



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Monika Roliūtė

**Fluorescencinis DNR žymėjimas ir vaizdinimas gyvose ląstelėse
pritaikant CRISPR-Cas sistemą**

Magistro baigiamasis darbas

Biochemijos studijų programa

Darbo vadovas

Dr. Marijonas Tutkus

Darbo konsultantas

Dokt. Aurimas Kopūstas

Darbas atliktas

Biotechnologijos instituto baltymų-nukleorūgščių
sąveikos tyrimų skyriuje

Fluorescencinis DNR žymėjimas ir vaizdinimas gyvose ląstelėse pritaikant CRISPR-Cas sistemą

Mokslinio darbo projektas rengtas baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriuje

Monika Roliūtė



Mokslinio darbo projekto vadovas

Dr. Marijonas Tutkus



Turinys

Santrumpos	5
Įvadas.....	6
1. Literatūros apžvalga.....	7
1.1. Chromatinas, jo struktūra ir funkcija	7
1.2. Klasikiniai chromatino tyrimų metodai	8
1.2.1. FISH paremti metodai	9
1.3. Šiuolaikiniai chromatino tyrimų metodai	11
1.3.1. Fluorescencinė represoriaus-operatoriaus sistema.....	11
1.3.2. ANCHOR sistema.....	12
1.3.3. ZF motyvai ir TALE baltymai	12
1.3.4. CRISPR-Cas sistema	13
1.4. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , kaip modelinė sistema chromatino tyrimams.....	14
1.4.1. <i>S. pombe</i> chromatino ir chromosomų struktūra.....	14
1.4.2. <i>S. pombe</i> šiuolaikiniai chromatino tyrimų metodai.....	15
1.5. Fluorescencinė mikroskopija	16
1.5.1. Fluorescenciniai zondai.....	16
1.5.2. Iššūkiai fluorescencinės mikroskopijos tyrimuose gyvoje biologinėse sistemose	17
2. Medžiagos ir metodai.....	20
2.1. Medžiagos.....	20
2.2. Metodai	24
2.2.1. <i>S. pombe</i> integratyvinio vektoriaus konstravimas	24
2.2.2. Mielių vektoriaus integracija į genomą.....	25
2.2.3. Mielių genominės DNR skyrimas	25
2.2.4. ADH1 promotoriaus keitimas į ADH81 (pMR6 plazmidės konstravimas)	25
2.2.5. GFP ₁₁ ×7 suliejimas su dFnCas12a (pMR7 ir pMR8 plazmidžių konstravimas)	26
2.2.6. crRNR koduojančios kasetės įklonavimas į pMR7, pMR8 ir pMR13 plazmidės	26
2.2.7. ADH1 promotoriaus keitimas į nmt81	27
2.2.8. Vektorių elektroporacija į <i>S. pombe</i> ląsteles	27
2.2.9. <i>S. pombe</i> ląstelių paruošimas mikroskopijai.....	27
2.2.10. C2566 kamieno vaizdinimas.....	28
2.2.11. <i>S. pombe</i> ląstelių branduolių, su būdingu vizualiu fluorescenciniu taškelio, analizė	28
2.2.12. <i>S. pombe</i> ląstelių fluorescencinio taškelio signalo-fono santykio analizė	28
2.2.13. <i>E. coli</i> augimo ribojimo eksperimentai	29
2.2.14. <i>E. coli</i> plazmidinių vektorių konstravimas	29
2.2.15. <i>E. coli</i> cheminė transformacija	30

2.2.16. <i>E. coli</i> mikroskopija.....	30
3. Rezultatai	32
3.1. <i>S. pombe</i> genominės DNR fluorescencinio žymėjimo optimizacija	32
3.2. dFnCas12a-GFP _{11x7} nutaikymas į FROS sistemos pasikartojančias sekas.....	37
3.3. CRISPR-Cas komplekso disociacijos moduliavimas <i>E. coli</i> ląstelėse	41
3.4. Rezultatų aptarimas	46
Išvados	51
SANTRAUKA	52
ABSTRACT	53
Autoriaus asmeninis indėlis.....	54
Padėka	55
Literatūros šaltiniai	56

