarymas bei išsiformavimas. Kadangi dalelė yra sferiškai simetriška, jos centro pozicija gali būti lengvai sekama 1-10 nm tikslumu sub-pikselinio priderinimo dėka. Tokiems eksperimentams atlikti tipiškai yra naudojamas 15-50 kb ilgio dgDNR substratas (Hill et al., 2017; Mohapatra et al., 2020).

Pavienių DNR molekulių ištiesimas gali būti atliekamas ne tik hidrodinaminės tėkmės pagalba, bet taip pat ir DNR šukavimo būdu, kurio metu DNR yra tiesiogiai paguldoma ant dengiamojo stikliuko paviršiaus. Stiklo paviršius iš pradžių yra aktyvuojamas hidrofobiniais fragmentais, tokiais kaip polistirenas ar polimetilmetakrilatas (PMMA). Tuomet naudojant pastovų tekėjimą arba atitraukiant dengiamąjį stikliuką per oro-vandens sandūrą, DNR molekulės galima ištempti tarp dviejų ar daugiau taškų žemo pH sąlygose. Tokios ant paviršiaus nusodintos DNR molekulės po to įprastai yra vizualizuojamos pasitelkiant jau minėtą VVAF mikroskopiją. Vienas iš pagrindinių molekulinio šukavimo privalumų yra jo techninis paprastumas, tačiau šis metodas pasižymi ir keliais esminiais trūkumais. DNR ir baltymų vaizdinimas yra atliekamas ties stiklo paviršiumi, o tai gali sukelti sunkumų siekiant duomenų analizės metu atskirti ant paviršiaus esančius fluoroforus nuo tų, kurie yra ant DNR. Be to, pats dengiamojo stikliuko paviršius gali turėti nepageidaujamos įtakos baltymų-DNR sąveikoms ar abiejų biomolekulių natyvioms būsenoms (Hughes et al., 2014). Nepaisant šių apribojimų, DNR šukavimas yra puikiai tinkamas genominės DNR tyrimams vienos molekulės lygyje, kadangi šis metodas leidžia ne tik sekti erdvinis ir laikinius DNR pokyčius, pavyzdžiui, vykstančius genomo replikacijos metu, bet taip pat ir tiksliai lokalizuoti bei kvantifikuoti įvairias DNR molekulių tarpines struktūras, tokias kaip replikacijos burbulas ar šakutė, bei aukšta skiriamąja geba analizuoti pasikartojančias DNR sekas (Kaur et al., 2019).

Dar vienas iš DNR ištempimo tėkme analizės metodo variantų yra DNR virvės (angl. *DNA tighropes*), dar kitaip vadinamos iškeltos DNR platformomis, kuriose individualios DNR molekulės galai yra pakabinami ant dviejų mikrometro dydžio dalelių viršūnių naudojant hidrodinaminę tėkmę. Dalelės tipiškai yra padengtos poli-L-lizinu, kurio dėka DNR molekulės stipriai prikimba prie dalelių, todėl šiam metodui nėra būtinos nei specifinio pritvirtinimo strategijos, nei nuolatinė tėkmė, po to kai yra suformuojamos DNR virvės. Kadangi DNR

molekulės yra iškeltos virš stiklo paviršiaus, bet kurios kitos molekulės, kurios šiame aukštyje patenka į fokuso plokštumą, turi būti prisijungusios prie DNR, kai tuo tarpu visos neprisikabinusios molekulės prisideda prie bendro foninio triukšmo. Tai reiškia, jog baltymai, kurie sąveikauja su tokiais pakabintomis DNR molekulėmis, taip pat yra pakilę toliau nuo bet kokių prie paviršiaus nespecifiškai prisijungusių fluoroforų, todėl pastarieji nebetrukdo fluorescentinių taškų atskyrimui užregistruotų vaizdų analizės metu. DNR virvės buvo panaudotos bakterijose funkcionuojančio nukleotidų ekscizijos kelio nagrinėjimui, DNR reparacijos bazių ekscizijos būdu studijoms bei telomeras surišančių baltymų TRF1 ir TRF2 tyrimams (Hughes et al., 2014).

Iš esmės visi aukščiau paminėti DNR ištempimo tinkle analizės metodo variantai suteikia galimybę tame pačiame fluorescentinio mikroskopo matymo lauke stebėti kelias dešimtis ar net kelis šimtus individualių DNR molekulių, kurios yra ištiesios skysčio tekėjimo pagalba. Todėl šis PM metodas puikiai tinka baltymų ir DNR dinaminių sąveikų didelio našumo tyrimams (Takahashi et al., 2021). Vis tik DNR ištempimo tinkle analizės pritaikymą minėtam tikslui stipriai apriboja keletas esminių trūkumų. Kadangi šiame metode DNR yra atsitiktinai imobilizuojama ant tinkle celės stiklo paviršiaus, DNR molekulių skaičius per vieną mikroskopo matymo lauką privalo išlikti pakankamai mažas (ne daugiau kaip kelių dešimčių DNR molekulių) tam, jog būtų galima išvengti persidengiančių DNR molekulių. Be to, tokios ant paviršiaus fiksuotos individualios DNR molekulės pasižymi skirtingu ištiesimo laipsniu, vėlgi dėl tos pačios priežasties, kad šiame metode DNR prie stiklo paviršiaus yra pritvirtinama atsitiktiniu būdu. Galiausiai, dviem galais prie paviršiaus pririštų DNR molekulių atveju, DNR sekos orientacija DNR molekulės prikabinimo taškų atžvilgiu nėra žinoma (Robison ir Finkelstein, 2014). Siekiant įveikti šiuos pagrindinius DNR ištempimo tinkle analizės metodo apribojimus, buvo sukurta „DNR užuolaidų“ technologija, kuri bus plačiau apžvelgta sekančiame skyrelyje.

1.2. „DNR užuolaidų“ platforma

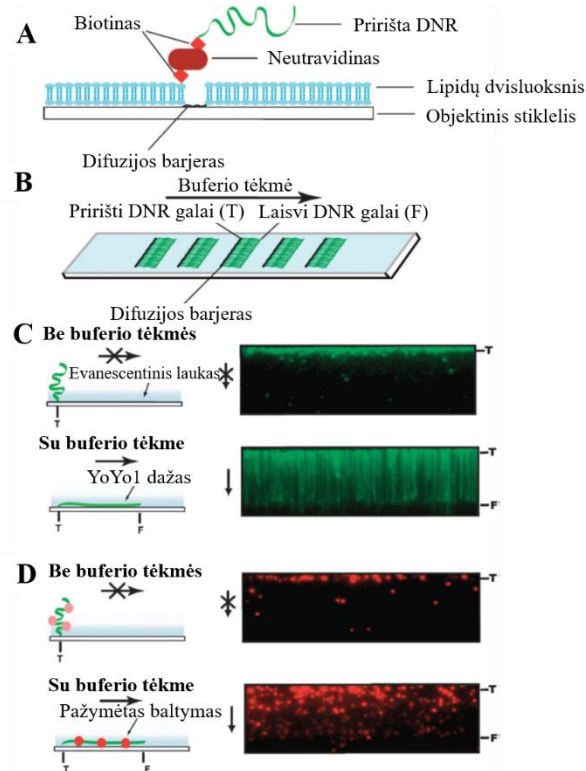
1.2.1. „DNR užuolaidų“ technologinis pagrindas ir jų gamybos būdai

„DNR užuolaidos“ (1.2 pav.) yra didelio našumo eksperimentinė platforma, skirta šimtų individualių DNR molekulių kryptingam organizavimui ir vaizdinimui viename mikroskopo matymo lauke. „DNR užuolaidų“ technologija paremta tuo, jog iš pradžių tinkle celės paviršius yra pasyvuojamas atraminiu lipidų dvisluoksniu (angl. *supported lipid bilayer*), kuriame dalis

lipidų galvučių yra funkcionalizuotos biotinu. Tuomet šis lipidų dvisluoksnis yra padengiamas neutravidino arba sAv monosluoksniu, prie kurio po to yra prijungiamas biotinilintas DNR molekulės galas. Lipidinio dvisluoksnio takumas užtikrina su lipidais surištos DNR ilgo nuotolio 2D judėjimą, todėl naudojant hidrodinaminę tėkmę, tokios DNR molekulės gali būti organizuotai išdėstomos ties difuzijos barjeriais, kurie yra suformuoti tėkmės celės paviršiuje bei yra statmenai orientuoti buferio tėkmės kryptims. Šie fiziniai barjerai sutrikdo šoninę lipidų difuziją, t.y. dvisluoksnyje esantys lipidai negali pereiti per tokius barjerus, ko pasekoje prie lipidų prisijungusios DNR molekulės susikaupia išilgai šių difuzijos barjerų priekinių kraštų. Galiausiai, šimtai pavienių DNR molekulių, veikiamų hidrodinaminės jėgos, ne tik lygiagrečiai išsilygiuoja išilgai minėtų barjerų, bet taip pat ir išsitiesia palei tėkmės celės paviršių, kas leidžia vizualizuoti visas šias DNR molekules naudojant VVAF mikroskopiją (Fazio et al., 2008; Robison ir Finkelstein, 2014; Silverstein et al., 2014).

Pasitelkus „DNR užolaidų“ eksperimentinį įrankį, viename mikroskopo matymo lauke realiu laiku galima stebėti šimtus fluorescenciškai žymėtų individualių baltymo-DNR kompleksų, kuriuos pavienės baltymų ir DNR molekulės tarpusavyje formuoja vykstančių jų dinaminių sąveikų metu. Dėl šios priežasties „DNR užolaidų“ technologijos dėka vieno PM eksperimento metu atsiranda galimybė surinkti itin didelį statistinių duomenų ir informacijos kiekį. Didelis našumas yra esminis „DNR užolaidų“ platformos pranašumas prieš daugelį kitų, prieš tai apžvelgtų individualių baltymų ir DNR sąveikų tyrimo metodų, kuriuose vieno eksperimento metu įprastai yra manipuluojama tik vienu arba daugiausiai iki kelių dešimčių baltymo-DNR kompleksų (Silverstein et al., 2014). Vis tik, norint visiškai charakterizuoti biocheminę reakciją, reikia atlikti daugybę ilgai trunkančių vienodo pobūdžio eksperimentų, kuriuose būtų išbandomos skirtingos reakcijos sąlygos, pavyzdžiui, keičiama baltymo sudėtis arba nukleotidų ar druskos koncentracija. Todėl siekiant to išvengti ir dar labiau padidinti „DNR užolaidų“ įrankio našumą, jis buvo sukombinuotas su PDMS paremta mikroskopsčių technologija (Robison ir Finkelstein, 2014). Kitas svarbus „DNR užolaidų“ eksperimentinės platformos privalumas yra tas, kad ji yra paremta atraminių lipidų dvisluoksnių naudojimu. Pastarieji yra puikiai suderinami su PM biocheminiais eksperimentais, kadangi lipidų dvisluoksniai tėkmės celėje suformuoja mikroaplinką, panašią į tokią, kuri paprastai yra sutinkama ir ląstelės viduje. Lipidų dvisluoksniai yra nesunkiai suformuojami, toleruoja įvairiais tirpalo sąlygas ir gali būti lengvai modifikuojami įterpiant sintetinius lipidus, turinčius pakeistas galvutes. Be to, iš cviterjoninių lipidų sudaryti dvisluoksniai apsaugo nuo DNR ir įvairių baltymų nespecifinės adsorbcijos ant paviršiaus, esant

beveik neutralioms pH vertėms (Granėli et al., 2006). Galiausiai, „DNR užuolaidų“ įrankis pasižymi ir tuo, jog jame visų individualių DNR molekulių orientacija DNR sekos atžvilgiu yra apibrėžta bei identiška, o naudojama pastovi buferio tėkmė palaiko vienodą visų šių DNR molekulių įtempimą (Robison ir Finkelstein, 2014).



1.2 pav. Didelio našumo „DNR užuolaidų“ technologijos veikimo principas. (A) Šoninis vaizdas, iliustruojantis komponentus, kurie sudaro „DNR užuolaidas“. (B) Vaizdas iš viršaus. Jame pavaizduotas objektinis stiklis, ant kurio yra išsidėsčiusios kelios „DNR užuolaidų“ eilės. (C) Kairėje – iliustracija, vaizduojanti pririštos DNR molekulės atsaką į buferio tėkmės pokyčius. Dešinėje – realūs mikroskopijos vaizdai, kuriuose matomas „DNR užuolaidų“ atsakas į buferio tėkmę ir jos sustabdymą. Kai buferio tėkmė yra sustabdyta, DNR molekulės difunduoja toliau nuo stiklo paviršiaus ir pasišalina iš evanescentinio lauko. DNR yra nudažyta fluorescuojančiu YOYO1 dažu. (D) Pavyzdinis eksperimentas, kuriame, panaudojant „DNR užuolaidų“ platformą, yra tirama fluorescenciškai pažymėto baltymo sąveika su DNR. Šiuo atveju DNR molekulės nėra fluorescenciškai pažymėtos, tačiau tiriamasis baltymas (chromatiną pertvarkantis fermentas Rdh54) yra pažymėtas vienu kvantiniu tašku. Buferio tėkmės nebuvimas nulemia su DNR susirišusių baltymų molekulių difuziją iš evanescentinio lauko. Kairėje – schematinė iliustracija, dešinėje – realūs mikroskopijos vaizdai. Parengta pagal (Visnapuu et al., 2008).

Kaip jau minėta prieš tai, „DNR užuolaidų“ technologijos praktiniam realizavimui yra būtini du pagrindiniai komponentai: atraminiai lipidų dvisluoksniai ir lipidų difuzijos barjerai. Pastarieji gali būti gaminami iš skirtingų medžiagų bei ant objekcinio stiklio paviršiaus suformuojami labai įvairiais būdais. Viena iš jų - difuzijos barjerų išdėdymas rankiniu būdu, kuomet stiklo paviršius yra raižomas deimantinę galvutę turinčiu grąžtu. Šis gamybos būdas

nereikalauja specializuotos įrangos, tačiau jis neleidžia kontroliuoti ęsdinamų barjerų pločio, gylio ir išsidėstymo. Todėl difuzijos barjerai tipiška yra suformuojami nanogamybos (angl. *nanofabrication*) būdu, kuris apima elektronų pluošto litografijos bei nanoįspaudimo (angl. *nanoimprint*) litografijos metodus, kurie abu pasižymi nanometriniu struktūrizavimo tikslumu (Greene et al., 2010). Elektronų pluošto litografijos metu mikroskopo objektinis stikelis iš pradžių yra padengiamas plona polimerine plėvele – PMMA dvisluoksniu, ant kurio yra suformuotas laidaus polimero „Aquasave“ sluoksnis. Elektronų pluoštas yra naudojamas siekiant polimerinėje plėvelėje išdegti norimą raštą ir atidengti po ja esantį stiklo paviršių. Tuomet metalas (įprastai chromas) yra išgarinamas vakuume ir nusodinamas ant viso paviršiaus įskaitant PMMA ir atidengtą stiklo paviršių. Likęs polimeras yra nulupamas atkėlimo (angl. *lift-off*) proceso metu, tokiu būdu ant mikroskopo objekcinio stiklelio paliekant tik metalines struktūras, kurios būtent ir veikia kaip lipidų difuzijos barjerai, kurie yra tvirti bei netrukdo fluorescenciškai žymėtų DNR molekulių optiniam vaizdinimui (Fazio et al., 2008; Finkelstein ir Greene, 2011). Fizinių barjerų gamyba nanoįspaudimo litografijos metodu yra pakankamai panaši į aukščiau aptartą, kur be elektronų pluošto bei atkėlimo procedūros naudojimo, kartu yra pasitelkiamas ir ęsdinamas induktyviai sujungta plazma (Greene et al., 2010).

Nors elektronų pluošto litografija pasižymi aukšta skiriamąja geba, ši barjerų gamybos būdą gerokai apriboja mažas jo našumas, kadangi šiam metodui būtinas elektronų pluošto rastrinis skenavimas išilgai kiekvieno nanobarjero segmento, kas riboja barjerų, kurie yra suformuojami ant kiekvieno objekcinio stiklelio paviršiaus, skaičių. Atsižvelgiant į nedidelį elektronų pluošto litografijos našumą ir į tai, jog šiam metodui yra reikalinga aukštos kainos specializuota įranga, lipidų difuzijos barjerų gamybai (chromo pagrindu) buvo sukurtas UV litografija paremtas metodas, kuris pasižymi dideliu našumu, yra greitas bei nereikalauja sudėtingos ir brangios aparatūros (Gallardo et al., 2015). Gaminant fizinius difuzijos barjerus elektronų pluošto ar nanoįspaudimo litografijos metodais, dažniausiai yra atliekamas plonų plėvelių, kurios yra sudarytos iš tokių metalų ar oksidų, kaip chromas, titano oksidas ar auksas, garų nusodinimas ant objekcinio stiklelio paviršiaus. Taip pat buvo pademonstruota, jog lipidų šoninę difuziją sutrikdantys barjerai gali būti gaminami ir iš alternatyvių medžiagų, pavyzdžiui, iš vandenilio silseskvioksano, kurio pagrindinis privalumas yra tas, kad ši neigiama atspari medžiaga panaikina metalų išgarinimo būtinumą, ko pasekoje supaprastėja ir sutrumpėja fizinių barjerų gamybos procesas (Fazio et al., 2012).

„DNR užuolaidų“ platformos realizavimui būtini nanobarjerai įprastai yra suformuojami iš chromo, o kaip jau minėta prieš tai, jų gamyba yra brangi ir užimanti nemažai laiko. Dėl šios priežasties objektiniai stikleliai, ant savo paviršiaus turintys suformuotos chromo barjerus, dažniausiai yra panaudojami pakartotinai, kas reiškia, jog tokie objektiniai stikleliai turi būti nuodugnai išvalomi po kiekvieno eksperimento tam, kad ant paviršiaus likusios organinės medžiagos nekliudytų sekančių eksperimentų atlikimui. Vis tik stiprios valymo priemonės (acetonas, rūgštys) ir šiurkštūs valymo metodai (sonikavimas, virimas) pažeidžia chromo barjerus, o naudojant švelnias valymo medžiagas, šie metaliniai barjerai vis tiek susidėvi po keliolikos panaudojimo ciklų ir pradeda sklaidyti žadinantįjį lazerio spindulį. Todėl siekiant išspręsti šias chromo barjerų sukeltas problemas, „DNR užuolaidų“ konstravimui dar visai neseniai buvo panaudotos nanometrinių matmenų tranšėjos (angl. *nanotrenches*), kurios taip pat kaip ir metaliniai barjerai, sutrikdo šoninę lipidų difuziją. Šie nauji kitokios prigimties fiziniai barjerai ant objekcinio stiklelio paviršiaus yra išraižomi elektronų pluošto litografijos ir reaktyvių jonų ėsdinimo metodų pagalba. Nanotranšėjos nedegraduoja net ir esant labai grubioms valymo sąlygoms, todėl stiklo paviršius gali būti visiškai švariai išvalomas nuo bet kokių teršalų likučių, kas užtikrina patikimą ir daugkartinį objektinių stiklelių pakartotinį naudojimą bei kiekvieno eksperimento metu leidžia gauti gerai organizuotas aukštos kokybės „DNR užuolaidas“ (Kang et al., 2020).

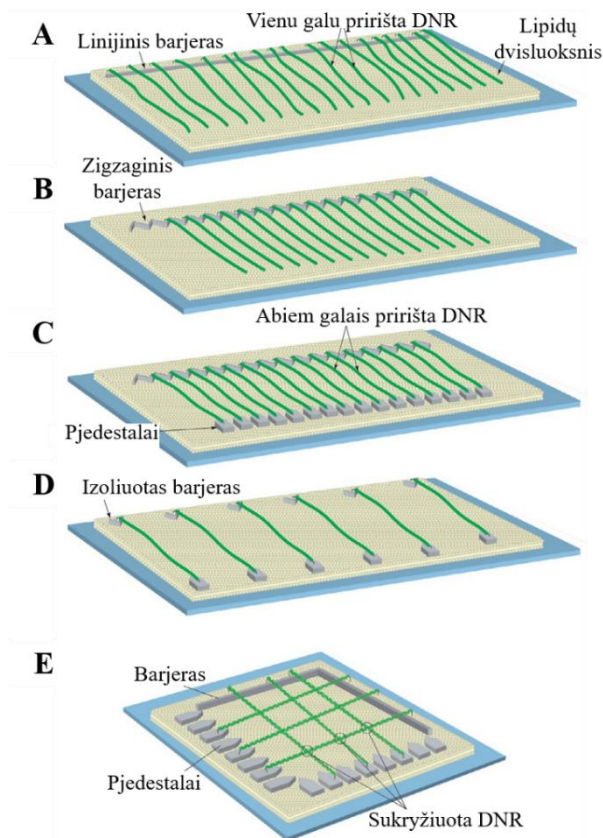
Atraminiai lipidų dvisluoksniai ir metaliniai difuzijos barjerai sudaro „DNR užuolaidų“ technologinį pamatą, tačiau jie kartu nulemia ir tam tikrus šios platformos trūkumus. Lipidų dvisluoksnių pagrindu funkcionuojančių sistemų paruošimas gali sukelti tam tikras eksperimentines rizikas, susijusias su sistemos stabilumu ir defektų valdymu. Tuo tarpu lipidų difuzijos nanobarjerų gamyba, kuriai gali būti naudojami įvairūs prieš tai aptarti gaminimo metodai, užima nemažai laiko, yra techniškai sudėtinga bei reikalauja ne tik specialių žinių atitinkamoje gamybos srityje, bet taip pat ir brangios riboto prieinamumo įrangos. Siekiant apeiti šiuos trūkumus, dar visai neseniai buvo sukurtas ir išplėtotas alternatyvia strategija paremtas „DNR užuolaidų“ įrankio variantas – orientuotos minkštosios „DNR užuolaidos“. Derinant atitinkamus skenuojančio zondo mikroskopijos ir minkštosios litografijos metodus – AJM su baltymų atkeliamuoju mikrokontaktiniu antspaudavimu – ant metoksi-PEG ir biotin-PEG molekulių mišinio sluoksniu padengto stiklo paviršiaus yra suformuojamos nanometrinių matmenų baltyminės linijos, susidedančios iš sAv arba traptavidino (tAv), prie kurių po to gali būti prijungiamos biotininės DNR molekulės. Tuomet, naudojant buferio tėkmę, šios ant

paviršiaus imobilizuotos individualios DNR molekulės yra ištiesiamos išilgai stiklo paviršiaus, kas įgalina jų vizualizaciją VVAF mikroskopijos metodu. Tokie minkštųjų „DNR užuolaidų“ konstravimo principai nulemia šios eksperimentinės platformos technologinį paprastumą, visapusišką preinamumą, pigumą ir spartumą, o greta viso to taip pat užtikrina ir jos didelį našumą (Tutkus et al., 2019; Kopūstas et al., 2021). Be to, neseniai buvo sukurta alternatyva apskritai visai „DNR užuolaidų“ technologijai – *“DNA skybridge”*. Šis įrankis, taip pat kaip ir „DNR užuolaidos“, suteikia galimybę dideliu našumu vaizdinti ir tirti baltymų-DNR sąveikas vienos molekulės lygyje. *“DNA skybridge”* platformos konstravimui yra reikalinga speciali 3D struktūra, sudaryta iš 4 mikrometrų aukščio plonų greta išsidėsčiusių kvarcinių barjerų, prie kurių viršūnių yra prijungiami individualių DNR molekulių galai. Kitas esminis *“DNA skybridge”* technologijos skirtumas nuo „DNR užuolaidų“ yra tas, kad joje imobilizuotų DNR molekulių vizualizacijai yra naudojama plono šviesos lakšto mikroskopija. Tokiu būdu sumažinamas ant paviršiaus esančių fluoroforų sukeliamas foninis triukšmas, ko pasekoje yra išgaunamas didelis signalo/triukšmo santykis, o klaidingi signalai, atsklindantys iš fluorescenciškai žymėtų baltymų, kurie yra nespecifiškai prisijungę ant paviršiaus, iš esmės neturi jokios įtakos pavienių baltymų ir DNR tarpusavio sąveikų vaizdinimui (Kim et al., 2019).