Santrumpos

CRISPR-Cas	angl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated</i>
crRNR	CRISPR RNR
E2C	E2 Crimson
FISH	Fluorescencinė <i>in situ</i> hibridizacija
FROS	Fluorescencinė represoriaus – operatoriaus sistema
LAD	Su lamina asocijuotas domenas
OD	Optinis tankis
PAM	Su protoskirtuku asocijuotas motyvas
PNA	Peptidų nukleorūgštys
RNP	Ribonukleoproteinas
sgRNR	viena gidinė RNR, angl. <i>single guide RNA</i>
TAD	Topologiškai asocijuotas domenas
TALE	Į transkripcijos aktyvatorių panašūs efektoriniai baltymai
TFO	Tripleksą formuojantys oligonukleotidai
TIRF	Visiško vidaus atspindžio fluorescencinė mikroskopija
ZF	Cinko pirštas

Ivadas

Gyvybė yra nepaprastai kompleksiška, heterogeniška ir nuolat kintanti. Paprasčiausias gyvybės vienetas yra ląstelė, būdinga visoms gyvosioms biologinėms sistemoms, kurios pasižymi funkine ir struktūrine įvairove. Visgi visas gyvąsias sistemas sieja tos pačios savybės – gebėjimas vystytis, augti, daugintis, prisitaikyti prie aplinkos ir vykdyti medžiagų apykaitą. Ląstelės gali egzistuoti tiek kaip vienaląsčiai autonominiai organizmai, tiek daugialąsčiuose organizmuose vystymosi metu specializuotis ir prisitaikyti atlikti specifinę funkciją. Nors ir ląstelių įvairovė didelė, už visų ląstelinių procesų slypi biologinės makromolekulės – baltymai, angliavandeniai, nukleorūgštys ir lipidai. Šios molekulės sąveikaudamos viena su kita sudaro ląstelės struktūrinį ir funkcinį pagrindą. Baltymai yra svarbi ląstelės funkcinio pagrindo dalis – jie veikia kaip fermentai, katalizuojantys chemines reakcijas, ir atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant genų raišką. Šių ląstelei svarbių biomolekulių sintezei yra reikalinga DNR seka. Prokariotinių organizmų genetinė medžiaga dažniausiai yra vienoje žiedinėje DNR molekulėje, nukleoide, kuris nėra atskirtas nuo ląstelės citoplazmos. Eukariotiniuose organizmuose genetinė medžiaga randama linijinėse DNR molekulėse, kurių skaičius priklauso nuo organizmo rūšies. Eukariotinės chromosomos yra išsidėsčiusios branduolyje. Chromosomoms yra būdingas didelis struktūrinis kompleksškumas. Chromosomų struktūra ir dinamika yra susiję procesai. Nors chromosomų dinamika gyvose ląstelėse jau buvo tyrinėta, tyrimai apsiriboja vienu arba, daugiausiai, dviem lokusais. Kaip viena iš daugelio tokių tyrimų trūkumo pasekmių yra tai, kad vis dar nesuprantame, kaip chromosomų dinamika reguliuoja genų raišką ir kaip ji kinta priklausomai nuo skirtingų aplinkos sąlygų, ląstelių diferenciacijos stadijos ir kt. Taigi, chromatino dinamikos tyrimai išlieka aktualiu tyrimų kryptis.

Darbo tikslas: Pritaikyti CRISPR-Cas12a sistemą gyvų *Schizosaccharomyces pombe* ląstelių chromatino fluorescenciniam žymėjimui ir pradėti CRISPR-Cas sistemos pritaikomumo super rezoliucijos PAINT vaizdinimui tyrimus.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti dFnCas12a-GFP_{11×7} baltymo-RNR komplekso pritaikomumą *S. pombe* pavienių genomo lokusų žymėjimui.
2. Nukreipti dFnCas12a-GFP_{11×7} baltymo-RNR kompleksą į *S. pombe* fluorescencinės represoriaus-operatoriaus sistemos pasikartojančias sekas.
3. Pritaikyti CRISPR-Cas sistemą *E. coli* plazmidinės DNR žymėjimui ir paruošti sistemą tolimesnei PAINT mikroskopijai.

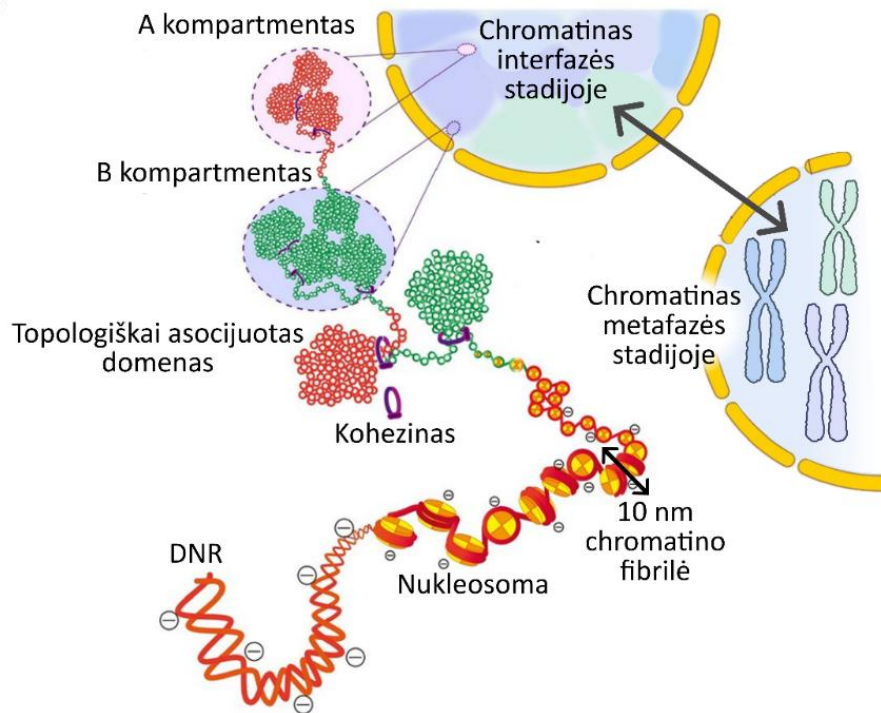
1. Literatūros apžvalga

1.1. Chromatinas, jo struktūra ir funkcija

Eukariotinių organizmų chromosomas sudaro chromatinas – nukleorūgščių ir baltymų kompleksas. Pagrindinės chromatino funkcijos yra sukompaktizuoti genetinę informaciją, palaikyti genomo stabilumą ir reguliuoti DNR sekų prieinamumą.

Chromatino struktūra, pagal kompaktizacijos lygį yra skirstoma į tris lygmenis. Pirminę chromatino struktūrą sudaro DNR, apsivijusi aplink histoninius baltymus. Histonai H2A, H2B, H3 ir H4 sudaro oktamerinį šerdies kompleksą, aplink kurį apsivynioja 146 bp ilgio DNR seka – chromatino struktūrinis vienetas vadinamas **nukleosoma** (Luger et al., 1997; Leuba et al., 1994). Pirminė chromatino struktūra suformuoja **~10 nm diametro fibriles**, kurios toliau gali susikompaktizuoti pagal zigzago arba selenoido modelius ir sudaryti antrinę chromatino struktūrą – **~30 nm diametro fibriles** (Thoma et al., 1979; Robinson et al., 2006). Tolimesnė chromatino kompaktizacija, tretinė struktūra ir chromatino dinamika priklauso nuo ląstelės dalijimosi fazės.