1.2.2. Konfigūracinė „DNR užuolaidų“ įvairovė

Siekiant atlikti įvairius specifinių sąlygų reikalaujančius PM eksperimentus, „DNR užuolaidos“ gali būti sukonstruotos keliomis skirtingomis konfigūracijomis (1.3 pav.). Viengubose „DNR užuolaidose“ (angl. *single-tethered “DNA Curtains”*) individualios DNR molekulės yra imobilizuojamos ant lipidų dvisluoksnio vienu savo galu, todėl jų vizualizacija VVAF mikroskopijos metodu yra galima tik naudojant nenutrūkstamą buferio tėkmę, kuri ištiesia DNR molekules palei stiklo paviršių. Šios „DNR užuolaidų“ konfigūracijos privalumas – galimybė laikinai sustabdyti buferio tekėjimą, kas eksperimento metu gali būti panaudota kaip standartinė kontrolė norint patikrinti, ar matomos pavienės DNR ir prie jos prisijungusios baltymų molekulės nėra nespecifiškai prilipusios prie tėkmės celės paviršiaus. Viengubos „DNR užuolaidos“ gali būti sukonstruotos naudojant linijinius (1.3 pav., A) arba zigzago formos barjerus (1.3 pav., B). Linijiniai lipidų difuzijos barjerai yra paprasti, tačiau jie gali nulemti ant paviršiaus fiksuotų individualių DNR molekulių persidengimą, kuris tam tikro tipo eksperimentuose yra nepageidaujamas. To išvengti padeda būtent zigzaginiu pavidalo fiziniai

barjerai, kurie užtikrina kiekvienos DNR molekulės erdvinį atskyrimą nuo jos artimiausios kaimynės (Granéli et al., 2006; Fazio, T. et al., 2008; Visnapuu et al., 2008; Collins et al., 2014).



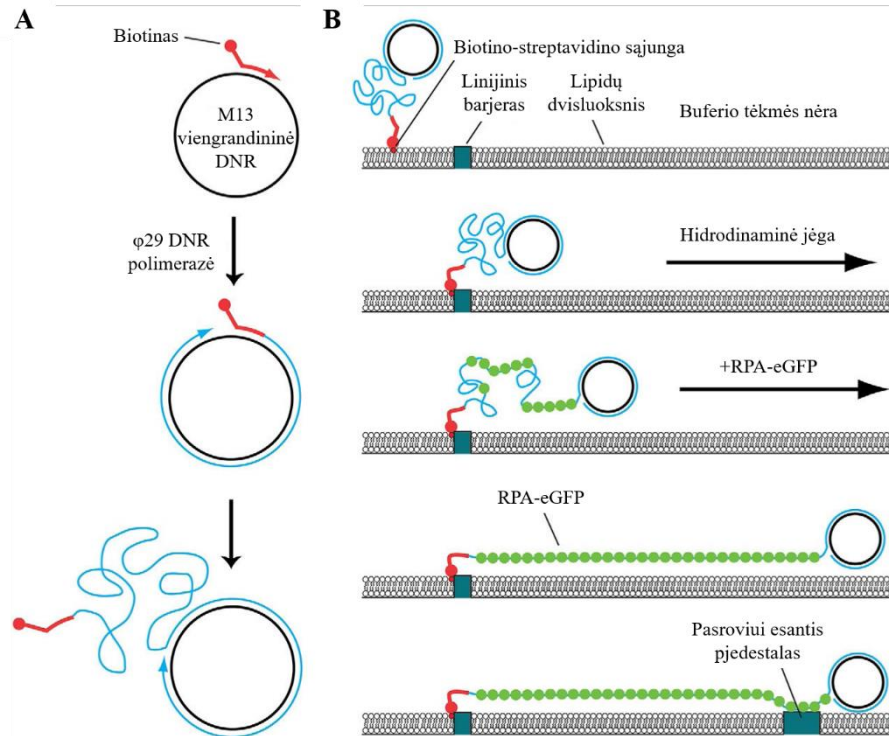
1.3 pav. Skirtingos „DNR užuolaidų“ konfigūracijos. (A) Viengubos „DNR užuolaidos“, surinktos naudojant linijinį barjerą. (B) Viengubos „DNR užuolaidos“, surinktos naudojant zigzaginiį barjerą. Atstumą tarp gretimų DNR molekulių nulemia zigzago „raštas“. (C) Dvigubos „DNR užuolaidos“, kuriose antrieji DNR molekulių galai yra prikabinami prie pasroviui esančių antikūnais padengtų pjedestalų, išsidėsčiusių virš lipidų dvisluoksnio. (D) Dvigubos „DNR užuolaidos“, surinktos naudojant *PARDI* struktūras. Tokiu būdu yra palaikoma itin žema lokali DNR molekulių koncentracija. (E) Sukryžiuotos „DNR užuolaidos“, kuriose tarp susikryžiusių DNR molekulių esantys susikirtimai (apibraukti apskritimais) reprezentuoja aukštos lokali DNR koncentracijos regionus. Parengta pagal (Collins et al., 2014).

Vis dėlto tam tikrus PM eksperimentus pageidautina atlikti be nuolatinės buferio tėkmės - dažniausiai tuomet, kai eksperimentui yra reikalingi brangūs reagentai arba kai eksperimento metu yra vaizdinama ir nagrinėjama pavienių baltymo molekulių sąveika su ant paviršiaus imobilizuota DNR. Būtent pastaruoju atveju buferio tekėjimo indukuota hidrodinaminė jėga gali potencialiai paveikti baltymų ar jų kompleksų elgesį, dėl ko gali sutrikti kai kurios baltymų-DNR tarpusavio sąveikos arba atsirasti nepageidaujamas tendencingumas, pavyzdžiui, baltymo judėjimo išilgai DNR molekulės ar taikinio paieškos metu. Dvigubose „DNR užuolaidose“ (angl. *double-tethered “DNA Curtains”*) pavienės DNR molekulės ant tėkmės celės paviršiaus yra pririšamos abiem galais, ko pasekoje jos gali būti vizualizuotos visu savo kontūro ilgiu net ir tada, kai nėra jokios buferio tėkmės (1.3 pav., C). Ši „DNR užuolaidų“ konfigūracija yra įgyvendinama naudojant du struktūrinius elementus: linijinius arba zigzaginius barjerus ir pasroviui esančius pjedestalus. Vienas DNR molekulių galas yra pritvirtinamas prie lipidų dvisluoksnio per specifinę biotino-sAv sąveiką ir tuomet buferio tekėjimo dėka tokios DNR molekulės yra lygiagrečiai išlygiuojamos ties lipidų difuzijos barjeriais bei ištempiamos palei stiklo paviršių. Kitas DNR molekulių galas tipiškai būna modifikuotas digoksigeninu (dig), kas

leidžia antrąjį ištiesų DNR molekulių galą imobilizuoti ant pjedestalų, kurie yra padengti antikūnais prieš digoksiną (anti-dig) (Gorman et al., 2010; Collins et al., 2014).

Be to, buvo sukurti dar du kitokie pakankamai retai naudojami dvigubų „DNR užuolaidų“ variantai – *PARDI* (angl. *parallel array of double-tethered isolated*) tipo „DNR užuolaidos“ (Wang et al., 2013) (1.3 pav., D) ir sukryžiuotos „DNR užuolaidos“ (Gorman et al., 2012) (1.3 pav., E) – kurie yra skirti daug labiau specializuotų eksperimentų atlikimui.

Prieš tai visuose apžvelgtuose „DNR užuolaidų“ variantuose ant paviršiaus yra pritvirtinami ir po to vaizdinami pavieniai dgDNR substratai, tačiau daugumoje biocheminių reakcijų, kurios apima DNR replikacijos ir reparacijos procesus, esminis tarpininko vaidmuo atitenka vgDNR. Dėl šios priežasties buvo išplėta dar viena „DNR užuolaidų“ eksperimentinės platformos modifikacija, kuri įgalina individualių vgDNR molekulių vizualizaciją. „VgDNR užuolaidų“ (1.4 pav.) surinkimo metu iš pradžių riedančio rato DNR replikacijos būdu yra atliekama ilgų vgDNR molekulių sintezė naudojant $\phi 29$ DNR polimerazę ir žiedinę vgDNR matricą, sulydytą su biotinilintu DNR pradmeniu. Po to, besisukančio rato replikacijos vgDNR produktai sAv-biotino sąveikos dėka yra imobilizuojami ant lipidų dvisluoksnio ir, pasitelkiant buferio tėkmę, lygiagrečiai išlygiuojami išilgai difuzijos nanobarjerų priekinių kraštų. Galiausiai, belieka tik vizualizuoti ant paviršiaus fiksuotas ištiesas pavienes vgDNR molekules, tačiau šį procesą apsunkina didelis vgDNR kompaktiškumas ir negalėjimas jos fluorescenciškai pažymėti interkaliojančiais dažikliais, kadangi pastaruoju atveju būtų pažeidžiamas vgDNR molekulių integralumas. Todėl vgDNR molekulių vaizdinimui yra pasitelkiamas su sustiprintu žaliai fluorescuojančiu baltymu (angl. *enhanced green fluorescent protein, eGFP*) arba su *mCherry* baltymu sulietas replikacijos baltymas A (angl. *replication protein A, RPA*), kuris prisijungia prie vgDNR ir pašalina jos antrinę struktūrą. RPA-vgDNR filamentai yra daug standesni už „nuogą“ vgDNR, ko pasekoje su RPA susirišusios vgDNR molekulės gali būti ištempiamos buferio tėkme ir vizualizuojamos VVAF mikroskopijos metodu. Be to, „vgDNR užuolaidos“ gali būti sukonstruotos ir dviguboje konfigūracijoje, kuomet RPA-vgDNR kompleksai yra nespecifiškai adsorbuojami ant atvirų prisitvirtinimo taškų, išsidėsčiusių pasroviui nuo lipidų difuzijos barjerų (Collins et al., 2014; Ma et al., 2017; De Tullio et al., 2018).



1.4 pav. „Viengrandininės DNR užuolaidų“ surinkimas. (A) Biotinilintas vgDNR substratas yra generuojamas riedančio rato replikacijos pagalba naudojant biotinilintą įvesties pradmenį, žiedinę vgDNR matricą, tokią kaip M13mp18, ir ϕ 29 DNR polimerazę. (B) Siekiant surinkti viengubas „vgDNR užuolaidas“, biotinilinta vgDNR iš pradžių yra pritvirtinama prie lipidų dvisluoksnio ir buferio tėkmės dėka išlygiuojama ties lipidų difuzijos nanobarjeriais. Tuomet į tėkmės celę įleidžiamas sulietinis baltymas RPA-eGFP, kuris fluorescenciškai pažymi vgDNR ir pašaliną jos antrinę struktūrą. RPA-eGFP patenkant į tėkmės celės kanalą, vgDNR tampa matoma ir palaipsniui išsivynioja bei išsitiesia palei lipidų dvisluoksnį. Norint surinkti dvigubas „vgDNR užuolaidas“, RPA-vgDNR kompleksas yra nespecifiškai adsorbuojamas ant atvirų pjedestalu, išsidėsčiusių pasroviui nuo difuzijos barjerų. Parengta pagal (De Tullio et al., 2018).

1.2.3. „DNR užuolaidų“ technologijos praktinio pritaikymo galimybės

Kaip jau minėta skyrelio pradžioje, „DNR užuolaidos“ yra eksperimentinis įrankis, skirtas baltymų-DNR sąveikų didelio našumo tyrimams vienos molekulės lygyje. Vis tik ši platforma baltymų ir DNR tarpusavio sąveikas geriausiai leidžia nagrinėti dviem esminiais aspektais. Pirmasis aspektas – baltymo prisijungimo prie DNR pasiskirstymas ir rišimosi vietos, kurioms baltymas teikia pirmenybę. Iš esmės visiems ant DNR vykstantiems biologiniams procesams reikalingas specifinis baltymų jungimasis su jiem savitomis taikinių sekomis, kas baltymams suteikia galimybę išgauti informaciją iš lokalių DNR sekų ir konformacinių ar cheminių pokyčių būdu perduoti tą informaciją kitiems tirpale esantiems baltymams. Būtent „DNR

užuolaidų“ technologijos pagalba galima visapusiškai charakterizuoti DNR surišimo landšaftus (angl. *landscapes*), baltymų gyvavimo trukmes ir baltymų-DNR sąveikų realaus laiko dinamiką (Collins et al., 2014). Antrasis aspektas – taikinio paieškos mechanizmai, kuriuos naudodami, baltymai geba selektyviai ir greitai rasti sau giminingas DNR atpažinimo sekas tarp daugybės kitų nespacificinių sekų. Baltymo vykdoma DNR taikinio paieška yra aiškinama remiantis palengvintos difuzijos modeliu, pasak kurio, DNR surišantis baltymas įprastai suranda savo taikinį, viendimensinę (1D) paiešką išilgai DNR molekulės kombinuodamas su 3D nukrypimu. 1D difuzija susideda iš santykinai trumpų dvikrypčių atstiktinių žingsnių, kurių metu baltymas, judėdamas išilgai linijinio DNR kontūro, atlieka jungtinių rotacijos-transliacijos judesį (slydimas), kartu apjungtą su trumpio nuotolio šuoliukais tarp kaimyninių DNR segmentų (šokinėjimas). Ląstelės viduje DNR egzistuoja globulės pavidalu, kur DNR formuoja daugybę kilpų ir sudaro fizinius kontaktus tarp nutolusių segmentų. 1D paieškos išilgai DNR molekulės metu baltymas gali atlikti trumpą šuolį aplink vieną iš šių kontaktinių taškų, ko pasekoje DNR surišantis baltymas peršoka nuo vienos vietos iki gerokai tolimesnės vietos išilgai DNR kontūro (tarpsegmentinis persėdimas). 3D difuzijos įvykiai susideda iš disociacijos nuo DNR į tirpalą ir po to sekančios reasociacijos, kas baltymui leidžia aplankyti DNR regionus, kurie nukleotidų sekos atžvilgiu yra pakankamai nutolę vienas nuo kito (Krepel et al., 2016; Park, S. et al., 2021). „DNR užuolaidų“ eksperimentinė platforma leidžia stebėti ir atskirti minėtus baltymų pasitelkiamus taikinio paieškos mechanizmus, kadangi šio įrankio dėka PM lygmenyje galima realiu laiku tiesiogiai vizualizuoti baltymų jungimąsi su DNR bei sekti jų judėjimą išilgai individualių DNR molekulių (Collins et al., 2014).

Taikant „DNR užuolaidų“ technologiją, vienos molekulės lygyje buvo patyrinėta labai įvairių baltymų sąveika su DNR. Pasitelkus „DNR užuolaidas“, realiu laiku buvo vizualizuotas *E. coli* RNR polimerazės rišimasis su fiziologinio promotoriaus sekomis, išsidėsčiusiomis ant bakteriofago λ DNR molekulės, ir kartu nustatytas RNR polimerazės jungimosi profilis. Šis įrankis panaudotas ir nukleosomų, kurios įprastai susideda iš histoninių baltymų oktamerų, pozicionavimo vaizdinimui – nukleosomų prisijungimo pasiskirstymai buvo įvertinti kaip DNR sekos funkcija, o be to, tarpusavyje buvo palyginti centromerinių nukleosomų bei kanoninių histonų rišimosi profiliai (Visnapuu ir Greene, 2009; Duzdevich et al., 2014). Pasinaudojus „DNR užuolaidų“ eksperimentine platforma, buvo parodyta, jog Msh2-Msh6 baltyminis kompleksas, kuris dalyvauja poreplikatyvinėje neatitikimų reparacijoje ir yra atsakingas už neteisingai suporuotų bazių bei mažų insercijos ar delecijos kilpų atpažinimą ir taisymą, slysta

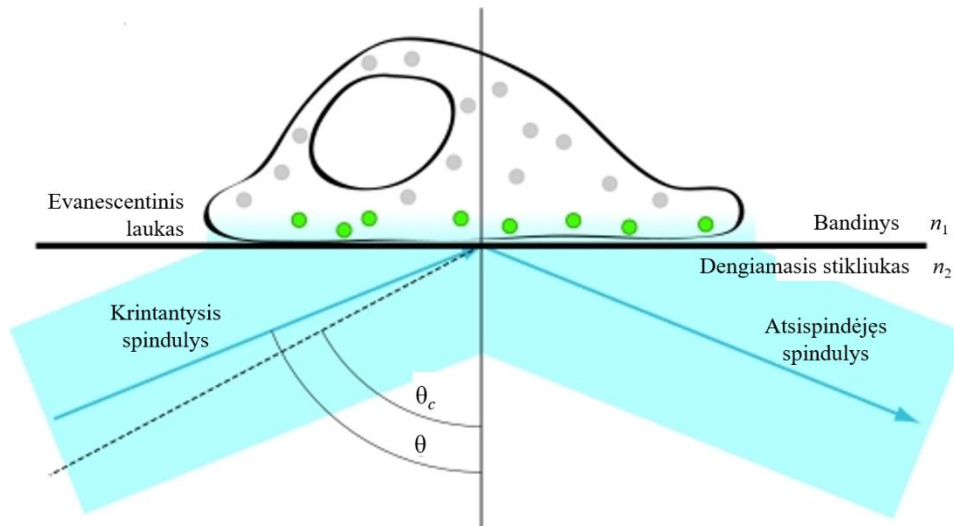
išilgai DNR 1D difuzijos pagalba iki tol, kol aptinka DNR pažeidimą (Gorman et al., 2007). Šios technologijos dėka PM lygmenyje buvo stebima *S. cerevisiae* PCNA (angl. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) dinamika ant modifikuotų fago λ DNR substratų (Kim, Y. et al., 2017), nagrinėjami difuzija paremti mechanizmai, kuriais mielėse veikiančios neatitikimų taisymo baltymai MutS α ir MutL α skenuoja DNR (Silverstein et al., 2014), tiriama RecBCD ir FtsK molekulių motorų, kurie atitinkamai dalyvauja homologinėje DNR rekombinacijoje bei vietai specifinėje DNR rekombinacijoje, sąveika su DNR ir vizualizuojama jų translokacija išilgai dgDNR (Finkelstein et al., 2010; Silverstein et al., 2014), vaizdinamas žmogaus genomo integralumo palaikyme dalyvaujančios Bloom helikazės veikimas ant individualių DNR molekulių (Xue et al., 2019). Be viso to, „vgDNR užuolaidų“ variantas buvo pritaikytas įvairių homologinėje rekombinacijoje dalyvaujančių baltymų, tokių kaip DNR rekombinazės Rad51 ir pastarojo veikime tarpininkaujančio baltymo Rad52, sąveikos su vgDNR tyrimams vienos molekulės lygyje (Gibb et al., 2014; Qi ir Greene, 2016).

1.3. Visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinė mikroskopija

Praėjusiuose apžvalgos skyreliuose minėta, jog pavienių baltymų-DNR sąveikų tyrimams skirti metodai, tokie kaip PDJ, smFRET, DNR ištempimo tėkme analizė ir „DNR užuolaidos“, dažnai yra derinami su VVAF mikroskopija, kurios pagalba galima selektyviai vaizdinti ties stiklo paviršiumi esančias fluorescenciškai žymėtas individualias DNR ir su ja sąveikaujančių baltymų molekules. VVAF mikroskopija taip pat gali būti pritaikyta ir ląstelės biologijos tikslams, pavyzdžiui, ląstelės-substrato kontaktų topografijos įvertinimui, endocitozės ir egzocitozės kelių nagrinėjimui, plazminėje ląstelės membranoje išsidėsčiusių receptorių tyrimams (Schneckenburger, 2005; Fish, 2009).

VVAF mikroskopija yra paremta visišką vidaus atspindžio reiškiniu (1.5 pav.). Kai šviesos spindulys pereina iš vienos terpės į kitą terpę, pasižymintį mažesniu lūžio rodikliu, sandūra tarp šių dviejų terpių nulemia, jog tam tikra dalis krintančios šviesos atsispindi, o kita jos dalis skirtingu kampu praeina kaip lūžęs spindulys. Lūžusios šviesos kampas priklauso nuo apšviečiančiojo spindulio kritimo kampo ir nuo abiejų terpių lūžio rodiklių, ką būtent ir apibrėžia Snelio dėsnis. Apšvietimo kampui artėjant prie kritinio kampo, kurį apsprendžia abiejų terpių lūžio rodikliai, lūžęs spindulys vis labiau artėja prie tapimo lygiagrečiu dviejų terpių sandūrai. Galiausiai, kuomet apšviečiantysis spindulys į šią sandūrą krinta didesniu negu kritinis kampas, lūžęs spindulys tampa lygiagretus minėtai sandūrai, o visa krintanti šviesa yra atspindima atgal,

tokiu būdu pasiekiant visišką vidaus atspindį. Esant šiam virškritiniam kampui, į sandūrą krintančio spindulio elektrinis laukas sukuria tokio paties bangos ilgio evanescentinę bangą, kuri prasitęsia į antrąją terpę. Tolstant nuo dviejų terpių sandūros vietos, šios evanescentinės bangos intensyvumas eksponentiškai mažėja, todėl ji apšviečia tik plonytį antrosios terpės tūrį (Reck-Peterson et al., 2010). Evanescentinės bangos, kuri yra ne kas kita kaip labai plonas elektromagnetinis laukas, prasiskverbimo gylis priklauso nuo krintančio spindulio bangos ilgio, apšvietimo kritimo kampo ir lūžio rodiklio pokyčio spinduliui keliaujant iš vienos terpės į kitą (Sanderson et al., 2014).



1.5 pav. Visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinės mikroskopijos fizikinis pagrindas. Žadinantysis spindulys (kairėje) krinta tam tikru kampu θ , kuris yra didesnis už kritinį kampą θ_c (pažymėtas punktyrine linija). Kampai yra matuojami nuo statmens. Žadinantysis spindulys atsispindi nuo dengiamojo stikliuko-bandinio sandūros, ko pasekoje priešingoje sandūros pusėje susidaro evanescentinis laukas. Tokiu būdu yra sužadinami tik tie fluoroforai, kurie patenka į evanescentinį lauką (sužadinti fluoroforai yra pažymėti žalia spalva, nesužadinti – pilkai). Tam, jog būtų pasiektas visiškasis vidaus atspindys, bandinio lūžio rodiklis (n_1) turi būti mažesnis už dengiamojo stikliuko lūžio rodiklį (n_2). Parengta pagal (Mattheyses et al., 2010).

Pasinaudojus minėtu optiniu efektu, VVAF mikroskopijos dėka galima selektyviai apšviesti tik nedidelę skystos fazės bandinio, esančio ant dengiamojo stikliuko, dalį. Kadangi evanescentinės bangos sklaidimas į antrąją terpę eksponentiškai nyksta, nuo abiejų terpių sandūros nutolus daugiau negu per maždaug 100-150 nm, šis elektromagnetinis laukas tampa labai silpnas ir nepakankamai intensyvus tam, kad galėtų sužadinti tokiu atstumu nuo stiklo paviršiaus nutolusius fluoroforus. Todėl tik tie fluoroforai, kurie patenka į evanescentinio lauko ribas, gauna pakankamą krintančios spinduliuotės energijos kiekį ir gali būti sužadinami, kai tuo tarpu visi kiti mėginyje esantys fluoroforai išlieka tamsūs. Eliminuoamos iš tirpalo gilumos atsklindančią

foninę fluorescenciją, tokios apšvietimo sąlygos leidžia išgauti aukštus signalo/triukšmo santykius (Reck-Peterson et al., 2010).

VVAF mikroskopija tipiškai yra skirstoma į dvi kategorijas – prizme paremtą VVAF mikroskopiją ir objektyvu paremtą VVAF mikroskopiją, iš kurių kiekviena pasižymi savita optine konfiguracija. Prizmės tipo VVAF mikroskopijoje apšviečiančiojo lazerio spindulys į stiklo/skysčio sandūrą yra įvedamas iš mikroskopo viršaus, naudojant prizmę, kai tuo tarpu fluoroforų fluorescencija yra surenkama mikroskopo objektyvu, esančiu priešingai prizmei pusėje. Kitaip tariant, apšvietimo optika, skirta evanescentinės bangos sukūrimui, yra visiškai nepriklausoma nuo mikroskopo fokusuojančiosios optikos (Wazawa ir Ueda, 2005). Objektyvo tipo VVAF mikroskopijoje tas pats objektyvo lęšis yra naudojamas tiek šviesos nukreipimui į dengiamojo stikliuko/bandinio sandūrą, tiek ir vykstančios fluorescencijos surinkimui. Kaip jau minėta, norint pasiekti visiškąjį vidaus atspindį, apšviečiančiojo spindulio kritimo kampas privalo būti didesnis už kritinį kampą, todėl objektyvu paremtoje VVAF mikroskopijoje atsiranda būtinybė naudoti aukštos skaitmeninės apertūros (1,45 ar didesnės) objektyvus, kurie įprastai būna paženklinėti kaip VVAF objektyvai (Sanderson et al., 2014).

Vienas iš pagrindinių prizmės tipo VVAF mikroskopijos privalumų yra tas, jog prizme paremtos sistemų konstravimui galima panaudoti labai įvairius dažnoje mikroskopijos laboratorijoje esančius optinius komponentus, todėl šios sistemos tipiškai būna pakankamai pigios ir nėra apribotos tam tikro gamintojo ar konkrečios mikroskopo sistemos pasirinkimu. Kiti prizme paremtos VVAF mikroskopijos privalumai – „grynesnė“ evanescentinė banga ir dažnu atveju didesnis matymo laukas lyginant su objektyvo tipo VVAF mikroskopija. Vis dėlto prizme paremtos sistemos pasižymi ir tam tikrais esminiais trūkumais, pavyzdžiui, tokiais kaip, kad pasiruošimas kiekvienam eksperimentui yra pakankamai komplikotas, o pats priėjimas prie bandinio eksperimento metu gali būti labai apribotas priklausomai nuo prizmės pozicijos. Tuo tarpu objektyvo tipo VVAF mikroskopija turi nemažai įvairių pranašumų, iš kurių pagrindinis yra toks, kad objektyvu paremtomis sistemomis yra sąlyginai paprasta naudotis, kadangi pasiruošimas eksperimentui nereikalauja vaizdinamo paviršiaus optinio sukabinimo su prizme panaudojant tokias medžiagas kaip, pavyzdžiui, glicerolį, o pats bandinys eksperimento atlikimo metu yra pilnai pasiekiamas. Tačiau skirtingai nei prizme paremtos sistemos, objektyvo tipo VVAF mikroskopija neleidžia išgauti tokios „grynos“ evanescentinės bangos, kadangi šiame VVAF mikroskopijos variante žadinantysis spindulys yra įvedamas per objektyvo galinę fokuso plokštumą, dėl ko yra išbarstoma daugiau spindulių. Dėl šios priežasties taip pat sumažėja

signalo/triukšmo santykis, o dar vienas objektyvu paremtos VVAF mikroskopijos trūkumas yra ir tas, kad jos sukuriama evanescentinės bangos plotis dažnu atveju yra mažesnis už mikroskopo matymo lauką, kas nulemia intensyvumo sumažėjimą registruojamų vaizdų kraštuose (Toomre, 2012; Poulter et al., 2015).

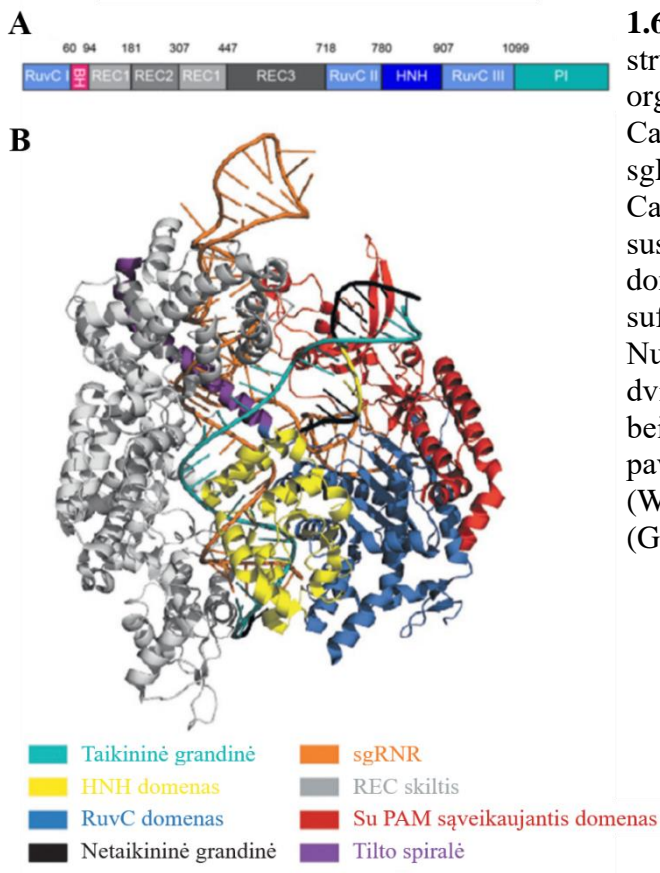
1.4. Cas9 endonukleazė

CRISPR-Cas sistema yra prokariotuose funkcionuojanti įgytojo imuniteto sistema, kuri jiems suteikia apsaugą nuo puolančių bakteriofagų ir kitų mobilių genetinių elementų (Gupta et al., 2019). Ši sistema susideda iš Cas genų klasterio ir jo atitinkamo CRISPR regiono. Pastarasis yra sudarytas iš kartotinių sekų (tiesioginių pasikartojimų), kurias perskiria trumpi nesikartojančių sekų, vadinamų skirtukais, ruožai. Šios nesikartojančios sekos yra kilusios iš trumpų svetimos genetinės medžiagos segmentų – proskirtukų. Ląstelėje CRISPR sritis yra transkribuojama ir apdorojama į trumpas CRISPR RNR (crRNR) molekules, kurios Votsono-Kriko bazių poravimosi būdu nukreipia Cas baltymus link taikinio nukleorūgščių ir užtikrina jų sunaikinimą (Nishimasu et al., 2014). CRISPR-Cas sistemos yra skirstomos į I ir II klasės sistemas. I klasės CRISPR-Cas sistemos apima I, III ir IV tipus, o II, V ir VI tipai sudaro II klasės CRISPR-Cas sistemas. Kiekviena iš šių skirtingam tipui priklausančių CRISPR-Cas sistemų turi savo „firmines“ endonukleazes (Khan et al., 2018).

CRISPR-Cas9 sistema pagal minėtą klasifikaciją yra priskiriama II klasės II tipo sistemoms. Endogeninės CRISPR-Cas9 sistemos atveju taikinio kirpimui yra būtini trys pagrindiniai komponentai: Cas9 baltymas, crRNR ir transaktyvuojanti crRNR (tracrRNR), kuri dalyvauja crRNR brendime ir Cas9 ribonukleoproteininio (RNP) komplekso susidaryme. Šios sistemos veikla yra įgyvendinama trimis etapais. Pirmoji stadija yra adaptacijos procesas, kurio metu atitinkama Cas nukleazė apdoroja puolančiojo fago DNR iki mažų DNR fragmentų – proskirtuko sekų – kurios po to yra inkorporuojamos į prokariotinio organizmo genomo CRISPR lokusą kaip nauji skirtukai. Antroji stadija yra crRNR biogenezė, kurios metu CRISPR regionas yra transkribuojamas į ilgą crRNR pirmtaką (pre-crRNR). TracrRNR hibridizuojasi su pre-crRNR pasikartojančiomis sekomis ir tuomet ribonukleazė III sukarpo šį kompleksą, ko pasekoje susidaro subrendusios crRNR molekulės, iš kurių kiekviena turi po vieną skirtuką ir dalinę kartotinę seką. Paskutinis trečiasis etapas yra egzogeninės DNR interferencija, kurios metu vedančioji RNR (angl. *guide RNA*, *gRNA*) nukreipia Cas9 baltymą link komplementarių svetimų

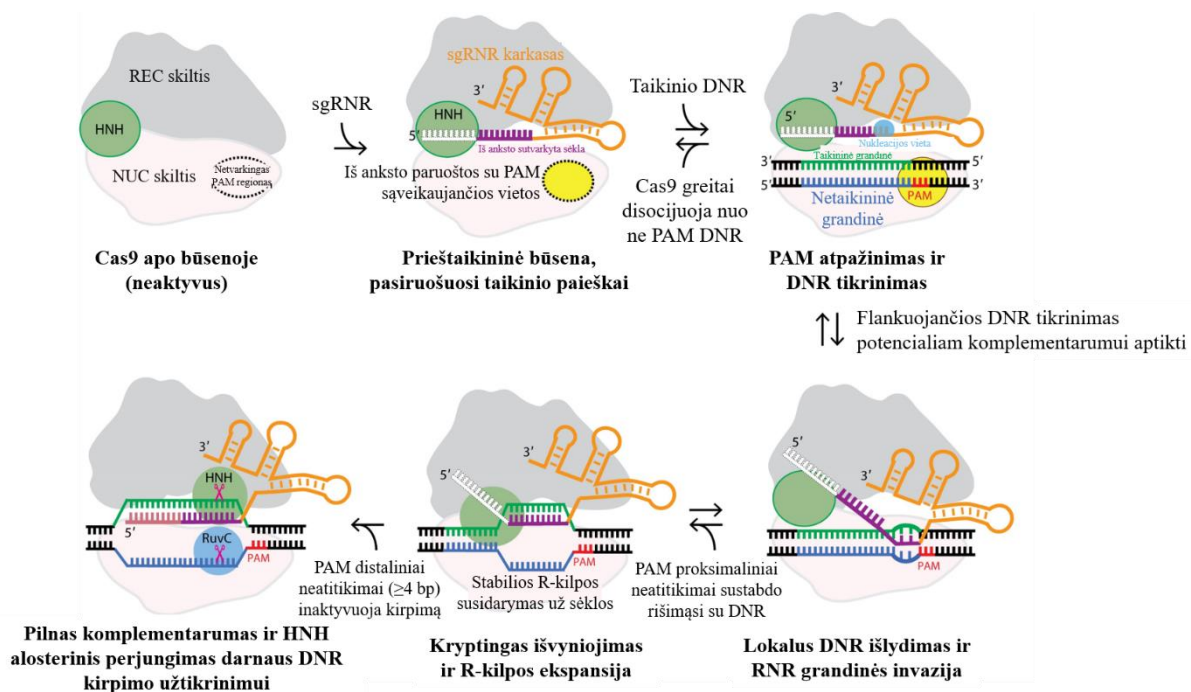
nukleorūgščių, kas sukelia besibraunančiųjų fagų DNR sekų degradaciją (Hryhorowicz et al., 2017).

Skirtingų organizmų Cas9 baltymai struktūriškai yra labai įvairūs – jų ilgis siekia nuo 950 iki 1650 aminorūgščių ir kai kurie iš jų tarpusavyje dalijasi tik 6% aminorūgščių sekos identiškumu bei 12% panašumu. Tačiau nepaisant šios įvairovės, visi Cas9 baltymai turi dviskiltę struktūrą (1.6 pav.), sudarytą iš nukleazinės (NUC) ir atpažinimo (REC) skiltių. NUC skiltis susideda iš dviejų nukleazinių domenu – HNH ir RuvC – bei C-galinio su proskirtukui gretimumu motyvu (angl. *protospacer adjacent motif*, PAM) sąveikaujančio domeno (PI). REC skiltį sudaro trys α -spiraliniai domenai (REC1-3) ir ilga argininu praturtinta spiralė – tilto spiralė (angl. *bridge helix*, BH), kuri sujungia dvi minėtąsias skiltis (Wilkinson et al., 2019). HNH ir RuvC domenai kerpa vgdNR ir yra atsakingi už baltymo nukleazinį aktyvumą. PI domenas apsprendžia baltymo specifiškumą PAM sekai ir yra atsakingas už Cas9 jungimosi prie taikinio DNR iniciaciją. REC1 domenas yra atsakingas už gRNR surišimą. BH jungiasi su taikinio DNR ir yra labai svarbus karpymo aktyvumo iniciacijos komponentas (Nishimasu et al., 2014; Gupta et al., 2019).



1.6 pav. Bendra Cas9 endonukleazės struktūra. (A) Cas9 baltymo domenu organizacija. (B) *Streptococcus pyogenes* Cas9 nukleazės, esančios komplekse su sgRNR ir taikinio DNR, kristalinė struktūra. Cas9 fermentas yra pusbūglio formos ir susideda iš dviejų skiltių. Trys atpažinimo domenai (REC1-3) ir tilto spiralė (BH) suformuoja Cas9 baltymo REC skiltį. Nukleazinė skiltis (NUC) yra sudaryta iš dviejų nukleazinių domenu (RuvC ir HNH) bei su PAM sąveikaujančio (PI) domeno. Šio paveikslėlio (A) dalis yra parengta pagal (Wilkinson et al., 2019), (B) dalis – pagal (Globyte ir Joo, 2019).

Molekulinis Cas9 endonukleazės veikimo mechanizmas (1.7 pav.) yra ištyrinėtas labai nuodugniai. Iš pradžių, susiformavęs Cas9 RNP kompleksas žvalgosi po ląstelę ieškodamas komplementarios taikinio sekos. Šią nuolatinę paiešką jis atlieka prisijungdamas prie sau savitų, Cas9 baltymo iš atitinkamos rūšies organizmo apspręstų PAM sekų, kurios yra išsidėsčiusios ant apieškomos DNR molekulės. Cas9 efektoriniam kompleksui susirišus su PAM, tiesiai prieš pat PAM seką įvyksta lokalus DNR grandinių atskyrimas, leidžiantis potencialaus taikinio sekai pradėti poruotis su crRNR sudėtyje esančiu skirtuku. Sėkmingu bazių poravimosi sąveikų tarp „kvočiamo“ taikinio DNR grandinės ir crRNR skirtuko sekos atveju yra pratęsiamas DNR grandinių išlydymas. DNR grandinės išstūmimas tęsiasi link PAM distalinio regiono, kol galiausiai susidaro išbaigta R-kilpos konfigūracija. Dėl PAM proksimalinės-distalinės poravimosi krypties PAM proksimalinis derinimasis tarp crRNR sudėtyje esančio skirtuko ir DNR taikinio sekos yra neproporcingai reikšmingas Cas9 RNP komplekso jungimuisi. Šis svarbus PAM proksimalinis ruožas yra vadinamas sėklos regionu. Esant neatitikimams tarp sėklos sekos ir taikininės grandinės, R-kilpos susidarymas bei po to vykstantis DNR kirpimas dažniausiai yra sustabdomi. Tuo tarpu neatitikimai tarp PAM distalinės dalies ir DNR taikinio sekos yra toleruojami iki tam tikro lygmens. Efektyviam Cas9 komplekso ir DNR susirišimui yra reikalingi mažiausiai devyni nerpertraukiami atitikimai tarp crRNR skirtuko ir DNR taikinio sekos. Pakankamas bazių susiporavimas tarp crRNR sudėtyje esančios skirtuko sekos ir DNR taikininės grandinės stabilizuoja R-kilpą, kurią paskiau dar labiau stabilizuoja vykstančios sąveikos tarp išstumtos DNR grandinės ir teigiamai įkrautų Cas9 baltymo aminorūgščių liekanų. Jeigu R-kilpa prasitęsia iki didžiosios dalies PAM distalinių bazių, yra indukuojamas Cas9 nukleazės konformacinis pokytis, kuris paruošia NUC skiltyje esantį baltymo HNH domeną DNR kirpimui. Tuomet HNH domenas skelia taikininę DNR grandinę, ko pasekoje yra sudaromas trūkis tarp trečio ir ketvirto nukleotidų, išsidėsčiusių priešais PAM seką. HNH domeno konformacinis pasikeitimas taip pat yra reikalingas ir Cas9 baltymo RuvC domeno, kuris tarp trečios ir ketvirtos arba ketvirtos bei penktos bazių prieš PAM kerpa išstumtą netaikininę DNR grandinę, nukleaziniam aktyvumui. Po kirpimo Cas9 RNP kompleksas išlieka stabiliai prisijungęs prie abiejų perskelto proskirtuko galų. Taigi, galutinis Cas9 endonukleazės veikimo rezultatas – dvigrandinis taikinio DNR molekulės trūkis, turintis bukus galus arba trumpą iškyšą (Jiang ir Doudna, 2017; Swartjes et al., 2020).



1.7 pav. Cas9 endonukleazės vykdomų taikinio atpažinimo ir DNR kirpimo procesų molekuliniai mechanizmai. Cas9 prisijungus sgRNR, įvyksta didelis šio baltymo konformacinis persitvarkymas, ko pasekoje yra pasiekama taikinio atpažinimo būseną. Joje su PAM sąveikaujantis plyšys (pažymėtas punktyrinio apskritimu), kuris yra didžiaja dalimi netvarkingas apo-Cas9 būsenoje, tampa iš anksto paruoštas PAM tikrinimui. Be to, po to kai Cas9 nukleazė susiriša su sgRNR, šios RNR sudėtyje esanti sėklos seka yra iš anksto pertvarkoma į A formos spiralinę konformaciją, skirtą gretimos DNR tikrinimui siekiant aptikti sgRNR komplementarią seką. Baltos punktyrinės dėžutės žymi ne sėkloje esančius netvarkingus RNR nukleotidus. Tolimesniuose etapuose Cas9 baltymas yra aktyvuojamas per daugelį koordinuotų žingsnių pradedant PAM atpažinimu, po kurio seka lokalus DNR išlydimas, RNR grandinės invazija, palaiptinis R-kilpos susidarymas. Greta viso to, tam, jog būtų užtikrinamas darnus DNR kirpimas, šių etapų metu taip pat vyksta ir Cas9 endonukleazės RuvC domeno alosterinė reguliacija, kurią nulemia šio baltymo HNH domeno konformacinis pokytis. Parengta pagal (Jiang ir Doudna, 2017).

Ląstelėje atsiradę dvigrandininiai DNR trūkiai įprastai yra užtaisomi vienu iš šių dviejų kelių – nehomologinių galų sujungimu arba homologiniu nukreipiamuoju taisymu (angl. *homologous directed repair*), jeigu yra turimas homologinis taisymo šablonas. Abu šie endogeniniai DNR taisymo procesai gali būti išnaudoti ląstelės genomo modifikavimui. Pavyzdžiui, homologijos apspręstas taisymas geba rekombinuoti egzogeninę DNR, todėl jis gali būti panaudotas įvairių transgenų įvedimui į ląstelę ar itin tiksliai jos genomo redagavimui. Tuo tarpu nehomologinių galų sujungimas yra suklysti linkęs procesas, kuris geba ne tik greitai suliguoti pažeistus galus, bet kartu ir sugeneruoti nedideles insercijas bei delecijas taisomose vietose, kas dažniausiai nulemia taikinio genų funkcijos dalinį sutrikdymą ar visišką panaikinimą

(Hryhorowicz et al., 2017). Dvigrandininiai trūkiai į ląstelės genomine DNR gali būti įvesti pasitelkus tokias programuojamas nukleazes, kaip cinko pirštų nukleazės (angl. *zinc-finger nucleases, ZFNs*) ar į transkripcijos aktyvatorių panašaus efektoriaus nukleazės (angl. *transcription activator-like effector nucleases, TALENs*). Vis dėlto genomų inžinerijos srityje jau ilgą laiką dominuoja CRISPR-Cas9 sistema, kuri šiuo metu iš esmės yra nepakeičiamas įrankis atliekant įvairius biologinius tyrimus. Lyginant su prieš tai minėtomis nukleazėmis, CRISPR-Cas9 technologija pasižymi keliais esminiais pranašumais. Vienas iš jų yra toks, jog Cas9 yra RNR programuojama endonukleazė. Norint ZFNs arba TALENs nukreipti į naujas DNR taikinio sekas, šiuos fermentus reikia kas kartą atskirai konstruoti ir sintetinti iš naujo, kai tuo tarpu Cas9 baltymo atveju pakanka pakeisti tik gRNR sudėtyje esančio skirtuko seką. Be to, panaudojant trumpą sintetinį jungtuką, crRNR galima sulieti su tracrRNR, ko pasekoje yra gaunama ir gali būti atskirai ekspresuojama chimerinė molekulė – viena vedančioji RNR (angl. *single-guide RNA, sgRNA*), o tai dar labiau palengvina CRISPR-Cas9 sistemos pritaikymą realioje praktikoje (Jinek et al., 2012). Dėl šių priežasčių ZFNs ir TALENs paremti genomo inžinerijos įrankiai reikalauja daug daugiau darbo bei yra žymiai brangesni už CRISPR-Cas9 technologiją. Pastaroji taip pat gali būti pasitelkta ir kelių lokusų redagavimui tuo pačiu metu, kas CRISPR-Cas9 sistemą paverčia paprastesne ir efektyvesne, ją lyginant su kitais genomo modifikavimo įrankiais (Li et al., 2020). CRISPR-Cas9 technologija iki šiol buvo sėkmingai pritaikyta labai įvairiems medicininiams tikslams, kurie apima genų ir antivirusinę terapijas, vėžio, genetinių ir neurologinių sutrikimų, alergijos ir imunologinių ligų gydymą, vaistų kūrimą ir jų taikinių paiešką, bei taip pat pavykusiai panaudota žemdirbystės, pramonės, mokslo ir kitose srityse (Khan et al., 2018; Barman et al., 2020).

Vienas plačiausiai naudojamų ir geriausiai ištyrinėtų CRISPR-Cas sistemos fermentų yra *Streptococcus pyogenes* bakterijose aptinkama Cas9 endonukleazė (SpCas9), kuri atpažįsta 5'-NGG-3' PAM seką ir po to susiriša su 20 bp ilgio komplementaria proskirtuko seka (Jiang ir Doudna, 2017). Nors SpCas9 yra nuodugniai ištyrinėtas daugiausia taikant įvairius biocheminius, molekulinės biologijos ir struktūrinius metodus, tačiau pastaruoju metu pasirodo vis daugiau šio baltymo tyrimų vienos molekulės lygyje, kas leidžia dar geriau charakterizuoti šios nukleazės veikimo ypatybes. Pavyzdžiui, pasitelkus „DNR užuolaidų“ eksperimentinę platformą, PM lygmenyje buvo tiriamas SpCas9 endonukleazės naudojamas taikinio paieškos mechanizmas. Šios studijos metu parodyta, jog Cas9 RNP kompleksui savitų taikinių paieška prasideda nuo komplekso atsitiktinių susidūrimų su DNR molekule. Tačiau vietoje to, jog Cas9 efektorinis

kompleksas vienodai tikrintų visą DNR molekulę, jis savo vykdomą paiešką paspartina greitai disocijuodamas nuo ne PAM sekų, kas jam leidžia praleisti mažiau laiko netaikininėse vietose (angl. *off-targets*). Tiktai prisijungęs prie savo PAM sekos, Cas9 RNP kompleksas tikrina flankuojančios DNR sekos komplementarumą gRNR sudėtyje esančiam skirtukui. Kitaip tariant, SpCas9 savo taikinio paieškai iš esmės nenaudoja 1D difuzijos, pavyzdžiui, slydimo ar šokinėjimo, išilgai DNR molekulės. Vietoje to, ši nukleazė atsitiktinai tikrina DNR sekas tam pasitelkdama tik 3D difuzijos mechanizmą (Sternberg et al., 2014; Cuculis ir Schroeder, 2017). Naudojant fluorescenciškai žymėtą sgRNR ir DNR šablonus, pavieniai SpCas9 prisijungimo prie DNR įvykiai taip pat buvo nagrinėjami ir smFRET metodu (Singh et al., 2016). Pasitelkus MP, realiu laiku ant individualių DNR šablonų buvo stebimas Cas9 nukleazės tarpininkaujamas R-kilpos susidarymas (Szczelkun et al., 2014). Galiausiai, individualių *S. pyogenes* dCas9 (angl. *dead Cas9*) baltymo, kurio endonukleazinis aktyvumas yra visiškai išveiklintas, molekulių dinamika buvo stebima ir *in vivo* taikant pavienių dalelių sekimo fotoaktyvuotos lokalizacijos mikroskopiją (angl. *single-particle tracking Photo-Activated Localisation Microscopy, sptPALM*) (Martens et al., 2019).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Cheminiai reagentai

2.1 lentelė. Darbe naudoti cheminiai reagentai.

Elme Messer Lit	N ₂ dujos
Sigma-Aldrich	Tris, CH ₃ OH, CH ₃ COOH, 2-propanolis, KH ₂ PO ₄ , jaučio serumo albuminas (angl. <i>bovine serum albumin</i> , BSA)
Roth	NaCl, KOAc, NaHCO ₃ , HCl, KCl, etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA), karbenicilinas, ampicilinas, imidazolas
Thermo Fisher Scientific	dNTP, ATP, SYTOX Green, metil-PEG ₄ -NHS, ditionitroitolis (DTT)
Dow Silicones	Silikono elastomeras Sylgard 184
Lyasan Bio	Metoksi-PEG-SVA, biotin-PEG-SVA
BioTecha	(3-Aminopropil)trietoksisilanas
ATTO-TEC	ATTO647N-NHS esteris
AppliChem	Na ₂ HPO ₄
Jena Bioscience	Biotin-PEG ₄ -NHS esteris
Difco	Mielių ekstraktas, triptonas, agar-agaras

2.1.2. Fermentai, buferiai ir rinkiniai

2.2 lentelė. Darbe naudoti (pagal gamintojo nurodymus ir rekomendacijas) fermentai, buferiai ir rinkiniai.