Ląstelės dalijimosi ciklo mitozės metafazės stadijoje chromatino kompaktizacijos lygis yra didžiausias, o tam reikalingi papildomi nehistoniniai baltymai kaip kondensinas, topoizomerasė IIα ir KIF4 (Earnshaw et al., 1985; Mazumdar et al., 2004; Samejima et al., 2012; Poonperm et al., 2015). Tuo tarpu interfazės stadijoje chromatinas yra mažiau kompaktizuotas ir pasiskirstęs viso branduolio tūryje. Nepaisant to, chromatinui taip pat yra būdinga kompaktizacija, kurios metu **~10 nm diametro fibrilės formuoja DNR kilpas** (Rao et al., 2014) (1.1 pav.). DNR kilpų susiformavimui yra reikalingas žiedo formos baltymų kompleksas – kohezinas. Šis kompleksas dinamiškai jungiasi prie DNR ir tuomet DNR juda pro kohezino kompleksą sudarydama kilpos formos tretinę struktūrą, iki kol yra pasiekiami CTCF baltymai. Šie baltymai atpažįsta ir specifiskai jungiasi prie 5'-CCCTC-3' DNR sekų (Fudenberg et al., 2016). Tokia 3D chromatino organizacija suartina toli vienas nuo kito išsidėsčiusius DNR lokusus. Tai pasitarnauja įvairiems procesams, kurie kitu atveju vyktų lėčiau arba išvis nevyktų. Pavyzdžiui, genų raiškos reguliacija yra pasiekama, kai toli esantys reguliatoriniai DNR elementai, tokie kaip enhanseriai ar represoriai, suartėja su genų promotorių sritimis. Tokios lokaliai išsidėsčiusios kilpos erdviškai sudaro struktūras, vadinamas **topologiškai asocijuotais domenais** (TAD), kurių ribose yra gausu kohezinų ir CTCF baltymų. Branduolyje TAD vienetai sudaro **branduolio kompartmentus**. O kompartmentai išsidėsto šalia vienas kito ir sudaro **chromosomų teritorijas** (Meaburn et al., 2007). Visgi kiekvienos chromosomos organizacija branduolyje yra ne atsitiktina. Buvo pastebėta, kad šalia branduolio laminos, periferijoje, lokalizuotas chromatinas yra labiau kondensuotas ir transkripciškai neaktyvus. Tokį chromatiną sudaro su lamina asocijuoti domenai (LAD) – B kompartmentas. Atitinkamai, arčiau branduolio vidurio išsidėstęs chromatinas yra sudarytas iš TAD vienetų, o transkripcija nuo jo vyksta aktyviau – A kompartmentas (Luperchio et al., 2017).



1.1 pav. Aukštesniųjų eukariotinių organizmų genomo chromatino organizacija. Modifikuota pagal Hansen et al., 2021.

Chromatino struktūra yra susijusi su esminiais procesais ląstelėse, tokiais kaip genų raiška (Boettiger et al., 2016), DNR replikacija (Aze et al., 2016), DNR pažeidų taisymas (Seeber et al., 2013). Šių procesų reguliacijai yra svarbūs chromatino dinaminiai ir struktūriniai pokyčiai, kurių atsiradimui yra reikalingi chromatino remodeliavimo veiksniai. Šie veiksniai, priklausantys tokioms šeimoms kaip SWI/SNF, INO80 gali keisti nukleosomų pozicijas, pašalinti jas ir padidinti DNR sekos judrumą ir prieinamumą transkripcijos faktoriams. Kiti veiksniai gali modifikuoti histonus, prie jų prijungiant metilo, acetilo, fosfato ar kitas grupes. Visa tai yra glaudžiai susiję ne tik su chromatino funkcijų reguliacija, bet ir su chromatino dinamika. Buvo parodyta, kad chromatino struktūriniai pokyčiai keičia chromosomų dinamiką. Pavyzdžiui, susidarius keliems DNR grandinės dvigrandiniams trūkiams, histonų kiekis ląstelėse gali sumažėti net 20-40%, dėl ko padidėja globali chromosomų dinamika (Hauer et al., 2017). Chromatiną supanti aplinka taip pat daro įtaką nukleosomų dinamikai. Buvo pastebėta, kad DNR gali spontaniškai išsivynioti iš nukleosomos komplekso (Li et al., 2005), o šiam procesui didelę reikšmę turi tirpalo joninė jėga (Davey et al., 2002).

1.2. Klasikiniai chromatino tyrimų metodai

Chromatino dinamikos pokyčiai gali būti stebimi tokių procesų metu, kaip DNR transkripcija, replikacija, reparacija. Vykstant šiems procesams, dinamiška chromatino struktūra yra modifikuojama chromatino remodeliavimo faktorių. Keičiasi ne tik chromatino struktūra, bet ir DNR-baltymų ir

baltymų-baltymų sąveikos. Chromatino struktūros ir dinamikos tyrimai gali padėti geriau suprasti fundamentinius procesus ir chromatino organizaciją branduolyje priklausomai nuo ląstelės tipo, diferenciacijos ar senėjimo, ligos vystymosi stadijos. Chromatino dinamikos tyrimai taip pat gali leisti tyrinėti dvigrandininių trūkių įvedimą ir atsistatymą realiu laiku. Pavyzdžiui, genome dvigrandininiai trūkiai gali atsirasti dėl fizinių veiksnių, tokių kaip jonizuojančioji spinduliuotė (Vignard et al., 2013) ar cheminių veiksnių, tokių kaip zeocinas, bleomicinas. Be to, genomo redagavimo įrankiai, tokie kaip CRISPR-Cas sistema, taip pat gali įvesti dvigrandininį trūkį DNR taikininėje sekoje. Visgi šie genų inžinerijos įrankiai nėra tikslūs (Zhang et al., 2015), todėl gali būti atpažįstamos netaikininės sekos. Netaikininis dvigrandininių trūkių įvedimas sutrikdo genomo integralumą, todėl padidėja chromosomų aberacijų, kaip inversija, translokacija, delecija, tikimybė. Buvo pastebėta, kad net ir tokie trūkiai, kurie yra įvedami taikininėje DNR, gali sukelti chromosomų aberacijas (Turchiano et al., 2021). Vis dar neaišku, kaip tai paveikia tolimesnių ląstelių kartų chromatino organizaciją ir dinaminį procesus. Norint sekti tokius pokyčius realiu laiku gyvose ląstelėse, būtina pritaikyti vaizdinimo metodus, kurie leistų stebėti chromatino organizaciją gyvose sistemose.

Didžioji dalis klasikinių chromatino organizacijos ir dinamikos tyrimų remiasi fluorescenciniais dažikliais ar baltymais, kurie tolimesniuose etapuose yra vaizdinami, pasitelkiant fluorescencinę mikroskopiją. Su DNR struktūra sąveikaujančių fluorescencinių dažiklių pritaikymas yra vienas paprasčiausių būdų vizualizuoti visą nukleorūgštį. Be to, yra tokių dažiklių, kurie gali difunduoti pro ląstelės membraną, todėl jų pristatymas į ląsteles yra nesudėtingas. Pavyzdžiui, Hoechst grupės dažikliai, kaip Hoechst 33258 ir Hoechst 33342 sąveikauja su adeninu ir timinu turtingu DNR regionu, esančiu mažajame DNR griovyje (Pjura et al., 1987). Tačiau šių dažiklių sužadinimui yra reikalinga UV spinduliuotė (~360 nm), todėl pasireiškia fototoksiškumas ląstelėms (Durand & Olive, 1982). Tuo tarpu, SiR-Hoechst, modifikuotas Hoechst 33342 dažiklio variantas, pasižymi žymiai mažesniu fototoksiškumu dėl savo gebėjimo būti sužadinamam ilgesnio bangos ilgio raudonojo spektro šviesa (~640 nm) (Lukinavičius et al., 2015). Šis dažiklis buvo pritaikytas tiriant chromatino tankį ir dinamiką skirtinguose branduolio srityse (Shaban et al., 2020).

Alternatyvūs metodai remiasi genų inžinerija ir histoninių baltymų suliejimu su fluorescenciniais baltymais (Kanda et al., 1998). Tačiau tiek fluorescencinių dažiklių, tiek histonų žymėjimo metodai neleidžia aptikti ir tirti pavienių tikslinių DNR lokusų dinamikos. Todėl yra reikalingi kitokie universalūs metodai, kurie leistų tyrinėti specifines DNR sritis.