New England Biolabs	Fermentai Nikuojuantis fermentas Nt.BstNBI
Thermo Fisher Scientific	T4 PNK, T4 DNR ligazė, Phusion DNR polimerazė
SERVA	Kiti baltymai Streptavidinas
Roche	Antikūnai prieš digoksigeniną
	Buferiai

New England Biolabs	10x nikazės buferis
Synthego	5x sulydymo buferis
Thermo Fisher Scientific	10x reakcijos buferis A (T4 PNK buferis), 10x T4 DNR ligazės buferis, 5x Phusion HF buferis
	Kita (rinkiniai, kolonėlės)
	GeneJET PGR gryninimo rinkinys, TranscriptAid T7 didelės išėigos transkripcijos rinkinys, GeneJET RNR gryninimo rinkinys
Clontech	CHROMA SPIN TE-1000 kolonėlė
GE Healthcare	MicroSpin™ G-25 kolonėlė, NAP-25 kolonėlė, HiTrap chelatinė kolonėlė, Illustra NAP-5 kolonėlė

Magistrinio darbo metu naudotą laukinio tipo *Streptococcus pyogenes* Cas9 endonukleazę suteikė darbo vadovas.

2.1.3. Kiti tirpalai

Traptavidino gamybos ir gryninimo metu naudoti buferiai:

- Lizės buferis: 300 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,8 mg/ml lizocimo, 1% Triton X-100, pH 7,8 (25 °C);
- Plovimo buferis: 100 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,5% Triton X-100, pH 7,8 (25 °C);
- Ekvilibravimo buferis: 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,8 (25 °C);
- Eliucijos buferis: 300 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,5 M imidazolo, pH 7,8 (25 °C).

Minkštųjų „DNR užuolaidų“ surinkimo metu naudoti buferiai:

- Buferis A: 33 mM Tris-OAc, 66 mM KOAc, pH 7,9 (25 °C);
- Buferis B: 40 mM Tris, pH 7,8 (25 °C).

Cas9 RNP komplekso surinkimui ir sąveikos su DNR vizualizacijai naudoti buferiai:

- Surinkimo buferis: 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mg/ml BSA, 1 mM DTT, pH 7,5 (37 °C);

- Vaizdinimo buferis: 33 mM Tris-OAc, 66 mM KOAc, 0,2% Tween-20, 1 mM DTT, pH 7,9 (25 °C).

2.1.4. Plazmidės ir kita DNR

2.3 lentelė. Darbe naudotos plazmidės ir kita DNR.

Thermo Fisher Scientific	Plazmidės
	ΦX174 RF1 DNR
	Kita DNR
	Bakteriofago λ DNR

TAv gamybai naudota pET21a tAv plazmidė buvo gauta iš užsienio mokslininkų grupės. 3' gale modifikuotos tracrRNR sintezei naudotą pUC18 plazmidę, turinčią RNR koduojančią seką, suteikė darbo vadovas.

2.1.5. DNR oligonukleotidai

2.4 lentelė. Darbe naudoti DNR oligonukleotidai.

Eilės numeris	Oligonukleotido seka 5'→3' kryptimi
Biotinu ir digoksinenu funkcionalizuotos λ DNR gamyba	
1	GGGCGGCGACCT-TEG-Biotinas
2	AGGTCGCCGCC-TEG-Digoksinenas
ATTO647N fluorescencinės žymės asimetrinis įvedimas į specifinę λ DNR poziciją	
3	pTTCAGAGTCTGACTTTT-ATTO647N
5' gale biotinilintos 5 kb ilgio DNR sintezė	
4	Biotinas -CGAAGTGGACTGCTGGCGG
5	CGTAAACAAGCAGTAGTAATTCCTGCTTTATCAAG
3' gale modifikuotos tracrRNR sintezė	
6	TAATACGACTCACTATAGGGCAAACAGCATAGCAAGTAAAATAAGG
7	GCGCACGAGCAAAAAGCACCGACTCGGTGCC
tracrRNR 3' galui komplementaraus oligonukleotido fluorescencinis žymėjimas	
8	TTGCGCACGAGCAAA

2.2. Metodai

2.2.1. Traptavidino gamyba ir gryninimas

Escherichia coli BL21 (DE3) kamieno ląstelės buvo transformuotos pET21a tAv plazmide, tuomet išsėtos ant Petri lėkštelių, užpildytų *Luria-Broth* (LB)-karbenicilino terpė su agaru, ir inkubuotos 37 °C temperatūroje per naktį. Inokuliuojant užaugusią transformantų koloniją į LB-ampicilino terpę ir purtant (220 r.p.m.) inokuliatą 37 °C temperatūroje per naktį, buvo gauta naktinė kultūra, kuri po to 100-ą kartų buvo praskiesta į LB-ampicilino terpę, auginta 37 °C temperatūroje iki OD₆₀₀ 0,9, tuomet indukuota naudojant 0,5 mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranozido ir toliau purtyta 4 valandas 37 °C. Nucentrifugavus bakterijas 5000g 10 minučių, ląstelių masė buvo suspenduota lizės buferyje (žr. 2.1.3. skyrelį) ir tuomet palikta purtytis (80 r.p.m.) 20 minučių 25 °C temperatūroje. Sekančiame žingsnyje ši ląstelių masė buvo ardyta ultragarsu, 10 minučių atliekant pulsacinį sonikavimą lede ir naudojant 30% amplitudę. Po centrifugavimo (27000g, 4 °C, 15 min) gauti įterptiniai kūneliai buvo tris kartus pakartotinai suspenduoti plovimo buferyje (žr. 2.1.3. skyrelį). Išskirti įterptiniai kūneliai tuomet buvo ištirpinti 6M guanidino hidroklorido tirpale (pH 1,5 (25 °C)) ir po to nucentrifuguoti (17700g, 4 °C, 20 min). Gauti tAv monomerai, ištirpinti GuHCl, buvo pakartotinai sulankstyti (angl. *refolded*) į tetramerus, greitai praskiedžiant tAv monomerus į PBS buferį 4 °C temperatūroje ir po to toje pačioje temperatūroje maišant šį praskiestą baltymo tirpalą per naktį. Siekiant išsodinti tAv, buvo atliktas šio baltymo nusodinimas kietu amonio sulfatu. Tuomet išsodintas tAv buvo pakartotinai suspenduotas minimaliame PBS buferio tūryje kambario temperatūroje ir nucentrifuguotas (14000g, 4 °C, 5 min). Amonio sulfato perteklius buvo pašalintas praleidus supernatantą per NAP-25 kolonėlę. TAv gryninimas buvo atliktas naudojant Ni²⁺ jonais įkrautą ir ekvilibravimo buferiu (žr. 2.1.3. skyrelį) ekvilibruotą HiTrap chelatinę kolonėlę. Baltymo eliacija gryninimo metu buvo atlikta naudojant eliacijos buferį (žr. 2.1.3. skyrelį). Sujungus gryninimo metu surinktas tAv turinčias frakcijas, gautas baltymo tirpalas buvo dializuotas PBS buferyje 4 °C temperatūroje per naktį. Išgrynintas ir dializuotas baltymas tuomet buvo sukonzentruotas naudojant 9 kDa MWCO centrifuginį koncentratorių ir atliekant centrifugavimą 20-30 minučių 4800g 4 °C temperatūroje. Gauta galutinė tAv išeiga buvo 3 mg baltymo vienam litrui pradinės bakterijų ląstelių kultūros.

2.2.2. DNR gamyba

Biotinu ir dig funkcionalizuotos bakteriofago λ DNR gamybai naudoti 3' gale per trietilenglikolio (TEG) jungtuką prijungtą biotiną arba dig turintys oligonukleotidai (žr. 2.1.5. skyrelio 1-ą ir 2-ą oligonukleotidus), kurie buvo hibridizuoti su atitinkamai kairiajame arba dešiniajame λ DNR molekulės galuose esančiomis iškyšomis, sudarytomis iš šiems oligonukleotidams komplementarių *cos* sekų. Pirmiausia, naudojant T4 PNK, atliktas minėtų oligonukleotidų 5' galų fosforilimas. Ši reakcija vykdyta 30 minučių 37 °C temperatūroje reakcijos mišinyje esant 1 μ M atitinkamo oligonukleotido. Kinazė inaktyvuota reakcijos mišinį 5 minutes palaikius 95 °C temperatūroje. Tuomet λ DNR moliniu santykiu 1:10 buvo sumaišyta su fosforilintais oligonukleotidais, mišinys pakaitintas iki 80 °C ir iš lėto atvėsintas iki kambario temperatūros. Ligavimo reakcija buvo vykdoma 2 valandas kambario temperatūroje prieš tai į minėtą mišinį pridėjus T4 DNR ligazės. Šis fermentas inaktyvuotas reakcijos mišinį 10 minučių palaikius 70 °C temperatūroje. Galiausiai, biotinu ir dig pažymėta fago λ DNR buvo išgryninta naudojant CHROMA SPIN TE-1000 kolonėlę.

Siekiant asimetriškai į specifinę bakteriofago λ DNR molekulės poziciją įvesti fluorescencinę žymę, į λ DNR buvo įterptas prijungtą ATTO647N fluoroforą turintis oligonukleotidas (žr. 2.1.5. skyrelio 3-ią oligonukleotidą), komplementarus fago λ DNR molekulės vietai, kuri yra nutolusi 14711 bp atstumu nuo kairiojo biotininio λ DNR galo. Tai buvo įgyvendinta iš pradžių 2 μ g fago λ DNR paveikus nikuojančiu fermentu Nt.BstNBI. Ši reakcija, naudojant kinazės buferį, buvo vykdoma 2 valandas 50 °C temperatūroje. Tuomet nikuota λ DNR moliniu santykiu 1:100 buvo sumaišyta su trimis skirtingais oligonukleotidais (žr. 2.1.5. skyrelio 1-ą, 2-ą ir 3-ią oligonukleotidus). Gautas mišinys buvo pakaitintas iki 55 °C temperatūros ir po 20-ies minučių 0,5 °C/min greičiu atvėsintas iki 16 °C. Sekančiame žingsnyje į šį mišinį buvo įdėta ATP (galutinė jos koncentracija turimame mišinyje buvo 1 mM) ir 50 fermentinio aktyvumo vienetų T4 DNR ligazės. Ligavimo reakcija buvo vykdyta kambario temperatūroje per naktį. Siekiant nuslopinti nikuojančio fermento Nt.BstNBI ir T4 DNR ligazės aktyvumus, į reakcijos mišinį buvo pridėta 20 mM EDTA. Galiausiai, biotinu ir dig modifikuota bei specifinėje vietoje ATTO647N fluoroforu asimetriškai pažymėta bakteriofago λ DNR buvo išgryninta naudojant CHROMA SPIN TE-1000 kolonėlę.

5' gale biotininios 5 kb ilgio DNR sintezė buvo atlikta polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu naudojant Phusion DNR polimerazę, Φ X174 RF1 DNR kaip matricą ir

atitinkamus pradmenis (žr. 2.1.5. skyrelio 4-ą ir 5-ą oligonukleotidus). PGR metu susidaręs biotinilintas DNR produktas buvo išgrynintas pasitelkus GeneJET PGR gryninimo rinkinį.

2.2.3. Antikūnų prieš digoksinę biotinilimas

Siekiant antikūnus prieš dig modifikuoti biotinu, šie antikūnai moliniu santykiu 1:100 buvo sumaišyti su biotin-PEG₄-NHS esteriu PBS buferyje. Gautas mišinys buvo inkubuojamas 2 valandas kambario temperatūroje. Po to į šį reakcijos mišinį buvo įdėta glicino (galutinė jo koncentracija mišinyje buvo 3,2 mM) ir tada buvo atlikta 15-ka minučių trunkanti gauto mišinio inkubacija kambario temperatūroje. Biotinilinti antikūnai prieš digoksinę (bt-anti-dig) buvo išgryninti per NAP-5 gelfiltracinę kolonėlę eliacijai naudojant PBS buferį.

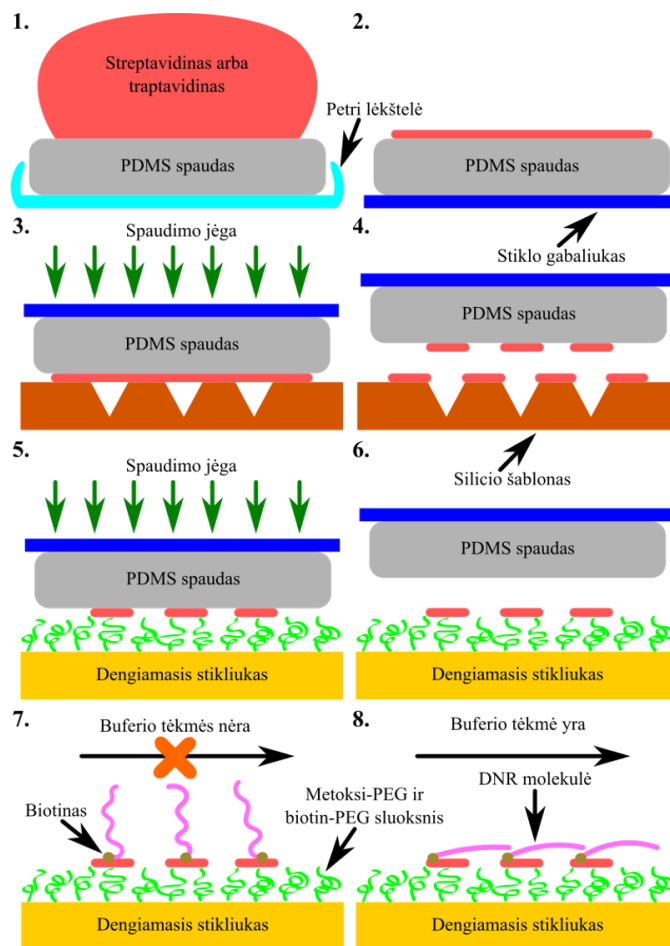
2.2.4. Minkštųjų „DNR užuolaidų“ surinkimas

Plokščias elastomerinis PDMS spaudas ($5 \times 5 \text{ mm}^2$ matmenų) iš pradžių mirkomas 2-propanolyje. Praėjus 10 minučių, šis PDMS gabaliukas, laikant pincetu, nusausinamas ~15 sekundžių į jį pučiant silpna N₂ dujų srove. Tuomet PDMS spaudas savo lygiaja puse į viršų padedamas į plastikinę Petri lėkštelę ir paliekamas džiuoti ore. Po 10-ies minučių ant šio elastomerinio spaudos plokščiojo paviršiaus uždedamas 60-ies μl baltyminio rašalo (sAv arba tAv tirpalo, esančio buferyje A (žr. 2.1.3. skyrelį)) lašas, kuris lengvai papipetuojamas ir tuomet paliekamas inkubotis 10-čiai minučių (2.1 pav.). Po to baltyminio rašalo lašas nusiurbiamas su pipete, o elastomerinis spaudas, jį laikant pincetu, pirmiausia nuplaunamas 5 ml buferio A, o tada ~50 ml dejonizuoto vandens. PDMS gabaliukas nudžiovinamas apie minutę į jį pučiant N₂ dujų srove ir tuomet savo rašaluotąja puse į viršų užklijuojamas ant nedidelio stiklo gabaliuko ($10 \times 10 \text{ mm}^2$ matmenų). Lygiagrečiai su elastomerinio spaudos paruošimo ir rašalavimo etapais kartu atliekamas ir Si šablono paruošimas: Si šablonas 20-imt minučių mirkomas 2-propanolyje, po to, šablono laikant pincetu, išdžiovinamas N₂ dujų srove ir 5-ias minutes valomas oro plazma (~500 mTorr, aukštos galios režimas, PDC-002, Harrick).

Pasiruošus visus reikiamus komponentus, atliekamas baltymų atkeliamasis minkrokontaktinis antspaudavimas. Šios procedūros metu prie stiklo gabaliuko priklijuotas PDMS spaudas savo rašaluotąja puse pinceto pagalba pirmiausia uždedamas ant paruošto Si šablono, kuris savo paviršiuje turi nanometrinių matmenų linijinius griovelius. Naudojant savadarbį nešiojamąjį antspaudavimo prietaisą (angl. *portable printing device*), šioje antspaudavimo procedūros stadijoje gali būti reguliuojama spaudimo jėga, kuomet švirkšto

stūmokliu prispaudžiamas minėtas suformuotas „sumuštinis“, susidedantis iš Si šablono ir ant jo uždėto rašaluoto elastomerinio spaudo. Praėjus maždaug 15-kai sekundžių po šio „sumuštinio“ sudarymo ir prispaudimo švirkšto stūmokliu, PDMS gabaliukas nuo Si šablono pincetu perkeliamas ant silanizuoto ir PEGilizuoto dengiamojo stikliuko ($25 \times 25 \text{ mm}^2$ matmenų, #1.5, Menzel Glaser). Toks suformuotas „sumuštinis“, susidedantis iš elastomerinio spaudo, uždėto ant minėto stiklo paviršiaus, tuomet vėl prispaudžiamas švirkšto stūmokliu, kurio dėka šioje stadijoje taip pat galima kontroliuoti spaudimo jėgą. Po minutės PDMS spaudas pincetu nukeliamas nuo dengiamojo stikliuko ir išmetamas, o prie tokio atitinkamu baltymu (sAv arba tAv) nanostruktūrizuoto stiklo paviršiaus, naudojant dvigubą lipnią juostą su išpjautu kanalu, prikljuojamas PMMA substrato ruošinys. Tokiu būdu sukonstruojama tėkmės celė, į kurią po to įstatomos guminės buferio įtekėjimo ir ištekėjimo žarnelės. Galiausiai, ši tėkmės celė prijungiama prie persitaltinės pompos ir sumontuojama ant fluorescencinio mikroskopo staliuko. Detali tėkmės celių gamybos ir surinkimo procedūra yra aprašyta ankstesnėje mūsų publikacijoje (Tutkus et al., 2019).

Dengiamųjų stikliukų paviršiaus cheminis modifikavimas – aminosilanizavimas ir PEGilizavimas – bei papildoma paviršiaus pasyvacija trumpomis metil-PEG₄-NHS esterio molekulėmis buvo atlikti remiantis anksčiau paskelbta procedūra (Chandradoss et al., 2014). Pirmojo PEGilizacijos etapo metu buvo naudotas 1:10 (w/w) biotin-PEG/metoksi-PEG santykis.



2.1 pav. Schematiškai pavaizduoti pagrindiniai minkštųjų „DNR užolaidų“ surinkimo etapai – elastomerinio spaudo rašalavimas, baltymų atkeliamasis mikrokontaktinis antspaudavimas ir DNR molekulių imobilizacija ant paviršiaus. (1) Plokščio PDMS spaudo rašalavimas streptavidinu arba traptavidinu. (2) Baltyminio rašalo lašo nusiurbimas pipete ir elastomerinio spaudo plovimas (buferiu ir dejonizuotu vandeniu) bei nudžiovinimas N₂ dujomis. (3) Rašaluoto PDMS spaudo uždėjimas ant silicio šablono, kurio paviršiuje yra išraižyti nanometrinių matmenų linijiniai grioveliai. Šioje baltymų atkeliamąjo mikrokontaktinio antspaudavimo stadijoje pastarąjį „sumuštinį“ veikia spaudimo jėga, kuri generuojama naudojant nešiojamąjį antspaudavimo prietaisą. (4) Elastomerinio spaudo atkėlimas nuo silicio šablono, ko pasekoje yra selektyviai atimami tam tikri spaudo paviršių dengiančių baltymų regionai. (5) Praėjusio etapo metu „apdoroto“ PDMS spaudo uždėjimas ant dengiamojo stikliuko, kurio paviršius yra padengtas metoksi-PEG ir biotin-PEG molekulių mišinio sluoksniu. Šioje baltymų atkeliamąjo mikrokontaktinio antspaudavimo stadijoje pastarąjį „sumuštinį“ taip pat veikia spaudimo jėga, kuri sukeliama naudojant nešiojamąjį antspaudavimo prietaisą. (6) Elastomerinio spaudo atkėlimas nuo chemiškai modifikuoto dengiamojo stikliuko, ko pasekoje stiklo paviršiuje yra suformuojamos baltyminės nanostruktūros. (7) Viename gale biotinizintų DNR molekulių imobilizacija ant stiklo paviršiuje praėjusių etapų metu suformuotų nanometrinių matmenų streptavidino arba traptavidino linijų. Kuomet buferio tėkmės nėra, imobilizuotų DNR molekulių antrasis galas yra difundavęs toliau nuo paviršiaus. (8) Buferio tėkmės atsiradimo nulemtas ant paviršiaus vienu galu fiksuotų individualių DNR molekulių lygiagretus išsilygiavimas ir išsitiesimas palei stiklo paviršių.

2.2.5. DNR molekulių imobilizacija

Surinktos tĕkmĕs celĕs kanalas iġ pradŹių uŹpildomas buferiu B (Źr. 2.1.3. skyrelį). Tuomet, siekiant efektyviau pasyvuoti tĕkmĕs celĕs stiklo pavirġių ir tokiu būdu dar labiau sumaŹinti nespecifinę tiriamųjų baltymų adsorbciją ant pavirġiaus, į tĕkmĕs celę įleidŹiama 100 μ l 5% Tween-20 tirpalo buferyje B. Praėjus 10-čiai minučių, tĕkmĕs celĕs kanalas gausiai praplaunamas buferiu A (Źr. 2.1.3. skyrelį). Po to į tĕkmĕs celę suleidŹiama 120 μ l \sim 30 pM biotinu ir dig funkcionalizuotos bakteriofago λ DNR (arba 5' gale biotinilintos 5 kb ilgio DNR) tirpalo buferyje B, ir maŹiausiai 15-a minučių atliekama įleistos DNR inkubacija. Tuomet tĕkmĕs celĕs kanalas gausiai praplaunamas buferiu A ir į tĕkmĕs celę įleidŹiama \sim 0,4 nM SYTOX Green (SG) tirpalo buferyje A. Ŗis į dgDNR interkalijuojantis daŹiklis, Źadinamas 488 nm bangos ilgio lazerio spinduliuote, stipriai fluorescuoja, todĕl individualios DNR molekulĕs gali bŹti vizualizuotos fluorescencinės mikroskopijos pagalba. Siekiant ant gretimų baltyminių linijų fiksuoti dig paŹymĕtą λ DNR molekulĕs galą, pirmiausia suformuojama uŹdaros kilpos cirkuliacija ir į tĕkmĕs celę įleidŹiama 5 μ l biotinilinto antikŹno prieš dig, ko pasekoje gaunama \sim 0,05 mg/ml galutinĕ šio baltymo koncentracija tĕkmĕs celĕs kanale. Sekančiame Źingsnyje atliekama maŹiausiai 10-ies minučių minĕto antikŹno inkubacija esant nuolatinei lĕtai buferio tĕkmei (\sim 0,1 ml/min). Praėjus atitinkamam laiko tarpui, buferio tĕkmĕs greitis padidinamas iki \sim 1 ml/min ir išlaikomas pastovus 20-imt minučių. Galiausiai, grįŹtama prie atviros kilpos cirkuliacijos ir tĕkmĕs celĕs kanalas gausiai praplaunamas buferiu A. Dviem galais ant baltyminių nanostruktŹrų imobilizuotų individualių bakteriofago λ DNR molekulių vizualizacija atliekama į tĕkmĕs celę vĕl suleidŹiant \sim 0,4 nM SG tirpalo buferyje A ir po to Źadinant bandinį 488 nm bangos ilgio lazeriu.

2.2.6. SpCas9 fluorescencinis Źymĕjimas, komplekso surinkimas ir sųveikos su DNR tyrimas vienos molekulĕs lygyje

Laukinio tipo SpCas9 endonukleazĕs fluorescencinis Źymĕjimas buvo atliktas naudojant kovalentiġkai prijungtą ATTO647N fluoroforą turintį oligonukleotidą (Źr. 2.1.5. skyrelio 8-ą oligonukleotidą), kuris buvo hibridizuotas su gRNR sudĕtyje esančios tracrRNR 3' galu. Iš pradŹių šis oligonukleotidas buvo paŹymĕtas ATTO647N-NHS daŹikliu, esant 1:60 moliniam DNR/daŹo santykiui, ir išgrynintas per G-25 mikrocentrifuginę kolonĕlę. Tuomet, naudojant RNR koduojančią seką turinčią pUC18 plazmidę kaip matricą ir atitinkamus pradmenis (Źr. 2.1.5.

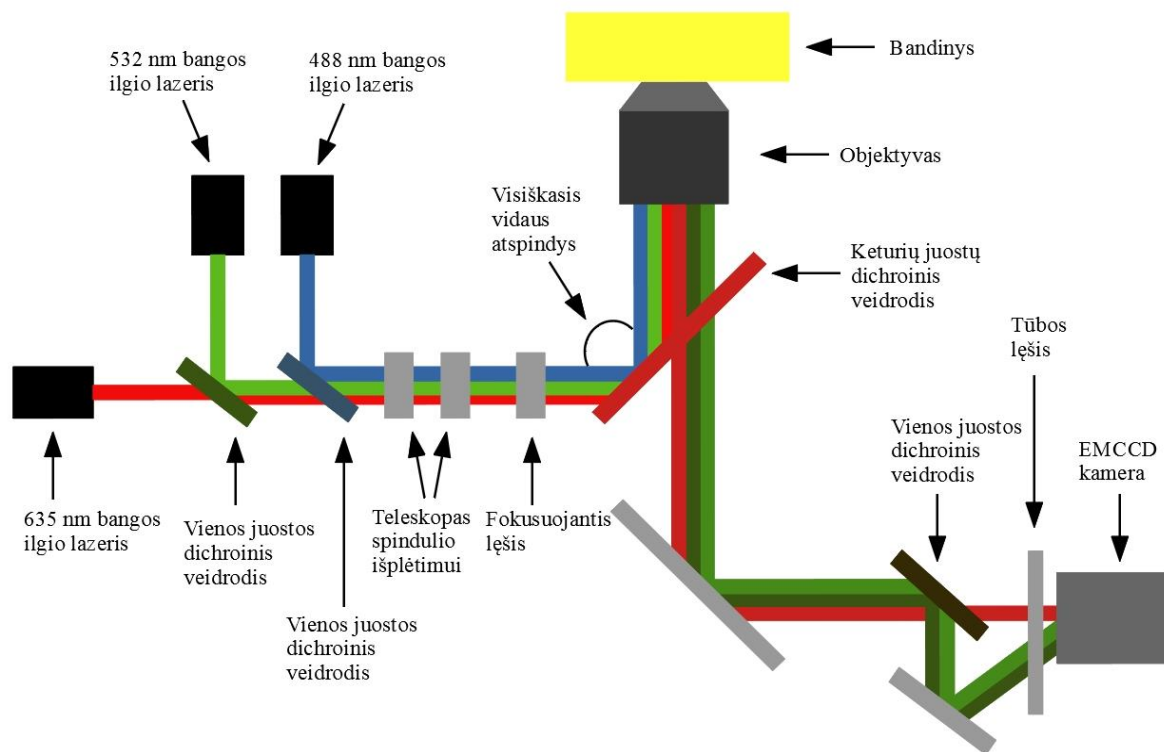
skyrelio 6-ą ir 7-ą oligonukleotidus), buvo atlikta PGR. Po šios reakcijos sekė *in vitro* transkripcija naudojant TranscriptAid T7 didelės išėigos transkripcijos rinkinį. Tokiu būdu buvo pasigaminta 3' gale modifikuota tracrRNR, skirta hibridizacijai su komplementariu, ATTO647N fluoroforu pažymėtu oligonukleotidu. Ši modifikuota tracrRNR buvo išgryninta pasitelkus GeneJET RNR gryninimo rinkinį. Galiausiai, sintetinė crRNR (pirkta iš Synthego), turinti bakteriofago λ DNR unikaliai taikinio vietai (5'-GAAATCCACTGAAAGCACAG-3') komplementarią skirtuko seką, 3' gale modifikuota tracrRNR ir ATTO647N dažikliu pažymėtas oligonukleotidas buvo sumaišyti ekvimoliniais kiekiais. Šis mišinys buvo pakaitintas iki 80 °C ir po to lėtai atvėsintas iki kambario temperatūros.

SpCas9 RNP komplekso surinkimas buvo atliktas surinkimo buferyje (žr. 2.1.3. skyrelį) laukinio tipo SpCas9 endonukleazę sumaišius su ATTO647N fluoroforu pažymėta gRNR (1:2 baltymo/RNR moliniu santykiu) ir gautą mišinį 30 minučių painkubavus 37 °C temperatūroje. SpCas9 sąveikos su DNR tyrimas vienos molekulės lygyje buvo atliktas naudojantis mūsų sukurta orientuotų minkštųjų „DNR užuolaidų“ eksperimentine platforma. Fluorescenciškai žymėtas SpCas9 RNP kompleksas vaizdinimo buferyje (žr. 2.1.3. skyrelį) buvo praskiestas iki 0,2 nM ir tuomet suleistas į surinktas dvigubas „DNR užuolaidas“ turinčią tėkmės celę. Šio komplekso sąveika su ant paviršiaus dviem galais imobilizuotomis individualiomis fago λ DNR molekulėmis buvo vizualizuota bandinį žadinant 488 nm ir 635 nm bangos ilgių lazeriais.

2.2.7. Objektyvu paremta visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinė mikroskopija

Magistrinio darbo metu buvo naudojama savadarbė objektyvo tipo VVAF mikroskopijos konfigūracija (2.2 pav.), kuri išsamiai aprašyta ankstesnėje mūsų publikacijoje (Tutkus et al., 2019). Bandinių žadinimas buvo atliekamas pasitelkus tris skirtingo bangos ilgio – 488, 532 ir 635 nm – lazerius (Crystalaser), kurių visų nominali galia yra 20 mW. Šių lazerių spinduliai atitinkamų dichroinių veidrodžių pagalba buvo suvedami į bendrą optinį kelią ir tuomet, naudojant keturių juostų dichroinį veidrodį (zt405/488/532/640 rpc, Chroma Technology Corp), nukreipiami į aliejaus imersinį objektyvą (100 \times , 1.4NA, Nikon). Šis keturių juostų dichroinis veidrodis prieš tai buvo įstatytas į viršutinį filtrų kubo laikiklį, įmontuotą mikroskopo kūne (Nikon Eclipse Ti-U). 532 ir 635 nm lazerių galia prieš objektyvą buvo nustatyta į 2,5 mW, o 488 nm lazerio – į 0,1 mW. Evanescentinio lauko prasiskverbimo gylis buvo nustatytas į maždaug 300 nm visiems naudotiems žadinimo bangos ilgiams. EMCCD kameros (Ixon3, Andor)

ekspozicijos trukmė buvo nustatyta į 100 ms. Naudojant šią kamerą, buvo registruojami SG ir ATTO647N fluoroforų, kurių emisijos maksimumai atitinkamai yra 532 nm bei 661 nm, fluorescencijos signalai. Bandinio stabiliam palaikymui fokuse buvo naudojama savadarbė grįžtamojo ryšio kontrolinė sistema, kompensuojanti ant mikroskopo staliuko uždėto bandinio dreifą Z ašies kryptimi. Gautų VVAF mikroskopijos vaizdų apdorojimui ir analizei atitinkamai buvo naudojamos *Fiji* bei *Igor Pro 8* kompiuterinės programos.

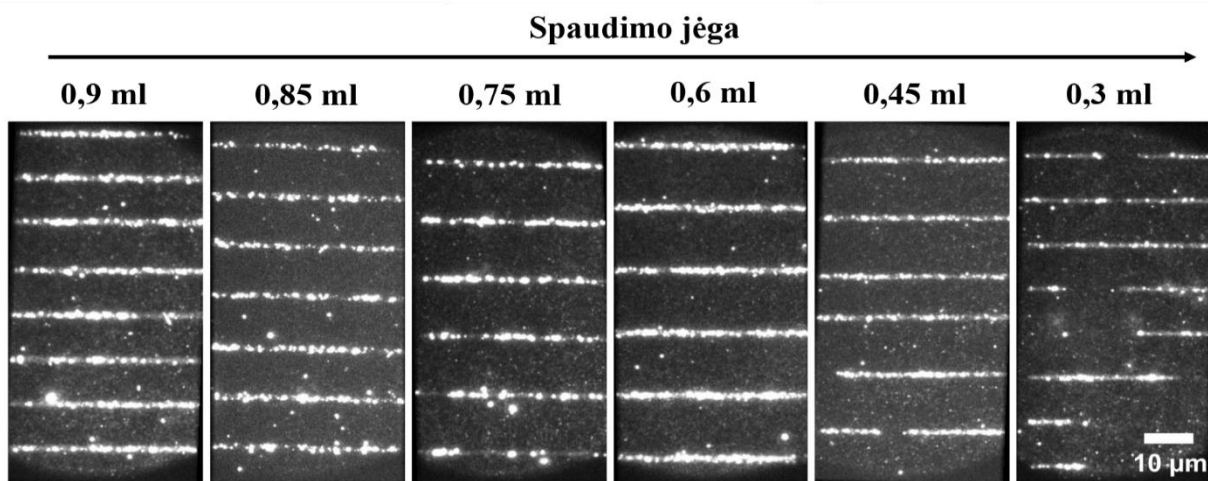


2.2 pav. Supaprastinta bandinio žadinimo ir fluoroforų emituojamų fotonų surinkimo optinė schema. Mėlyna spalva žymi 488 nm, žalia spalva – 532 nm, o raudona spalva – 635 nm bangos ilgio lazerių spindulių atitinkamus optinius kelius.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Spaudimo jėgos optimizavimas

Vienas iš pagrindinių veiksnių, lemiančių ant chemiškai modifikuoto stiklo paviršiaus suformuojamų baltyminių nanostruktūrų kokybę, yra spaudimo jėga, veikianti rašaluoto PDMS spaudo sąlyčio su Si šablonu arba su dengiamuoju stikliuku metu. Siekdami optimizuoti spaudimo jėgą, kas iš esmės leistų kiekvieno naujo atliekamo eksperimento metu ant paviršiaus nuolatos suformuoti geriausios kokybės baltymines linijas, mes nustatėme sAv nanostruktūrų kokybės priklausomybę nuo spaudimo jėgos didumo visais atvejais esant vienodai, optimaliai sAv koncentracijai (0,02 mg/ml) elastomerinio spaudo rašalavimo tirpale. Skirtingos spaudimo jėgos vertės (maždaug nuo 12 iki 26 N/cm²) buvo išgaunamos naudojant mūsų pačių susikonstruotą nešiojamąjį antspaudavimo prietaisą (žr. 2.2.4. skyrelį). Jo pagalba kiekvieno atlikto skirtingo eksperimento metu ant Si šablono arba pasyvuoto stiklo paviršiaus uždėtas PDMS spaudas buvo prispaudžiamas iki tam tikro lygmens, kuris suspaudimo momentu buvo vertinamas pagal tai, kokią švirkšto gradavimo skalės padalą (intervale nuo 0 iki 1 ml) tuo metu buvo pasiekęs švirkšto stūmoklis. Gauti tokių eksperimentų rezultatai (3.1 pav.) parodė, jog baltymų atkeliamojo mikrokontaktinio antspaudavimo etapo metu veikiant santykinai mažoms (0,9 ir 0,85 ml) bei santykinai didelėms (0,45 ir 0,3 ml) spaudimo jėgoms, ant chemiškai modifikuoto stiklo paviršiaus yra suformuojamos pakankamai prastos kokybės sAv linijos. Pažymėtina, kad didelės spaudimo jėgos atveju yra išgaunamos sutrūkinėjusios sAv nanostruktūros su mažu ant jų prisijungusių individualių DNR molekulių tankiu, kas indikuoja apie tai, jog antspaudavimo etapo metu veikianti santykinai didelė spaudimo jėga galimai inaktyvuoja tam tikrą sAv molekulių dalį, ko pasekoje šiek tiek nukenčia šio baltymo gebėjimas surišti biotiną. Geriausią sAv linijų kokybę pavyko išgauti naudojant santykinai vidutines (0,75 ir 0,6 ml) spaudimo jėgas, iš kurių pastaroji davė kiekybiškai geriausius rezultatus. Todėl 0,6 ml vertę pasirinkome kaip optimalią spaudimo jėgą, kurią nusprendėme naudoti ir tolimesniuose savo eksperimentuose, siekdami stiklo paviršių nuolatos nanostruktūrizuoti geriausios kokybės baltyminėmis linijomis.



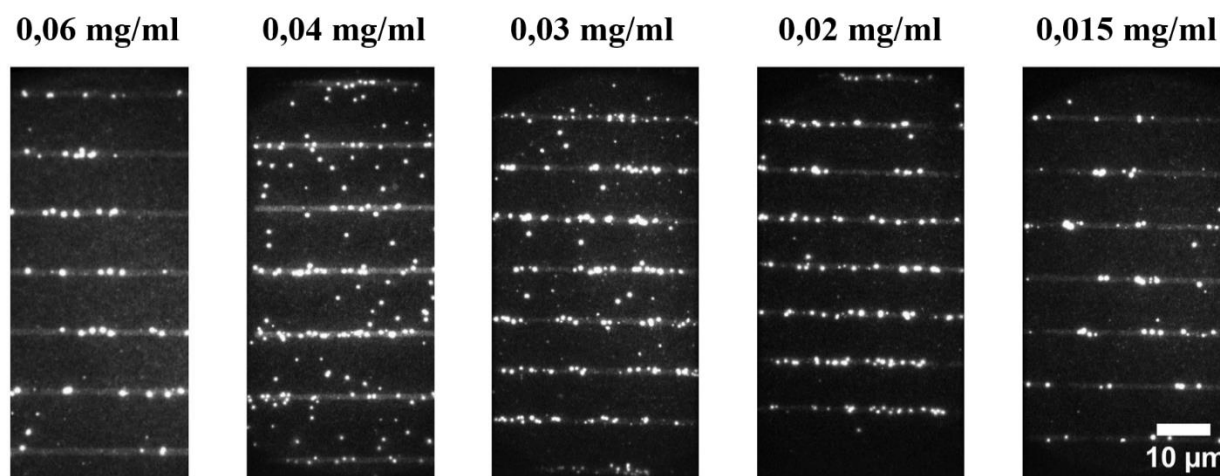
3.1 pav. Visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinės (VAVF) mikroskopijos vaizdai, rodantys baltyminių linijų kokybės priklausomybę nuo baltymų atkeliamojo mikrokontaktinio antspaudavimo metu veikiančios spaudimo jėgos. Eksperimentų metu naudotos skirtingos spaudimo jėgos (intervale nuo 0,3 iki 0,9 ml) yra pateiktos virš kiekvieno VAVF mikroskopijos vaizdo. Streptavidino koncentracija PDMS spaudo rašalavimo tirpale visais atvejais buvo 0,02 mg/ml. Ant suformuotų streptavidino nanostruktūrų buvo imobilizuotos 5' gale biotinilintos 5 kb ilgio DNR molekulės. Jų vizualizavimui buvo panaudotas interkalijuojantis fluorescencinis SYTOX Green dažas, kurio sužadinimas atliktas bandinį apšviečiant 488 nm bangos ilgio lazeriu. Kiekvienas iš šių atvaizdų yra 10-ies iš eilės užregistruotų kadrų vidurkis.

3.2. Fiksuotų DNR molekulių paviršinės imobilizacijos trukmės didinimas

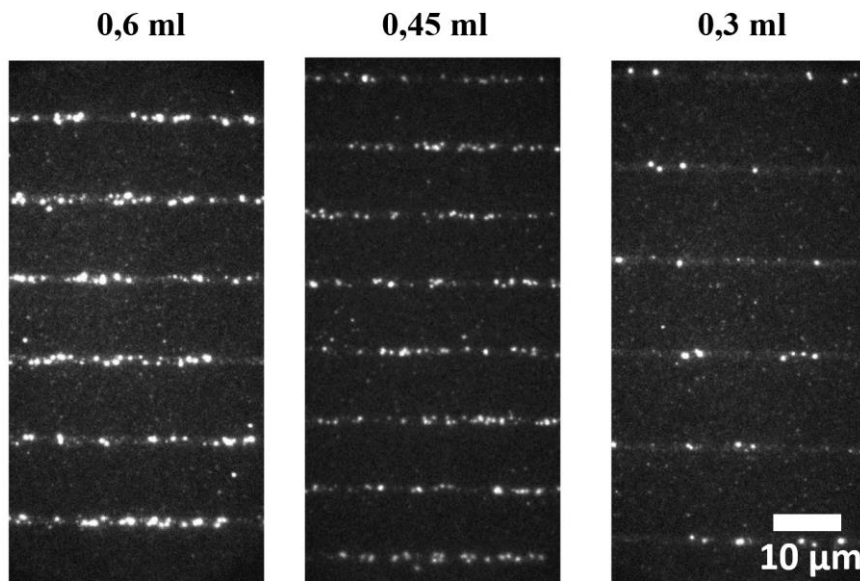
Norint mūsų sukurtą minkštųjų „DNR užuolaidų“ eksperimentinę platformą efektyviai panaudoti įvairiuose pavienių baltymų ir DNR sąveikų tyrimuose, yra būtina užtikrinti, jog šis įrankis, išlaikant jam būdingą didelį našumą, yra tinkamas atlikti ilgos trukmės eksperimentams. Tai reiškia, jog net ir praėjus ilgam, pavyzdžiui, keleto valandų, laikotarpiui didžioji dalis eksperimento pradžioje ant paviršiaus imobilizuotų individualių DNR molekulių turėtų išlikti prisijungusi prie baltyminių nanostruktūrų. Šiam uždaviniui įgyvendinti mes pasitelkėme dvigubą (S52G, R53D) sAv mutantą – tAv, kuris pasižymi didesniu terminiu ir mechaniniu stabilumu (Chivers et al., 2010). Lyginant su sAv, didžiausias tAv privalumas yra toks, jog šis mutantinis baltymas geba 10 kartų stipriau sąveikauti su biotinu: tAv-biotino komplekso disociacijos konstanta yra lygi 10^{-16} M, kai tuo tarpu sAv-biotino konjugato $K_D = 10^{-15}$ M (Chivers et al., 2011).

Pasigaminę ir išgryninę tAv (žr. 2.2.1. skyrelį), pirmiausia mes nusprendėme įsitikinti, jog šis biotiną surišantis baltymas, taip pat kaip ir sAv, gali būti sėkmingai panaudotas geros kokybės

baltyminių linijų suformavimui ant chemiškai modifikuoto stiklo paviršiaus. Tam mes atlikome eksperimentus, kurių metu minkštųjų „DNR užolaidų“ surinkimui (žr. 2.2.4. skyrelį) kas kartą buvo naudojama skirtinga tAv koncentracija (intervale nuo 0,015 iki 0,06 mg/ml) PDMS spaudo rašalavimo tirpale, visais atvejais išlaikant vienodą (0,6 ml) spaudimo jėgą. Po tėkmės celės surinkimo ant paviršiaus buvo imobilizuojamos 5' gale biotilintas 5 kb ilgio DNR molekulės (žr. 2.2.5. skyrelį). Šių atliktų eksperimentų rezultatai (3.2 pav.) parodė, jog tAv yra tinkamas baltymas kokybiškam pasyvuoto stiklo paviršiaus nanostruktūrizavimui. Geriausios kokybės baltyminės linijos buvo suformuotos elastomerinio spaudo rašalavimui naudojant 0,02-0,03 mg/ml tAv koncentracijas, iš kurių pastarąją (0,03 mg/ml) mes pasirinkome kaip optimalią tAv koncentraciją, kurią standartiškai pradėjome naudoti ir tolimesniuose atliekamuose eksperimentuose. PDMS spaudo rašalavimo tirpale esant mažesnei (0,015 mg/ml) arba didesnėms (0,04 ar 0,06 mg/ml) tAv koncentracijoms, buvo gaunamas mažas ant suformuotų tAv nanostruktūrų prisijungusių individualių DNR molekulių tankis ir pakankamai ženklus DNR jungimasis (0,04 mg/ml tAv koncentracijos atveju) baltymais nestruktūrizuotose stiklo paviršiaus vietose (tarplinijiniuose plotuose).



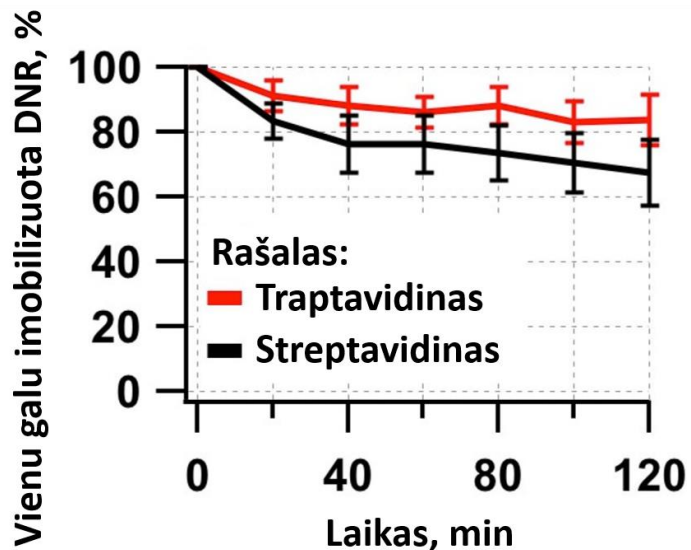
3.2 pav. Visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinės (VVAF) mikroskopijos vaizdai, rodantys, kaip baltyminių linijų kokybė priklauso nuo traptavidino koncentracijos elastomerinio spaudo rašalavimo tirpale. Eksperimentų metu išbandytos skirtingos traptavidino koncentracijos (intervale nuo 0,015 iki 0,06 mg/ml) yra nurodytos virš kiekvieno VVAF mikroskopijos vaizdo. Baltymų atkeliamojo mikrokontaktinio anspaudavimo etapo metu visais atvejais buvo naudota vienoda spaudimo jėga – 0,6 ml. Ant suformuotų traptavidino nanostruktūrų buvo imobilizuotos 5' gale biotilintos 5 kb ilgio DNR molekulės. Jų vizualizavimui buvo panaudotas interkaliojantis fluorescencinis SYTOX Green dažas, kurio sužadinimas atliktas bandinį apšviečiant 488 nm bangos ilgio lazeriu. Kiekvienas iš šių atvaizdų yra 10-ies iš eilės užregistruotų kadrų vidurkis.



3.3 pav. Visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinės (VVAF) mikroskopijos vaizdai, rodantys baltymų atkeliamojo mikrokontaktinio antspaudavimo metu veikiančios spaudimo jėgos efektą, kuris nulemia ant paviršiaus suformuojamų traptavidino linijų kokybės svyravimus. Eksperimentų metu naudotos skirtingos spaudimo jėgos (intervale nuo 0,3 iki 0,6 ml) yra pateiktos virš kiekvieno VVAF mikroskopijos vaizdo. Traptavidino koncentracija PDMS spaudo rašalavimo tirpale visais atvejais buvo 0,03 mg/ml. Ant suformuotų traptavidino nanostruktūrų buvo imobilizuotos 5' gale biotininintos 5 kb ilgio DNR molekulės. Jų vizualizavimui buvo panaudotas interkaliuojantis fluorescencinis SYTOX Green dažas, kurio sužadinimas atliktas bandinį apšviečiant 488 nm bangos ilgio lazeriu. Kiekvienas iš šių atvaizdų yra 10-ies iš eilės užregistruotų kadru vidurkis.

Optimizavę tAv koncentraciją, mes patikrinome, ar spaudo rašalavimo etapu metu naudojant tAv, pasireiškia spaudimo jėgos efektas, kuris buvo stebimas sAv atveju (žr. 3.1. skyrelio 3.1 pav.). Norėdami tai išsiaiškinti, mes atlikome eksperimentus, kuriuose kas kartą keitėme spaudimo jėgos didumą naudodami tą pačią, optimalią tAv koncentraciją (0,03 mg/ml) PDMS spaudo rašalavimo tirpale. Gauti tokių eksperimentų rezultatai (3.3 pav.) mums leido įsitikinti, jog tAv, taip pat kaip ir sAv, galioja charakteringas spaudimo jėgos efektas – antspaudavimo etapu metu didinant „sumuštinį“, sudarytą iš PDMS spaudo, kuris yra uždėtas ant Si šablono arba dengiamojo stikliuko, veikiančią spaudimo jėgą, atitinkamai prastėja ant chemiškai modifikuoto stiklo paviršiaus suformuojamų tAv nanometrinių matmenų linijų kokybė. Didžiausios išbandytos spaudimo jėgos (0,3 ml) atveju tAv nanostruktūros leido išgauti labai nedidelį ant jų imobilizuotų pavienių DNR molekulių tankį. Tuo tarpu, naudojant mažesnes, arčiau santykinai vidutinės vertės esančias spaudimo jėgas (0,45 ir 0,6 ml), ant stiklo paviršiaus

yra sudaromos geresnės kokybės tAv linijos – jos išlieka labiau vientisos ir geba prisijungti didelius individualių biotilintų DNR molekulių kiekius.



3.4 pav. Vidutinio ant vienos baltyminės linijos vienu galu imobilizuotų DNR molekulių kiekio priklausomybė nuo laiko. Chemiškai modifikuoto stiklo paviršius buvo nanostruktūrizuotas streptavidinu arba traptavidinu, kurių koncentracijos elastomerinio spaudos rašalavimo tirpale atitinkamai buvo 0,017 mg/ml ir 0,03 mg/ml. Abiem atvejais buvo naudota vienoda spaudimo jėga – 0,6 ml. Ant suformuotų streptavidino arba traptavidino linijų buvo imobilizuotos kairiajame gale biotilintos bakteriofago λ DNR molekulės. Jų vizualizavimui buvo panaudotas interkaliuojantis fluorescencinis SYTOX Green dažas, kurio sužadinimas atliktas bandinį apšviečiant 488 nm bangos ilgio lazeriu. Vienu galu ant paviršiaus prisijungusių DNR molekulių kiekio vidurkis buvo išvestas iš visų mikroskopijos vaizduose matomų baltyminių linijų. Paklaidų stulpeliai simbolizuoja standartinę nuokrypį.

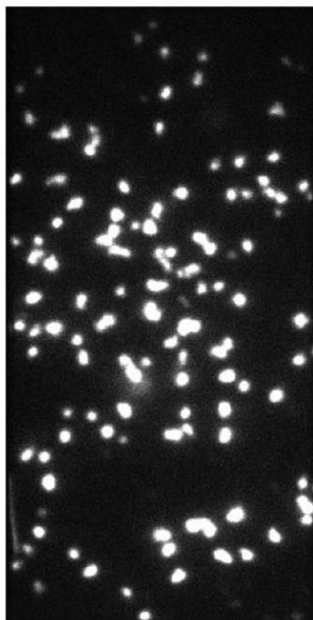
Norėdami išsiaiškinti, ar tAv pasitelkimas, lyginant su sAv panaudojimu, pasyvuoto stiklo paviršiaus nanostruktūrizavimui iš tikrųjų padidina viengubų minkštųjų „DNR užolaidų“ imobilizacijos trukmę, mes atlikome du vienodo pobūdžio eksperimentus, kurių metu ant paviršinių sAv arba tAv linijų buvo imobilizuojamos kairiajame gale biotilintos pavienės fago λ DNR molekulės. Naudojant buferio tėkmę, fiksuotos λ DNR molekulės iš pradžių buvo ištiesiamos palei paviršių ir tuomet vizualizuojamos 488 nm bangos ilgio lazerio spinduliuote žadinant į šias DNR molekules interkaliavusį fluorescencinį SG dažą. Šie abu eksperimentai buvo atliekami mažiausiai 2 valandas, kartojant minėtus veiksmus kas 20 minučių. Po to mes suskaičiavome, kiek užregistruotuose mikroskopijos vaizduose individualių pilno ilgio λ DNR molekulių kiekvienu laiko momentu yra prisijungusių prie baltyminių nanostruktūrų ir šių eksperimentinių duomenų sudarėme vidutinio ant vienos baltyminės linijos imobilizuotų fago λ DNR molekulių kiekio laikinės priklausomybės grafiką (3.4 pav.). Iš jo matyti, jog po 2 valandų vidutinis prie vienos sAv linijos išlikusių prisijungusių λ DNR molekulių skaičius sudaro

maždaug 60% pradinio vidutinio ant vienos baltyminės nanostruktūros fiksuotų λ DNR molekulių kiekio. Tuo tarpu tAv atveju minėta vertė siekia maždaug 80%. Šis pakankamai žymus 2 valandų laikotarpyje disociavusių bakteriofago λ DNR molekulių kiekio skirtumas (sAv atveju - ~40%, tAv atveju - ~20%) mums leido įsitikinti, jog chemiškai modifikuoto stiklo paviršiaus nanostruktūrizavimas tAv yra tinkamas būdas norint pasiekti, kad individualios biotinilintos DNR molekulės atliekamų ilgų eksperimentų, kurie neretai yra reikalingi tyrinėjant pavienių baltymų ir DNR sąveikas, metu ilgesnį laiko tarpą išliktų prisijungusios ant paviršiaus.

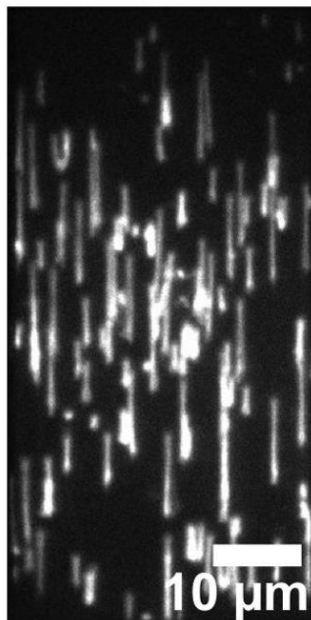
3.3. Abiejų λ DNR molekulių galų kryptinga imobilizacija

Siekdami dviem galais ant paviršiaus imobilizuoti individualias bakteriofago λ DNR molekules taip, jog visų jų orientacija nukleotidų sekos atžvilgiu būtų vienoda, mes nusprendėme abu λ DNR molekulių galus funkcionalizuoti skirtingo specifiškumo žymėmis – kairįjį fago λ DNR molekulių galą modifikavome biotinu, o prie dešiniojo jos galo prijungėme dig (žr. 2.2.2. skyrelį). Be to, mes taip pat atlikome anti-dig žymėjimą biotinu (žr. 2.2.3. skyrelį). Biotinilinti antikūnai prieš dig sudaro mūsų pasitelktos kryptingo abiejų λ DNR molekulių galų fiksavimo strategijos pagrindą, todėl prieš pradėdami minėtu tikslu naudoti šiuos antikūnus, mes turėjome įsitikinti, kad biotino atsitiktinis kovalentinis prijungimas prie anti-dig paviršiuje esančių lizinių pirminių aminių nesutrikdo šių antikūnų gebėjimo surišti dig. Tam mes atlikome eksperimentą, kurio metu prie sAv padengto stiklo paviršiaus iš pradžių buvo prijungti bt-anti-dig. Tuomet ant tokio paviršiaus buvo imobilizuotos tik dig dešiniajame gale modifikuotos fago λ DNR molekulės, kurios po to buvo fluorescenciškai pažymėtos SG dažų ir 488 nm bangos ilgio lazerio pagalba vizualizuotos esant buferio tėkmei ir be jos. Iš šio kontrolinio eksperimento rezultatų (3.5 pav.) matyti, kad dig funkcionalizuotos pavienės λ DNR molekulės ant tokio minėtais komponentais padengto paviršiaus jungiasi tik vienu savo galu ir atitinkamai reaguoja į buferio tėkmės paleidimą ir sustabdymą. Visa tai indukuoja apie sėkmingą dig ir anti-dig tarpusavio sąveikos vyksmą. Tuo tarpu, pabandžius dig dešiniajame gale pažymėtas λ DNR molekules imobilizuoti ant vien tik sAv padengto stiklo paviršiaus, nepavyko pastebėti jokio šių molekulių jungimosi ant paviršiaus, kas mums leido atmesti nespecifinės tokių DNR molekulių adsorbcijos ant biotiną surišančiu baltymu padengto stiklo paviršiaus versiją. Taigi, mūsų pačių biotinilinti anti-dig specifinės biotino-sAv sąveikos dėka ne tik gali būti sėkmingai imobilizuoti ant paviršiaus, bet jie taip pat išlaiko ir savo funkcionalumą, t.y. geba efektyviai surišti dig.

Be buferio tėkmės



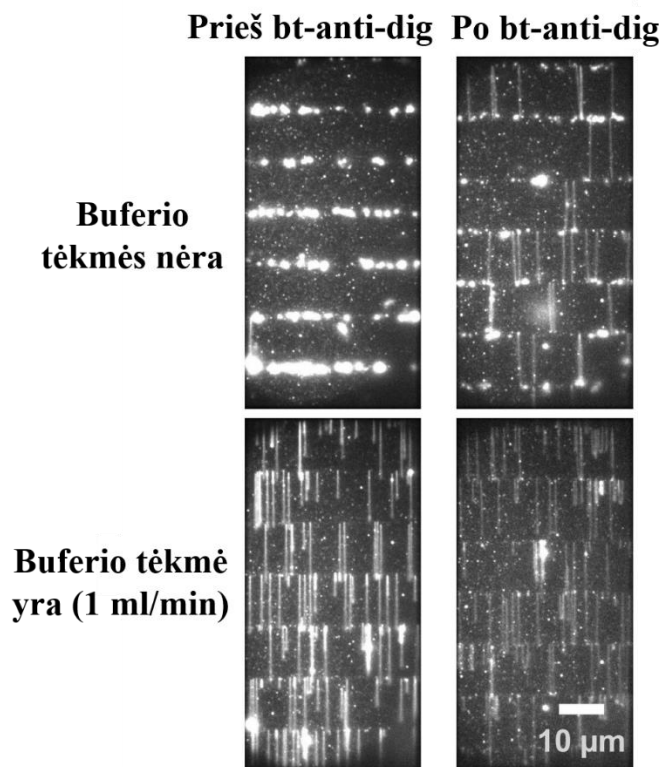
Su buferio tėkme



3.5 pav. Visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, rodantys ant paviršiaus atsitiktinai digoksigeninintu galu imobilizuotų individualių bakteriofago λ DNR molekulių atsaką į buferio tėkmės pokyčius. Šie vaizdai patvirtina biotinu modifikuotų antikūnų prieš digoksigeniną funkcionalumą. Chemiškai modifikuotas stiklo paviršius iš pradžių buvo padengtas streptavidinu (0,02 mg/ml). Tuomet ant tokio, streptavidinu padengto paviršiaus buvo imobilizuoti biotinilinti antikūnai prieš digoksigeniną, prie kurių po to buvo prijungtos dešiniajame gale digoksigeninu pažymėtos λ DNR molekulės. Jų vizualizavimui buvo panaudotas interkalijuojantis fluorescencinis SYTOX Green dažas, kurio sužadinimas atliktas bandinį apšviečiant 488 nm bangos ilgio lazeriu. Kiekvienas iš šių atvaizdų yra 10-ies iš eilės užregistruotų kadru vidurkis.

Abu bakteriofago λ DNR molekulės galus modifikavę skirtingomis žymėmis ir įsitikinę bt-anti-dig funkcionalumu, mes pasitelkėme šiuos du turimus komponentus orientuotų minkštųjų „DNR užuolaidų“ koncepcijos įgyvendinimui. Iš pradžių, funkcionalizuotos λ DNR molekulės, kurių dydis yra 48,5 kb, o teorinis jų viso kontūro ilgis siekia $\sim 16,5 \mu\text{m}$, savo biotinilintu galu buvo imobilizuotos ant chemiškai modifikuoto stiklo paviršiuje suformuotų tAv linijų. Tuomet į tėkmės celės kanalą buvo įleista bt-anti-dig ir atlikta inkubacija naudojant lėtą nuolatinę buferio tėkmę ($\sim 0,1 \text{ ml/min}$). Taip buvo sukuriamos sąlygos šiems antikūnams prisijungti prie tAv nanostruktūrų arba prie dešiniajame fago λ DNR molekulių gale esančio dig. Be to, pastovus buferio tekėjimas leido išvengti antro λ DNR molekulės galo prisitvirtinimo prie tos pačios baltyminės linijos. Galiausiai, buferio tėkmės greitis buvo padidintas iki maždaug 1 ml/min ir vėl atlikta inkubacija esant šiai nuolatinei buferio srovei. Tokiu būdu pavienės λ DNR molekulės, prieš tai ant paviršiaus fiksuotos savo biotinilintu galu, buvo ištiesiamos išilgai stiklo paviršiaus, ko pasekoje dig pažymėtam λ DNR molekulių galui atsirado galimybė prisijungti prie gretimos tAv linijos. Kaip matyti iš šio atlikto eksperimento rezultatų (3.6 pav.), bakteriofago λ DNR molekulės prie tAv nanostruktūrų išliko prisijungusios abiem savo galais net ir tada, kai buferio

tekėjimas buvo sustabdytas. Taigi, panaudodami tokią strategiją, kuomet abu fago λ DNR molekulės galai yra funkcionalizuojami skirtingo atrankumo žymėmis – biotinu ir dig – mes ant baltymais nanostruktūrizuoto stiklo paviršiaus sėkmingai dviem galais imobilizavome ir lygiagrečiai išlygiavome individualias λ DNR molekules, kurios visos, labai tikėtina, pasižymi nukleotidų sekos atžvilgiu vienoda orientacija.

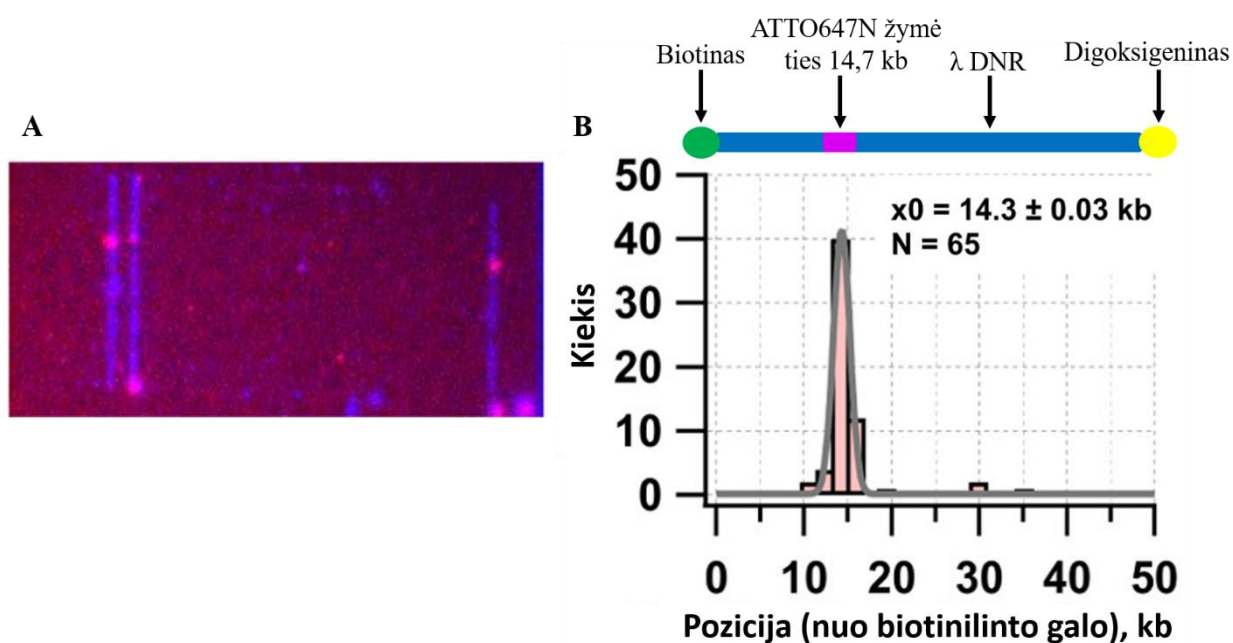


3.6 pav. Visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, rodantys ant paviršiaus imobilizuotų bakteriofago λ DNR molekulių, kurios yra funkcionalizuotos skirtingo specifiškumo žymėmis, atsaką į buferio tėkmės pokyčius prieš ir po biotinilintų antikūnų prieš digoksigeniną įleidimo į tėkmės celę. Chemiškai modifikuotas stiklo paviršius buvo nanostruktūrizuotas traptavidinu. Ant suformuotų gretimų traptavidino linijų abiem galais buvo imobilizuotos kairiajame gale biotinilintos, o dešiniajame gale prijungtą digoksigeniną turinčios, bakteriofago λ DNR molekulės. Jų vizualizavimui buvo panaudotas interkalijuojantis fluorescencinis SYTOX Green dažas, kurio sužadinimas atliktas bandinį apšviečiant 488 nm bangos ilgio lazeriu. Kiekvienas iš šių atvaizdų yra 10-ies iš eilės užregistruotų kadrų vidurkis.

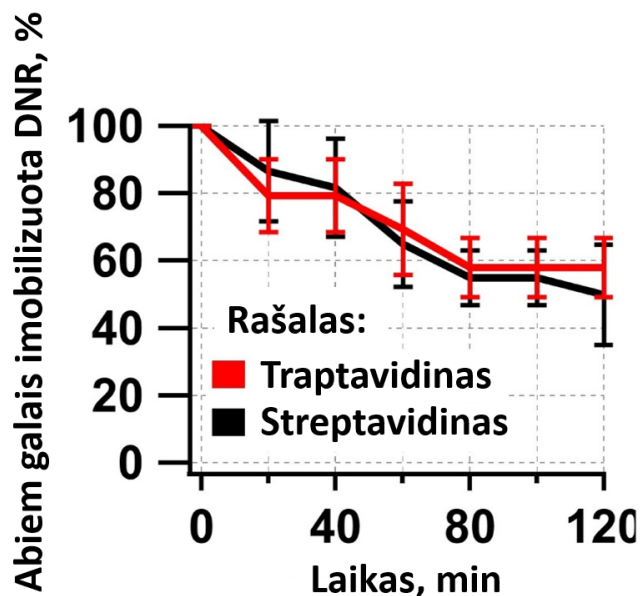
3.4. Dviem galais fiksuotų λ DNR molekulių orientacijos charakterizavimas ir jų imobilizacijos trukmės įvertinimas

Siekdami įsitikinti, kad prieš tai minėtos strategijos taikymas iš tiesų leidžia ant paviršiaus abiem galais imobilizuoti modifikuotas bakteriofago λ DNR molekules tokiu būdu, jog visų jų orientacija būtų apibrėžta ir teisinga, kartu atlikome ne tik λ DNR molekulės galų funkcionalizavimą biotinu bei dig, bet taip pat į jos specifinę poziciją, t.y. 14711 bp atstumu nuo kairiojo biotinilinto λ DNR molekulės galo, asimetriškai įvedėme ir ATTO647N fluorescencinę žymę (žr. 2.2.2. skyrelį). Tuomet remdamiesi minėta strategija, mes tokias λ DNR molekules dviem galais imobilizavome ant paviršinių tAv linijų ir atlikome jų vizualizaciją bandinį žadindami 488 nm ir 635 nm bangos ilgio lazeriais. Užregistruotų VVAF mikroskopijos vaizdų

iškarpoje (3.7 pav., A) matyti, jog ATTO647N fluoroforai buvo lygiagrečiai išsidėstę tik vienoje λ DNR molekulių pusėje – pirmajame λ DNR molekulės trečdalyje. Įvertinę ATTO647N fluorescencinės žymės poziciją ant keliasdešimties atskirų pavienių fago λ DNR molekulių, iš analizės metu apdorotų duomenų sudarėme ATTO647N fluoroforo pasiskirstymą ant λ DNR molekulės atvaizduojančią histogramą (3.7 pav., B). Ji parodė, jog ATTO647N žymė pagrįdė yra lokalizuota 14,3 kb atstumu nuo kairiojo biotininilinto λ DNR molekulės galo, kas labai gerai sutampa su tikėtina tikrąja šios fluorescencinės žymės vieta bakteriofago λ DNR molekulėje. Visa tai mums leido pagrįsti, kad pasitelkus praėjusiam skyrelyje aptartą strategiją, galima surinkti orientuotas minkštąsias „DNR užuolaidas“, kuriose ant paviršiaus abiem galais fiksuotos DNR molekulės savo nukleotidų sekos atžvilgiu yra orientuotos vienodai.



3.7 pav. Abiem galais ant paviršiaus imobilizuotų DNR molekulių orientacijos charakterizavimas. (A) Visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinės mikroskopijos vaizdo, gauto mėlyną (488 nm) kanalą perklojus su raudonu (635 nm) kanalu, iškarpa. Dviem galais ant traptavidino linijų fiksuotos fago λ DNR molekulės yra nuspalvintos mėlynai. Rožine spalva yra pažymėti ATTO647N fluoroforai, kurie buvo asimetriškai įvesti į specifinę λ DNR poziciją – 14711 bp atstumu nuo kairiojo biotininilinto λ DNR molekulės galo. (B) Histograma, rodanti ATTO647N fluorescencinės žymės vietos pasiskirstymą ant paviršiaus abiem galais imobilizuotose bakteriofago λ DNR molekulėse. Eksperimentiniai duomenys yra atidėti šviesiai rudais stulpeliais. Pilka spalva yra pažymėtas Gausinis priderinimas (angl. *Gaussian fit*). Virš histogramos schematiškai pavaizduota viso kontūro ilgio (48,5 kb; $\sim 16,5 \mu\text{m}$) bakteriofago λ DNR molekulė ir jos atitinkamos modifikacijos.



3.8 pav. Vidutinio abiem galais ant paviršiaus imobilizuotų DNR molekulių kiekio priklausomybė nuo laiko. Chemiškai modifikuoto stiklo paviršius buvo nanostruktūrizuotas streptavidinu arba traptavidinu, kurių koncentracijos PDMS spaudo rašalavimo tirpale atitinkamai buvo 0,017 mg/ml ir 0,03 mg/ml. Abiem atvejais buvo naudota vienoda spaudimo jėga – 0,6 ml. Ant suformuotų streptavidino arba traptavidino linijų buvo imobilizuotos kairiajame gale biotinilintos, o dešiniajame gale prijungtą digoksigeniną turinčios, bakteriofago λ DNR molekulės. Jų vizualizavimui buvo panaudotas interkalijuojantis fluorescencinis SYTOX Green dažas, kurio sužadinimas atliktas bandinį apšviečiant 488 nm bangos ilgio lazeriu. Dviem galais ant paviršiaus prisijungusių DNR molekulių kiekio vidurkis buvo išvestas iš visų mikroskopijos vaizduose matomų baltyminių linijų. Paklaidų stulpeliai simbolizuoja standartinį nuokrypį.

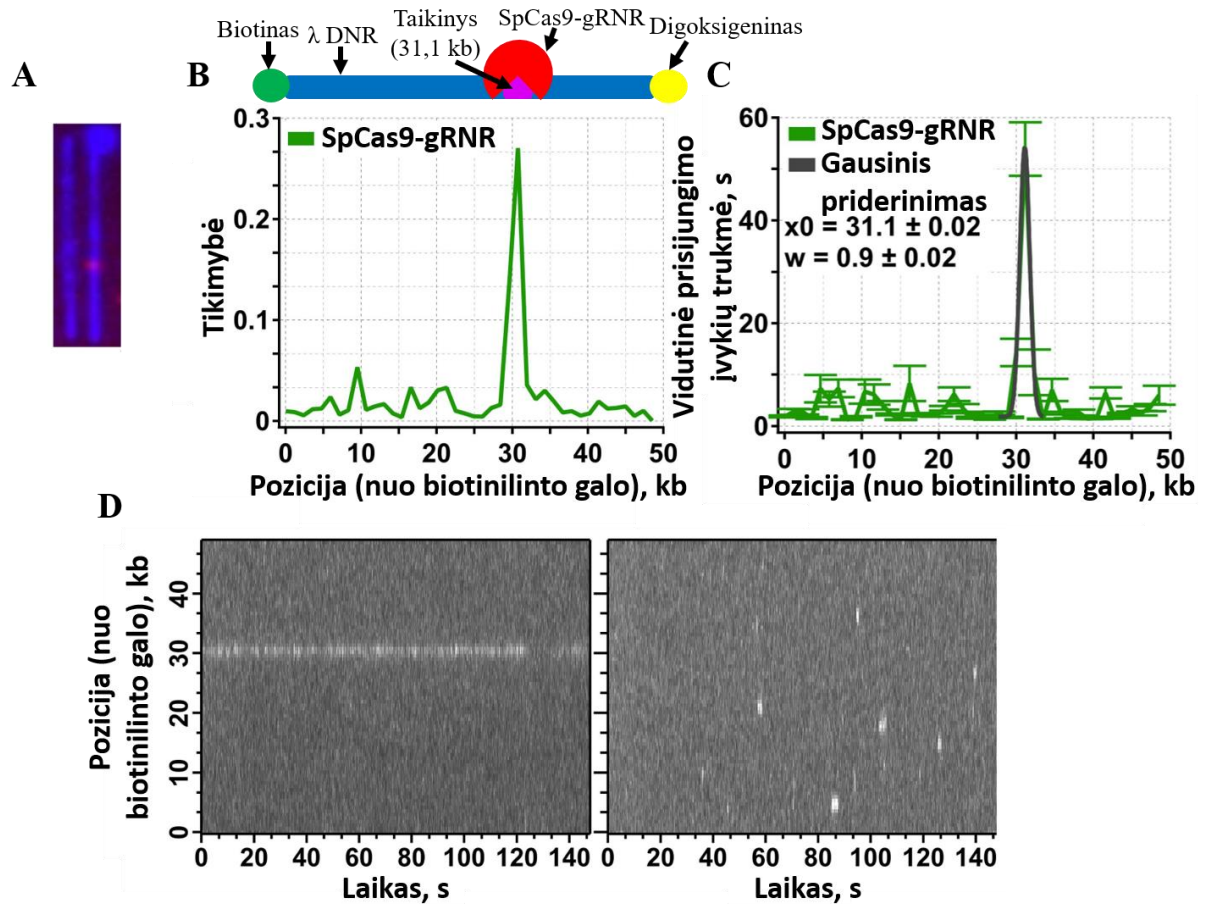
Norėdami nustatyti, ar pasyvuoto stiklo paviršiaus nanostruktūrizavimas tAv, taip pat kaip ir vienu galu ant paviršinių tAv linijų fiksuotų biotinilintų DNR molekulių atveju, leidžia padidinti dvigubų minkštųjų „DNR užuolaidų“ imobilizacijos trukmę, mes atlikome du vienodo tipo eksperimentus, iš kurių viename vertinome abiem galais ant sAv linijų fiksuotų bakteriofago λ DNR molekulių paviršinės imobilizacijos trukmę, o kitame - λ DNR molekulių, kurios savo dviem galais yra prisijungusios prie tAv nanostruktūrų, imobilizacijos trukmę. Šių eksperimentų metu kas 20 minučių, bandinį žadinant 488 nm bangos ilgio lazeriu, buvo vizualizuojamos SG dažų pažymėtos abiem galais ant paviršiaus imobilizuotos individualios fago λ DNR molekulės ir kartu užregistruojami labai trumpi fluorescencijos filmai. Ši ciklinė vaizdinimo procedūra iš viso truko 2 valandas, o viso šio laikotarpio metu buferio tėkmė nebuvo naudojama. Tokių atliktų eksperimentų rezultatai (3.8 pav.) parodė, jog po 2 valandų tiek ant sAv, tiek ir ant tAv linijų abiem galais prisijungusių λ DNR molekulių vidutinis kiekis abiem atvejais iš esmės yra

identiškas (~50%), o be to, šio kiekio kitimas laike yra itin panašus abiejų minėtų biotiną surišančių baltymų atvejais. Kadangi fago λ DNR molekulės (arba kažkuris vienas jų imobilizuotas galas) nuo sAv ir tAv nanostruktūrų disocijuoja labai panašiu greičiu, tai reiškia, kad abiem galais ant paviršiaus fiksuotų λ DNR molekulių imobilizacijos trukmę visumoje apsprendžia dig ir anti-dig tarpusavio sąveika, kuri yra silpnesnė už sąveiką tarp biotino ir sAv arba tAv. Taigi, visa tai mums leido išsiaiškinti, jog tAv naudojimas vietoje sAv dvigubų minkštųjų „DNR užuolaidų“ surinkimo metu nesuteikia galimybės bakteriofago λ DNR molekules ilgiau išlaikyti abiem galais prisijungusias ant tAv nanostruktūrizuoto stiklo paviršiaus, kadangi pagrindinis šį laiką ribojantis veiksnys yra santykinai nestipri dig ir anti-dig sąveika.

DNR molekulių imobilizacijos ant paviršiaus abiem jų galais efektyvumas, t.y. prie gretimų baltyminių linijų dviem galais prijungtų DNR molekulių skaičiaus ir bendro vienu galu ant paviršiaus fiksuotų DNR molekulių pradinio kiekio santykis, labiausiai priklauso nuo atstumo tarp gretimų baltyminių linijų. Šį efektyvumą kiek mažiau nulemia ir ant chemiškai modifikuoto stiklo paviršiaus suformuojamų baltyminių nanostruktūrų plotis. Dvigubų minkštųjų „DNR užuolaidų“ surinkimui panaudodami įvairius Si šablonus, iš kurių kiekvienas pasižymi skirtingu (11-14 μm) tarplinijiniu atstumu ir nevienodu (350, 500 bei 1000 nm) linijinių griovelių pločiu, mes nustatėme, kad didžiausias bakteriofago λ DNR molekulių prijungimo ant baltyminių linijų abiem galais efektyvumas (80%) yra išgaunamas tuomet, kai Si šablone išraižytos 500 nm pločio linijos viena nuo kitos yra nutolusios 13 μm atstumu (Kopūstas et al., 2021).

3.5. SpCas9 endonuklezės sąveikos su DNR tyrimas vienos molekulės lygyje

Siekdami pademonstruoti, kad mūsų sukurtos ir visų praėjusiuose skyreliuose aptartų darbų metu optimizuotos orientuotos minkštosios „DNR užuolaidos“ puikiai tinka pavienių baltymų ir DNR tarpusavio sąveikų tyrimams atlikti, mes pasirinkome vienos molekulės lygyje panagrinėti laukinio tipo SpCas9 endonuklezės sąveiką su DNR. Pirmiausia, šį baltymą mes pasižymėjome fluorescenciškai. Tai buvo atlikta ATTO647N žymę netiesiogiai prijungus prie gRNR, kurią SpCas9 inkorporuoja į savo RNP komplekso sudėtį (žr. 2.2.6. skyrelį). Nustatėme, jog tokia žymėjimo strategija, kuomet 3' gale modifikuota tracrNR yra hibridizuojama su komplementariu oligonukleotidu, turinčiu kovalentiškai prijungtą ATTO647N fluoroforą, mums leido išgauti pakankamai didelį SpCas9-gRNR komplekso fluorescencinio žymėjimo efektyvumą, kuris siekė daugiau nei 80%.



3.9 pav. SpCas9 endonukleazės sąveikos su DNR tyrimas panaudojant dvigubų minkštųjų „DNR užuolaidų“ eksperimentinę platformą. (A) Visiškojo vidaus atspindžio fluorescencinės mikroskopijos vaizdo, gauto mėlyną (488 nm) kanalą perklojus su raudonu (635 nm) kanalu, iškarpa. Abiem galais ant traptavidino linijų fiksuotos bakteriofago λ DNR molekulės yra nuspalvintos mėlynai. Rožine spalva spalva yra pažymėtas individualus SpCas9-gRNR kompleksas, susirišęs su savo taikiniu, kuris yra išsidėstęs 31,3 kb atstumu nuo kairiojo biotinilinto bakteriofago λ DNR molekulės galo. (B) Histograma, rodanti SpCas9 ribonukleoproteininio (RNP) komplekso prisijungimo įvykių pasiskirstymą. (C) Histograma, vaizduojanti vidutinę SpCas9-gRNP komplekso prisijungimo įvykių trukmę. Paklaidų stulpeliai simbolizuoja standartinį nuokrypį. (D) Analizės metu iš pavienių λ DNR molekulių sudarytos reprezentatyvios kimogramos, atvaizduojančios ilgus (kairėje) ir trumpus (dešinėje) SpCas9 RNP komplekso prisijungimo įvykius.

Tuomet biocheminių eksperimentų pagalba įsitikinę fluorescenciškai pažymėtos SpCas9 nukleazės funkcionalumu, mes PM lygmenyje atlikome šio fermento sąveikos su DNR tyrimą naudodamiesi savąja patobulinta orientuotų minkštųjų „DNR užuolaidų“ eksperimentine platforma (žr. 2.2.6. skyrelį). Individualių SpCas9 RNP kompleksų sąveikos su ant paviršiaus dviem galais imobilizuotomis lygiagrečiai išlygiuotomis ištiestomis pavienėmis bakteriofago λ DNR molekulėmis vizualizaciją atlikome bandinį žadindami 488 nm ir 635 nm bangos ilgio lazeriais. Pažymėtina, jog viso šio eksperimento metu tėkmės celės kanale nebuvo Mg^{2+} jonų.

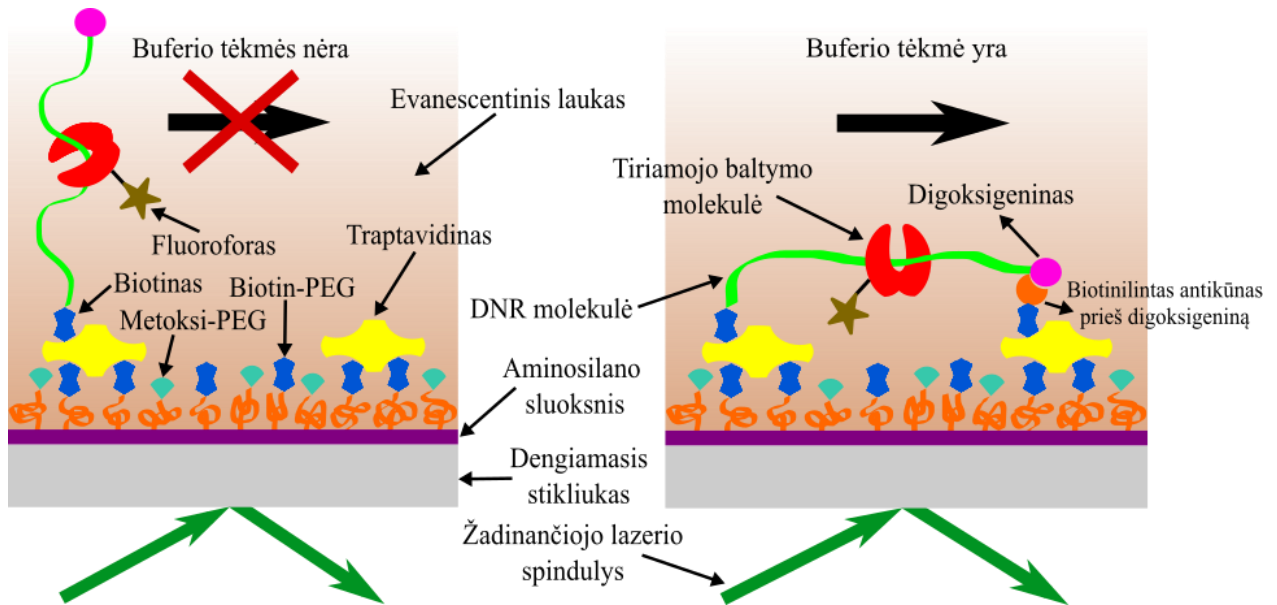
Išanalizavę užregistruotus fluorescencijos filmus (3.9 pav., A), mes sudarėme SpCas9-gRNR komplekso prisijungimo prie DNR profili atvaizduojančią histogramą (3.9 pav., B). Ji parodė, jog SpCas9 endonukleazė prie fago λ DNR molekulių pagrinde jungėsi savo vienintelio taikinio vietoje, ką indikuoja histogramoje matoma didžiausia smailė, kurios centrinė pozicija puikiai sutampa su crRNR sudėtyje esančios skirtuko sekos apspręsta SpCas9 baltymo taikinio vieta λ DNR molekulėje. Kitose λ DNR molekulės vietose SpCas9 nukleazės prisijungimo įvykių skaičius buvo ženkliai mažesnis, nors iš histogramos matyti, kad tiriamasis baltymas buvo labiau linkęs jungtis prie kairiosios λ DNR molekulės pusės, galimai dėl to, jog šios fago λ DNR molekulės dalies GC sąstatas yra aukštesnis.

Ekspimentinių duomenų analizės metu mes įvertinome vidutinę SpCas9 prisijungimo įvykių trukmę (3.9 pav., C) ir taip pat sudarėme reprezentatyvias kimogramas (3.9 pav., D). Tokiu būdu išsiaiškinome, kad SpCas9 RNP kompleksas prie savo taikinio išbuvo prisijungęs vidutiniškai ~52 sekundes (ilgi prisijungimo įvykiai), o prie bet kurios kitos bakteriofago λ DNR molekulės pozicijos - ~7 sekundes (trumpi prisijungimo įvykiai). Taigi, pasitelkę detaliai charakterizuotos ir itin plačiai naudojamos *S. pyogenes* bakterijose funkcionuojančios CRISPR-Cas9 sistemos esminį komponentą – SpCas9 endonukleazę – mes parodėme, jog mūsų išplėtotas orientuotų minkštųjų „DNR užuolaidų“ eksperimentinis įrankis, taip pat kaip ir kitokiais principais veikiančios „DNR užuolaidų“ technologijos, gali būti sėkmingai panaudotas efektyviems įvairių baltymų sąveikos su DNR tyrimams vienos molekulės lygyje.

3.6. Rezultatų aptarimas

Šio darbo metu mes optimizavome ir patobulinome savo anksčiau sukurtą minkštųjų „DNR užuolaidų“ platformą. Be to, mes taip pat eliminavome ir pagrindinį pirminės šio mūsų eksperimentinio įrankio versijos trūkumą – neapibrėžtą abiem galais ant paviršiaus imobilizuotų DNR molekulių orientaciją. Viso to galutinis rezultatas – orientuotos minkštosios „DNR užuolaidos“ (3.10 pav.), kurių pagalba PM lygmenyje galima realiu laiku vizualizuoti baltymų-DNR sąveikas ir nuodugniai tyrinėti įvairių su DNR sąveikaujančių baltymų dinaminis asociacijos ir disociacijos nuo substrato procesus bei šių baltymų naudojamus taikinio paieškos mechanizmus. Pavienių baltymų ir DNR tarpusavio sąveikų tyrimų įgyvendinimui gali būti pasitelkti ir kiti didelio našumo „DNR užuolaidų“ technologijos variantai, tačiau mūsų sukurta ir šio darbo metu pagerinta minkštųjų „DNR užuolaidų“ platforma pasižymi keliais esminiais

pranašumais – paprastumu, pigumu bei technologiniu prieinamumu – kurie ją paverčia mokslinei bendruomenei itin patraukliu eksperimentiniu įrankiu.



3.10 pav. Orientuotos minkštosios „DNR užolaidos“ – šio darbo galutinis rezultatas, pasiektas patobulinus mūsų sukurtą pirminę šios eksperimentinės platformos versiją.

Minkštųjų „DNR užolaidų“ tobulinimas susidėjo iš keletos pagrindinių stadijų. Pirmojo etapo metu mes optimizavome spaudimo jėgą, kuris yra vienas esminių veiksnių, nulemiančių ant chemiškai modifikuoto stiklo paviršiaus suformuojamų nanometrinių matmenų baltyminių linijų kokybę. Naudodamiesi savadarbiu nešiojamuoju antspaudavimo prietaisu, nustatėme, jog geriausios kokybės sAv nanostruktūros gali būti patikimai išgaunamos tuomet, kai iš rašaluoto PDMS spaudo, uždėto ant Si šablono arba pasyvuoto dengiamojo stikliuko, sudarytą „sumuštinį“ veikia santykinai vidutinė spaudimo jėga. 0,6 ml švirkšto gradavimo skalės vertę, kuri atitinka ~18 N/cm² spaudimo jėgą, pasirinkome kaip optimalų spaudimo jėgos standartą, kuris mums leido kiekvieno tolimesnio eksperimento metu stiklo paviršių nuosekliai nanostruktūrizuoti geriausios kokybės baltyminėmis linijomis.

Antrojo etapo metu mes pasitelkėme tAv – dvigubą sAv mutantą, kuris, lyginant su įpustu sAv, dešimčia kartų stipriau suriša biotiną – ir tokiu būdu padidinome minkštųjų „DNR užolaidų“ imobilizacijos trukmę. Naudodami pastovią spaudimo jėgą (0,6 ml), nustatėme optimalią tAv koncentraciją (0,03 mg/ml), kuri turėtų būti PDMS spaudo rašalavimo tirpale, siekiant išgauti geriausią paviršinių tAv linijų kokybę. Be to, parodėme, jog tAv, taip pat kaip ir sAv, galioja antspaudavimo stadijos metu veikiančios spaudimo jėgos efektas, kuris nulemia, kad ant paviršiaus suformuojamų baltyminių nanostruktūrų kokybė prastėja pasireiškiant vis

didesnėms spaudimo jėgoms. Galiausiai, mes įsitikinome, jog, lyginant su sAv, stiklo paviršiaus nanostruktūrizavimas tAv iš tiesų leidžia ilgiau ant paviršiaus išlaikyti vienu galu (biotinilintu) imobilizuotas DNR molekules.

Sekančio etapo metu mes išsprendėme nežinomos abiem galais ant paviršiaus fiksuotų DNR molekulių orientacijos problemą. Tą mes realizavome abu bakteriofago λ DNR molekulės galus funkcionalizuodami skirtingo specifiškumo žymėmis (kairįjį galą biotinu, o dešinįjį – dig) ir, greta to, kovalentiškai modifikuodami anti-dig biotinu. Įsitikinę, jog mūsų modifikuoti bt-anti-dig yra funkcionalūs, t.y. biotino-sAv sąveikos dėka gali specifiškai prisijungti ant sAv padengto stiklo paviršiaus ir kartu geba surišti dig, šiuos du komponentus – biotinilintas ir digoksigeninintas DNR molekules bei bt-anti-dig – mes sėkmingai panaudojome kryptingam individualių DNR molekulių abiejų galų prijungimui prie gretimų baltyminių linijų, kurios chemiškai modifikuoto dengiamojo stikliuko nanostruktūrizavimo metu buvo suformuotos ant stiklo paviršiaus. Į bakteriofago λ DNR molekulių asimetrinę poziciją įvedę ATTO647N fluorescencinę žymę, parodėme, kad minėtos strategijos dėka visų dviem galais ant paviršiaus imobilizuotų individualių λ DNR molekulių orientacija nukleotidų sekos atžvilgiu yra vienoda ir iš anksto apibrėžta. Be to, palyginome dvigubų minkštųjų „DNR užuolaidų“ imobilizacijos trukmę, kuomet jų surinkimui buvo naudojamas vienas iš dviejų skirtingų biotiną surišančių baltymų – sAv arba tAv. Išsiaiškinome, jog abiem atvejais DNR molekulės ant paviršiaus dviem galais išlieka prisijungusios labai panašų laiko tarpą, kas mums leido patvirtinti, kad tokią sistemą apribojantis veiksnys yra santykinai silpna dig ir anti-dig sąveika.

Paskutiniojo etapo metu, pasitelkę gerai charakterizuotą, bet šiuo metu vis dar labai populiarų tyrimo objektą – SpCas9 endonukleazę, mes pademonstravome, kad mūsų išplėta orientuotų minkštųjų „DNR užuolaidų“ eksperimentinė platforma leidžia vienos molekulės lygyje tyrinėti įvairių baltymų ir DNR tarpusavio sąveikas. ATTO647N fluoroforu pažymėto SpCas9 RNP komplekso sąveikos su DNR PM lygmenyje nagrinėjimui pritaikę savąją technologiją, nustatėme, jog mūsų eksperimentinėje sistemoje SpCas9 daugiausiai rišosi prie savo DNR taikinio vietos, kur šis baltymas išbūdavo prisijungęs vidutiniškai maždaug penkis kartus ilgiau negu kad ant bet kurios kitos, taikinio sekos neturinčios λ DNR molekulės pozicijos.

Nors šio darbo metu mes optimizavome ir patobulinome savo pačių sukurtą minkštųjų „DNR užuolaidų“ eksperimentinę platformą atsižvelgdami į pagrindinius jos pirmtaką ribojusius trūkumus, tokius kaip neapibrėžta abiem galais ant paviršiaus fiksuotų DNR molekulių orientacija, santykinai nedidelė ant paviršiaus fiksuotų DNR molekulių imobilizacijos trukmė ir

ne pati geriausia stiklo paviršiaus nanostruktūrizavimo metu suformuojamų baltyminių linijų kokybė, tačiau tai toli gražu nėra geriausia įmanoma minškųjų „DNR užuolaidų“ versija. Iš tiesų egzistuoja bent keletas esminių aspektų, kuriuos pagerinus, orientuotos minkštosios „DNR užuolaidos“ taptų dar patrauklesniu, efektyvesniu ir galingesniu pavienių baltymų-DNR sąveikų tyrimų įrankiu.

Vienas iš tokių aspektų yra stiklo paviršiaus pasyvacija. Kaip jau minėta anksčiau, mes savo eksperimentams naudojamus dengiamuosius stikliukus iš pradžių chemiškai modifikuojame (3-aminopropil)trietoksisilanu ir po to padengiame biotin-PEG bei metoksi-PEG molekulių mišinio sluoksniu, kas leidžia stiklo paviršių ne tik funkcionalizuoti biotinu, bet taip pat jį paversti ir labiau inertišku. Be to, nespecifinei baltymų adsorbicijai prie stiklo paviršiaus mažinti mes naudojame mažos molekulinės masės (333 Da) metil-PEG₄ molekules ir nejoninį detergentą Tween-20. Tačiau tokiais būdais pasyvuotas stiklas vis tiek ganėtinai dažnai pasižymi įvairiais paviršiniais defektais ir atvirais baltymus pritraukiančiais plotais, kuriuos nulemia nepakankamai tankus PEG molekulių sluoksnis. Be to, įvairūs su DNR sąveikaujantys baltymai pasižymi itin skirtingomis adsorbicijomis savybėmis, turi nevienodą krūvį, kurį apsprendžia baltymo sudėtyje esančių teigiamai ir neigiamai įkrautų aminorūgščių liekanų kiekis, bei neretai yra sulieti su įvairiais grynimui skirtais inkarais, kurie savo ruožtu gali padidinti šių baltymų polinkį nespecifiškai jungtis prie stiklo paviršiaus.

Todėl siekdami eksperimentų metu kiek įmanoma labiau minimalizuoti nespecifinę tiriamųjų baltymų adsorbiciją, dėl kurios duomenų analizės metu tampa sudėtinga identifikuoti baltymo molekulių prisijungimo prie imobilizuotos DNR įvykius, ant tėkmės celės stiklo paviršiaus, ateityje mes planuojame išbandyti kitokius, galimai efektyvesnius stiklo paviršiaus pasyvacijos būdus. Šioje vietoje mes iš tiesų turime pakankamai platų ir įvairiapusišką pasirinkimą. Pavyzdžiui, vietoje įpastos minėtos stiklo paviršiaus PEGilizavimo procedūros būtų galima pabandyti pasiruošti „debesies taško“ (angl. *cloud-point*) PEG paviršius, kuomet į PEGilizavimo tirpalą papildomai yra pridėjama K₂SO₄. Tokia stiklo paviršiaus PEGilizacija yra atliekama ties PEG tirpumo riba – esant tam tikrai šios druskos koncentracijai yra pasiekiamos tokios sistemos fazinės ribos ir itin nežymiai peržengiamas kritinis (drumstumo) taškas, todėl PEG grandinės susipakuoja žymiai kompaktiškiau, kas leidžia stiklo paviršių daug tankiau padengti tokiomis PEG molekulėmis ir taip sumažinti atvirų stiklo paviršiaus plotų kiekį (Park et al., 2020). Kitas patrauklus variantas – vienažingsnė stiklo paviršiaus pasyvacija, kurios metu stiklo paviršius yra padengiamas jungtinių PEG-silano molekulių sluoksniu. Tokiu būdu du

įprastiniai atskiri stiklo paviršiaus cheminio modifikavimo etapai – silanizavimas ir PEGilizavimas – yra sujungiami į vieną, kas labai sutrumpina dengiamųjų stikliukų pasyvavimo procedūrą bei gali būti efektyviai pritaikyta PM fluorescencijos tyrimuose (Gidi et al., 2018). Galiausiai, stiklo paviršiaus cheminiam modifikavimui tipiška naudojamą silanizavimo procedūrą būtų galima bandyti pakeisti stiklo paviršiaus modifikavimu įvairiais funkciniais silatrano dariniais, tokiais kaip sulfobetaino silatranu ar 1-(3-aminopropil)silatranu, kuriais padengtas stiklo paviršius galimai efektyviau nuo savęs atstumtų skirtingus baltymus ir kitas tiriamąsias biomolekules (Huang ir Zheng, 2019; Shlyakhtenko et al., 2013).

Kitas svarbus aspektas yra orientuotų minkštųjų „DNR užolaidų“ paviršinės imobilizacijos trukmė. Kaip jau minėta prieš tai, mums ant chemiškai modifikuoti stiklo paviršiaus pavyko sėkmingai iš tAv suformuoti geros kokybės baltymines linijas, kurios, lyginant su paviršinėmis sAv nanostruktūromis, leido DNR molekules ilgiau išlaikyti vienu galu (biotinilintu) imobilizuotas ant paviršiaus. Tačiau, kad ir kokia stipri tAv-biotino sąveika bebūtų, ji nėra kovalentinė. Be to, mes taip pat išsiaiškinome, jog tAv panaudojimas iš esmės nepadidina dvigubų minkštųjų „DNR užolaidų“ imobilizacijos trukmės, kurią apsprendžia santykinai nestipri sąveika tarp dig ir anti-dig. Visa tai reiškia, kad eksperimento metu ilginiui vis daugiau DNR molekulių bus atsijungusių nuo paviršiaus ir vis mažiau jų liks imobilizuotų ant paviršiuje esančių baltyminių linijų, kas iš principo dalinai apriboja „DNR užolaidų“ technologijos našumą, kadangi dėl minėtos priežasties ilgai trunkančių eksperimentų metu tampa sudėtinga surinkti didelius statistinių duomenų kiekius.

Vienas iš efektyviausių šios problemos sprendimo būdų yra kovalentiniu ryšiu pagrįstas DNR molekulių imobilizavimas ant baltymais nanostruktūrizuoto stiklo paviršiaus. Pavyzdžiui, vienas iš DNR molekulės galų galėtų būti pažymėtas tokiomis funkcinėmis grupėmis, kaip sulfhidrilinė (kitaip – tiolinė, merkapt) grupė (-SH) ar amino grupė (-NH₂). Tuomet pirmuoju atveju tAv reiktų chemiškai modifikuoti maleimidu. Ant stiklo paviršiaus suformavus tAv-maleimido konjugato linijas, prie jų būtų galima kovalentiškai prijungti tioline grupe funkcionalizuotas DNR molekules, kadangi maleimido ir merkapt grupės tarpusavio sąveikos metu tarp jų susidaro kovalentinis ryšys. Tuo tarpu antruoju atveju paviršines nanostruktūras sudarančio tAv karboksigrupes reiktų aktyvuoti specialiu cheminiu reagentu – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidu (angl. *EDC*). Šios cheminės reakcijos metu susidaręs aktyvus O-acilizourėjos esteris greitai reaguoja su aplinkoje esančiais pirminiais aminais. Todėl ant tokių, iš EDC aktyvuoto tAv sudarytų baltyminių linijų taip pat būtų galima kovalentiškai imobilizuoti

DNR molekules, kurios viename iš savo galų yra pažymėtos $-NH_2$ grupe. Taigi DNR molekulės galų funkcionalizavimas dviem skirtingais heterologiniais žymenimis (pavyzdžiui, vieno galo – biotinu, o kito – sulfhidriline grupe arba amino grupe) leistų ne tik išvengti mūsų sistemą apribojančio veiksnio – dig–anti-dig sąveikos – panaudojimo, bet taip pat ir ženkliai padidintų orientuotų minkštųjų „DNR užuolaidų“ imobilizacijos trukmę, kuri idealiu atveju (jeigu vienas DNR molekulės galas būtų modifikuotas tioline grupe, o kitas – amino grupe) teoriškai turėtų būti itin ilga dėl kovalentinių ryšių pagrįsto DNR molekulių prijungimo ant paviršiaus.

Kaip jau minėta anksčiau, šio darbo metu, pasitelkę orientuotų minkštųjų „DNR užuolaidų“ platformą, mes PM lygmenyje patyrinėjome SpCas9 endonukleazės sąveikos su DNR ypatumus ir tokiu būdu pademonstravome šio mūsų sukurto bei išplėtoto įrankio galimybes ir jo sėkmingą praktinį pritaikymą realiomis eksperimentinėmis sąlygomis. Vis tik SpCas9 fermentas šiuo metu yra ne tik nuodugniai charakterizuotas įvairiais biocheminiais ir struktūriniais metodais, bet ir pakankamai plačiai ištyrinėtas vienos molekulės lygyje. Todėl ateityje, naudodamiesi savąją orientuotų minkštųjų „DNR užuolaidų“ technologija, mes planuojame patyrinėti daugelį kitų su DNR sąveikaujančių baltymų, kurių studijos PM lygmeniu iki šiol tėra tik labai menkai arba absoliučiai nėra įgyvendintos. Tarp tokių mūsų potencialių netolimos ateities tyrimų objektų patenka skirtingi SpCas9 mutantai, Cas9 nukleazės ortologai, įvairiose bakterijose aptinkamas Cascade (angl. *CRISPR-associated complex for antiviral defence*) kompleksas, anti-CRISPR baltymai ir įvairios bakterijų DNR metiltransferazės.

Rezultatų skyriuje aptartų darbų pagrindu mes parengėme ir sėkmingai paskelbėme publikaciją: Kopūstas A, Ivanovaitė Š, Rakickas T, Pocevičiūtė E, Paksaitė J, Karvelis T, Zaremba M, Manakova E, Tutkus M. Oriented Soft DNA Curtains for Single-Molecule Imaging. *Langmuir*. 2021; 37(11):3428–37.

IŠVADOS

1. Geriausios kokybės baltyminės linijos ant chemiškai modifikuoto stiklo paviršiaus yra suformuojamos naudojant santykinai vidutinę (0,6 ml) spaudimo jėgą.
2. Lyginant su streptavidinu, stiklo paviršiaus nanostruktūrizavimas traptavidinu leidžia vienu biotininu galu imobilizuotas DNR molekules ilgiau išlaikyti ant paviršiaus, bet nepadidina dvigubų minkštųjų „DNR užuolaidų“ imobilizacijos trukmės.
3. DNR molekulių galų funkcionalizavimas atitinkamai biotinu ir digoksigeninu užtikrina nukleotidų sekos atžvilgiu vienodą visų tokiu būdu modifikuotų abiem galais ant paviršiaus imobilizuotų DNR molekulių orientaciją.
4. Sėkmingai vienos molekulės lygyje atliktas Cas9 endonukleazės sąveikos su DNR tyrimas pademonstravo, jog patobulinta orientuotų minkštųjų „DNR užuolaidų“ eksperimentinė platforma tinka pavienių baltymų ir DNR sąveikų studijoms atlikti.

SANTRAUKA

Orientuotos minkštosios DNR užuolaidos pavienių molekulių sąveikų tyrimams

Pavienių baltymų-DNR sąveikų tyrimo metodai leidžia atskirai apie kiekvieną tiriamajame bandinyje esančią individualią molekulę išgauti vertingos informacijos, kuri ansamblio matavimo eksperimentų, atliekamų taikant klasikinius biocheminius metodus, metu įprastai yra paslėpta po bendru visų molekulių indėlio vidurkiu. Tačiau didžioji dauguma tokių pavienių molekulių tyrimo metodų susiduria su mažo našumo problema, kurią nulemia jų negebėjimas vienu metu manipuluoti daugiau negu viena tiriamąja biomolekule. „DNR užuolaidų“ technologija, skirta baltymų ir DNR tarpusavio sąveikų tyrimams vienos molekulės lygyje, savo našaus funkcionavimo principu efektyviai sprendžia šią problemą ir suteikia galimybę vieno eksperimento metu surinkti didelį statistinių duomenų kiekį. Neseniai mes sukūrėme alternatyvia DNR molekulių imobilizavimo ant paviršiaus strategija paremtą minkštųjų „DNR užuolaidų“ platformą, kuri, lyginant su kitais tradicinio „DNR užuolaidų“ įrankio variantais, ne tik išlaiko šios technologijos kertinį bruožą – didelį našumą, bet taip pat kartu pasižymi pigumu, paprastumu ir technologiniu prieinamumu. Nepaisant to, mūsų sukurtos eksperimentinės platformos efektyvų praktinį pritaikomumą apriboja keletas esminių trūkumų – nepakankamas veiksmų, darančių didžiausią įtaką ant stiklo paviršiaus suformuojamų baltyminių linijų kokybei, optimizavimas, santykinai nedidelė ant paviršiaus fiksuotų individualių DNR molekulių imobilizacijos trukmė ir neapibrėžta ant paviršiaus dviem galais imobilizuotų biotinilintų DNR molekulių orientacija. Šio darbo metu mes patobulinome savąją minkštųjų „DNR užuolaidų“ technologiją. Optimizavę baltymų atkeliamojo mikrokontaktinio antspaudavimo etapo metu veikiančią spaudimo jėgą, chemiškai modifikuoto stiklo paviršiaus nanostruktūrizavimui pasitelkę traptavidinę ir DNR molekulių galus atitinkamai funkcionalizavę skirtingo specifiškumo žymenimis – biotinu bei digoksigeninu – mes sukūrėme ilgesnę fiksuotų DNR molekulių paviršinės imobilizacijos trukmę nulemiančią ir apibrėžtą imobilizuotų DNR molekulių orientaciją užtikrinančią savosios platformos versiją – orientuotas minkštąsias „DNR užuolaidas“. Galiausiai, pasinaudodami Cas9 endonukleaze, mes pademonstravome, jog šis eksperimentinis įrankis gali būti sėkmingai pritaikytas pavienių baltymų-DNR sąveikų tyrimams.

SUMMARY

Oriented Soft DNA Curtains for Single-Molecule Interaction Studies

Single-molecule techniques, which are designed for protein-DNA interaction studies, allow to gather valuable information about every individual molecule that is present in the sample. Employment of classical biochemical methods, which are based on ensemble measurements, prevents the obtainment of this useful information that is typically covered under the overall average of contribution coming from all molecules. However, vast majority of such single-molecule techniques faces with the problem of low throughput because of their incapability to manipulate more than one investigatory biomolecule at a time. Due to its principle of effective functionality “DNA Curtains” technology, which is meant for protein and DNA interaction studies at a single molecule level, effectively treats the aforementioned problem and grants a possibility to collect a large amount of statistical data during a single experiment. Recently, we have developed a platform of soft “DNA Curtains” that is based on the alternative strategy of immobilization of DNA molecules on the surface. In comparison with the other variants of traditional “DNA Curtains” tool, our experimental platform not only retains high throughput, the main attribute of this technology, but it also has some other important advantages such as low cost, simplicity and technological accessibility. Nevertheless, an efficient practical applicability of our soft “DNA Curtains” is limited by three major drawbacks – insufficient optimization of factors that influence the quality of surface-printed protein lines the most, relatively short duration of immobilization of surface-fixed individual DNA molecules and undefined orientation of biotinylated DNA molecules that are double tethered on the surface. In this work, we improved our technology of soft “DNA Curtains”. By optimizing the printing pressure, which acts during the stage of protein lift-off microcontact printing, employing traptavidin for nanopatterning of chemically modified glass surface and functionalizing the ends of DNA molecules with labels of distinct specificity – biotin and digoxigenin, respectively – we developed longer duration of immobilization of surface-fixed DNA molecules-predetermining and defined orientation of immobilized DNA molecules-ensuring version of our platform – oriented soft “DNA Curtains”. Ultimately, by employing Cas9 endonuclease, we demonstrated that this experimental tool can be successfully implemented in single protein-DNA interaction studies.

PADĖKA

Širdingai dėkoju prof. dr. Virginijui Šikšniui už suteiktą galimybę šį magistro baigiamąjį darbą rengti jo vadovaujamame skyriuje. Esu neapsakomai dėkingas darbo vadovui dr. Mindaugui Zarembai ir konsultantui dr. Marijonui Tutkui už suteiktus vertingus patarimus ir visokeriopą pagalbą, praplėstas profesines žinias, kantrų vadovavimą bei nuoširdų bendravimą. Ačiū VU BTI Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriaus ir FTMC Molekulinių darinių fizikos skyriaus kolektyvams už darbingą ir jaukią atmosferą, šiltą bendravimą ir draugišką aplinką.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Bangalore DM, Tessmer I, Bangalore DM, Tessmer I. Unique insight into protein-DNA interactions from single molecule atomic force microscopy. *AIMS Biophys.* 2018; 5(3):194–216.
2. Barman A, Deb B, Chakraborty S. A glance at genome editing with CRISPR–Cas9 technology. *Curr Genet.* 2020; 66(3):447–62.
3. Chandradoss SD, Haagsma AC, Lee YK, Hwang J-H, Nam J-M, Joo C. Surface Passivation for Single-molecule Protein Studies. *J Vis Exp JoVE.* 2014; (86).
4. Chivers CE, Crozat E, Chu C, Moy VT, Sherratt DJ, Howarth M. A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability. *Nat Methods.* 2010; 7(5):391–3.
5. Chivers CE, Koner AL, Lowe ED, Howarth M. How the biotin–streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochem J.* 2011; 435(Pt 1):55–63.
6. Collins BE, Ye LF, Duzdevich D, Greene EC. Chapter 12 - DNA curtains: Novel tools for imaging protein–nucleic acid interactions at the single-molecule level. In: Waters JC, Wittman T. *Methods in Cell Biology.* Academic Press; 2014. p. 217–34. (Quantitative Imaging in Cell Biology; vol. 123).
7. Cuculis L, Schroeder CM. A Single-Molecule View of Genome Editing Proteins: Biophysical Mechanisms for TALEs and CRISPR/Cas9. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2017; 8(1):577–97.
8. Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R. Chromatin immunoprecipitation assay. *BioTechniques.* 2004; 37(6):961–9.
9. De Tullio L, Kaniecki K, Greene EC. Single-Stranded DNA Curtains for Studying the Srs2 Helicase Using Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Methods Enzymol.* 2018; 600:407–37.
10. Duzdevich D, Redding S, Greene EC. DNA Dynamics and Single-Molecule Biology. *Chem Rev.* 2014; 114(6):3072–86.
11. Farooq S, Fijen C, Hohlbein J. Studying DNA–protein interactions with single-molecule Förster resonance energy transfer. *Protoplasma.* 2014; 251(2):317–32.

12. Fazio T, Visnapuu M-L, Wind S, Greene EC. DNA Curtains and Nanoscale Curtain Rods: High-Throughput Tools for Single Molecule Imaging. *Langmuir*. 2008; 24(18):10524–31.
13. Fazio TA, Lee JY, Wind SJ, Greene EC. Assembly of DNA Curtains Using Hydrogen Silsesquioxane As a Barrier to Lipid Diffusion. *Anal Chem*. 2012; 84(18):7613–7.
14. Finkelstein IJ, Greene EC. Supported Lipid Bilayers and DNA Curtains for High-Throughput Single-Molecule Studies. *Methods Mol Biol Clifton Nj*. 2011; 745:447–61.
15. Finkelstein IJ, Visnapuu M-L, Greene EC. Single-molecule imaging reveals mechanisms of protein disruption by a DNA translocase. *Nature*. 2010; 468(7326):983–7.
16. Fish KN. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Curr Protoc Cytom Editor Board J Paul Robinson Manag Ed Al*. 2009; 0 12:Unit12.18.
17. Gallardo IF, Pasupathy P, Brown M, Manhart CM, Neikirk DP, Alani E, Finkelstein IJ. High-Throughput Universal DNA Curtain Arrays for Single-Molecule Fluorescence Imaging. *Langmuir*. 2015; 31(37):10310–7.
18. Gibb B, Ye LF, Kwon Y, Niu H, Sung P, Greene EC. Protein dynamics during presynaptic-complex assembly on individual single-stranded DNA molecules. *Nat Struct Mol Biol*. 2014; 21(10):893–900.
19. Gidi Y, Bayram S, Ablenas CJ, Blum AS, Cosa G. Efficient One-Step PEG-Silane Passivation of Glass Surfaces for Single-Molecule Fluorescence Studies. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018; 10(46):39505–11.
20. Gorman J, Chowdhury A, Surtees JA, Shimada J, Reichman DR, Alani E, Greene EC. Dynamic Basis for One-Dimensional DNA Scanning by the Mismatch Repair Complex Msh2-Msh6. *Mol Cell*. 2007; 28(3):359–70.
21. Gorman J, Fazio T, Wang F, Wind S, Greene EC. Nanofabricated Racks of Aligned and Anchored DNA Substrates for Single-Molecule Imaging. *Langmuir*. 2010; 26(2):1372–9.
22. Gorman J, Wang F, Redding S, Plys AJ, Fazio T, Wind S, Alani EE, Greene EC. Single-molecule imaging reveals target-search mechanisms during DNA mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci*. 2012; 109(45):E3074–83.
23. Granéli A, Yeykal CC, Prasad TK, Greene EC. Organized Arrays of Individual DNA Molecules Tethered to Supported Lipid Bilayers. *Langmuir*. 2006; 22(1):292–9.
24. Greene EC, Wind S, Fazio T, Gorman J, Visnapuu M-L. DNA Curtains for High-Throughput Single-Molecule Optical Imaging. *Methods Enzymol*. 2010; 472:293–315.

25. Guille MJ, Kneale GG. Methods for the analysis of DNA-protein interactions. *Mol Biotechnol.* 1997; 8(1):35–52.
26. Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, Sen MK, Dey D, Dasgupta A, Kazi TA, Gupta R, Sinharoy S, Acharya K, Chattopadhyay D, Ravichandiran V, Roy S, Ghosh D. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sci.* 2019; 232:116636.
27. Hilario J, Kowalczykowski SC. Visualizing protein–DNA interactions at the single-molecule level. *Curr Opin Chem Biol.* 2010; 14(1):15–22.
28. Hill FR, Monachino E, van Oijen AM. The more the merrier: high-throughput single-molecule techniques. *Biochem Soc Trans.* 2017; 45(3):759–69.
29. Hryhorowicz M, Lipiński D, Zeyland J, Słomski R. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2017; 65(3):233–40.
30. Huang C-J, Zheng Y-Y. Controlled Silanization Using Functional Silatrane for Thin and Homogeneous Antifouling Coatings. *Langmuir.* 2019; 35(5):1662–71.
31. Hughes CD, Simons M, Mackenzie CE, Van Houten B, Kad NM. Single molecule techniques in DNA repair: A primer. *DNA Repair.* 2014; 20:2–13.
32. Isaev AB, Musharova OS, Severinov KV. Microbial Arsenal of Antiviral Defenses – Part I. *Biochem Mosc.* 2021; 86(3):319–37.
33. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys.* 2017; 46:505–29.
34. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science.* 2012; 337(6096):816–21.
35. Kang Y, Cheon NY, Cha J, Kim A, Kim H, Lee L, Kim KO, Jo K, Lee JY. High-throughput single-molecule imaging system using nanofabricated trenches and fluorescent DNA-binding proteins. *Biotechnol Bioeng.* 2020; 117(6):1640–8.
36. Kaur G, Lewis JS, van Oijen AM. Shining a Spotlight on DNA: Single-Molecule Methods to Visualise DNA. *Molecules.* 2019; 24(3):491.
37. Khan S, Mahmood MS, Rahman S ur, Zafar H, Habibullah S, khan Z, Ahmad A. CRISPR/Cas9: the Jedi against the dark empire of diseases. *J Biomed Sci.* 2018; 25.
38. Kim D, Rashid F, Cho Y, Zaher MS, Cho IHH, Hamdan SM, Jeong C, Lee J-B. DNA skybridge: 3D structure producing a light sheet for high-throughput single-molecule imaging. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(18):e107–e107.

39. Kim Y, de la Torre A, Leal AA, Finkelstein IJ. Efficient modification of λ -DNA substrates for single-molecule studies. *Sci Rep.* 2017; 7(1):2071.
40. Kopūstas A, Ivanovaitė Š, Rakickas T, Pocevičiūtė E, Paksaitė J, Karvelis T, Zaremba M, Manakova E, Tutkus M. Oriented Soft DNA Curtains for Single-Molecule Imaging. *Langmuir.* 2021; 37(11):3428–37.
41. Krepel D, Gomez D, Klumpp S, Levy Y. Mechanism of Facilitated Diffusion during a DNA Search in Crowded Environments. *J Phys Chem B.* 2016; 120(43):11113–22.
42. Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5(1):1–23.
43. Ma CJ, Steinfeld JB, Greene EC. Single-Stranded DNA Curtains for Studying Homologous Recombination. *Methods Enzymol.* 2017; 582:193–219.
44. Martens KJA, van Beljouw SPB, van der Els S, Vink JNA, Baas S, Vogelaar GA, Brouns SJJ, van Baarlen P, Kleerebezem M, Hohlbein J. Visualisation of dCas9 target search in vivo using an open-microscopy framework. *Nat Commun.* 2019; 10.
45. Miller H, Zhou Z, Shepherd J, Wollman AJM, Leake MC. Single-molecule techniques in biophysics: a review of the progress in methods and applications. *Rep Prog Phys.* 2017; 81(2):024601.
46. Mohapatra S, Lin C-T, Feng XA, Basu A, Ha T. Single-Molecule Analysis and Engineering of DNA Motors. *Chem Rev.* 2020; 120(1):36–78.
47. Monico C, Capitanio M, Belcastro G, Vanzi F, Pavone FS. Optical Methods to Study Protein-DNA Interactions in Vitro and in Living Cells at the Single-Molecule Level. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(2):3961–92.
48. Neuman KC, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods.* 2008; 5(6):491–505.
49. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell.* 2014; 156(5):935–49.
50. Park S, Lee O, Durang X, Jeon J-H. A mini-review of the diffusion dynamics of DNA-binding proteins: experiments and models. *J Korean Phys Soc.* 2021; 78(5):408–26.
51. Park SR, Hauver J, Zhang Y, Revyakin A, Coleman RA, Tjian R, Chu S, Pertsinidis A. A Single-Molecule Surface-Based Platform to Detect the Assembly and Function of the

- Human RNA Polymerase II Transcription Machinery. *Structure*. 2020; 28(12):1337-1343.e4.
52. Poulter NS, Pitkeathly WTE, Smith PJ, Rappoport JZ. The physical basis of total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy and its cellular applications. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2015; 1251:1–23.
 53. Qi Z, Greene EC. Visualizing recombination intermediates with single-stranded DNA curtains. *Methods San Diego Calif*. 2016; 105:62–74.
 54. Reck-Peterson SL, Derr ND, Stuurman N. Imaging single molecules using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Cold Spring Harb Protoc*. 2010; 2010(3):pdb.top73.
 55. Robison AD, Finkelstein IJ. Rapid Prototyping of Multichannel Microfluidic Devices for Single-Molecule DNA Curtain Imaging. *Anal Chem*. 2014a; 86(9):4157–63.
 56. Robison AD, Finkelstein IJ. High-Throughput Single-Molecule Studies of Protein-DNA Interactions. *FEBS Lett*. 2014b; 588(19):3539–46.
 57. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014; 2014(10):pdb.top071795.
 58. Schneckenburger H. Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2005; 16(1):13–8.
 59. Shashkova S, Leake MC. Single-molecule fluorescence microscopy review: shedding new light on old problems. *Biosci Rep*. 2017; 37(4).
 60. Shlyakhtenko LS, Gall AA, Lyubchenko YL. Mica Functionalization for Imaging of DNA and Protein-DNA Complexes with Atomic Force Microscopy. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013; 931.
 61. Silverstein TD, Gibb B, Greene EC. Visualizing Protein Movement on DNA at the Single-molecule Level using DNA Curtains. *DNA Repair*. 2014; 20:94–109.
 62. Singh D, Sternberg SH, Fei J, Doudna JA, Ha T. Real-time observation of DNA recognition and rejection by the RNA-guided endonuclease Cas9. *Nat Commun*. 2016; 7.
 63. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014; 507(7490):62–7.
 64. Swartjes T, Staals RHJ, van der Oost J. Editor's cut: DNA cleavage by CRISPR RNA-guided nucleases Cas9 and Cas12a. *Biochem Soc Trans*. 2020; 48(1):207–19.

65. Szczelkun MD, Tikhomirova MS, Sinkunas T, Gasiunas G, Karvelis T, Pschera P, Siksnys V, Seidel R. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. *Proc Natl Acad Sci.* 2014; 111(27):9798–803.
66. Takahashi S, Oshige M, Katsura S. DNA Manipulation and Single-Molecule Imaging. *Molecules.* 2021; 26(4).
67. Tinoco I, Gonzalez RL. Biological mechanisms, one molecule at a time. *Genes Dev.* 2011; 25(12):1205–31.
68. Toomre D. Cellular imaging using total internal reflection fluorescence microscopy: theory and instrumentation. *Cold Spring Harb Protoc.* 2012; 2012(4):414–24.
69. Tutkus M, Rakickas T, Kopūstas A, Ivanovaitė Š, Venckus O, Navikas V, Zaremba M, Manakova E, Valiokas R. Fixed DNA Molecule Arrays for High-Throughput Single DNA–Protein Interaction Studies. *Langmuir.* 2019; 35(17):5921–30.
70. Visnapuu M-L, Fazio T, Wind S, Greene EC. Parallel Arrays of Geometric Nanowells for Assembling Curtains of DNA with Controlled Lateral Dispersion. *Langmuir.* 2008; 24(19):11293–9.
71. Visnapuu M-L, Greene EC. Single-molecule imaging of DNA curtains reveals intrinsic energy landscapes for nucleosome deposition. *Nat Struct Mol Biol.* 2009; 16(10):1056–62.
72. Wang F, Redding S, Finkelstein IJ, Gorman J, Reichman DR, Greene EC. The promoter-search mechanism of Escherichia coli RNA polymerase is dominated by three-dimensional diffusion. *Nat Struct Mol Biol.* 2013; 20(2):174–81.
73. Wazawa T, Ueda M. Total internal reflection fluorescence microscopy in single molecule nanobioscience. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2005; 95:77–106.
74. Wilkinson RA, Martin C, Wiedenheft B. CRISPR RNA-guided autonomous delivery of Cas9. *Nat Struct Mol Biol.* 2019; 26(1):14–24.
75. Xue C, Daley JM, Xue X, Steinfeld J, Kwon Y, Sung P, Greene EC. Single-molecule visualization of human BLM helicase as it acts upon double- and single-stranded DNA substrates. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(21):11225–37.
76. Zhao D, Liu S, Gao Y. Single-molecule manipulation and detection. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2018; 50(3):231–7.