1.2.1. FISH paremti metodai

Prie anksčiausiai pradėtų taikyti klasikinių metodų yra priskiriama chromosomų konformacijos fiksavimas (angl. *chromosome conformation capture*, 3C) ir fluorescencinė *in situ* hibridizacija (angl. *fluorescence in situ hybridization*, FISH). Klasikinio FISH metodo metu yra naudojamos fiksuotos

ląstelės (Bauman et al., 1980). DNR molekulių žymėjimas ir detekcija remiasi fluorescenciškai žymėtais DNR oligonukleotidais (1.2A pav.). Šie zondai yra komplementarūs taikininei sekai ir po DNR denatūracijos etapo fiksuotoje ląstelėje, šie zondai hibridizuojasi prie jiems komplementarių genomo lokusų (Pardue et al., 1969). Alternatyviame imuno-FISH metode (Im et al., 2019) fluorescenciškai žymėti antikūnai yra naudojami pažymėti DNR seką (1.2C pav.) arba su DNR seka sąveikaujančius baltymus, dažnai histonus (1.2B pav.). Imuno-FISH metodas yra naudingas siekiant amplifikuoti fluorescencinį signalą ir leidžia nustatyti genų lokalizaciją branduolyje, įvertinti jų kopijų skaičių bei aptikti tam tikras chromosomų aberacijas.

FISH paremti metodai



1.2 pav. FISH metodo scheminė reprezentacija. Modifikuota pagal Lacen et al., 2024.

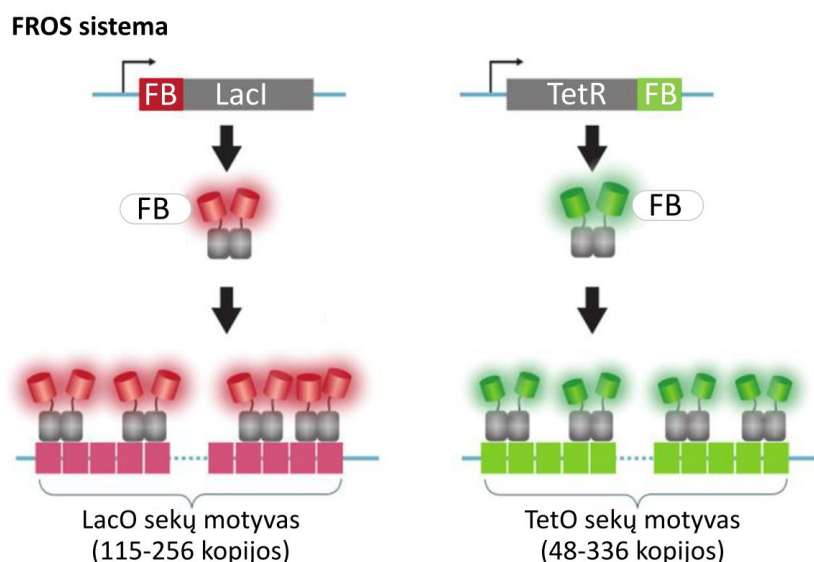
Vienas iš klasikiniame FISH metodui būdingų trūkumų yra DNR cheminis arba terminis denatūracijos etapas. Tokiu būdu yra suardoma antrinė DNR struktūra, o tai gali lemti rezultatų iškraipymus. Šiai problemai išspręsti yra pasitelkiamos peptidų nukleorūgštys (angl. peptide nucleic acids, PNA) arba DNR tripleksą formuojantys viengrandiniai DNR oligonukleotidai. Šie fluorescenciškai žymėti zondai sąveikauja su didžiuoju DNR grioviu, sudarydami Hugstino bazių poras (angl. *Hoogsteen base pairs*) su DNR molekulės polipurinine-polipirimidinine sritimi (Hoogsteen et al., 1959). Atitinkamai, PNA jungiasi prie taikininės DNR, sudarydamos vandenilinius ryšius su šios grandinės bazėmis ir taip išstumdamos taikininei DNR komplementarią grandinę. PNA zondai turi didesnę giminingumą DNR molekulei, nei kita, jai komplementari, DNR molekulė (Ratilainen et al., 2000). Be to, PNA, skirtingai nei DNR, yra būdingas pseudopeptido polimero karkasas, kuris prisideda prie šių zondu didesnio stabilumo ląstelinėje aplinkoje. Tripleksą formuojančių oligonukleotidų (TFO) ar PNA taikymas FISH metodo metu leidžia išvengti DNR grandinės denatūracijos. DNR struktūra yra išlaikoma natyvi, tačiau net ir šie metodai turi trūkumų, kaip dėl ląstelinių endo/egzonukleazių veiklos, nedidelis TFO zondu stabilumas *in vivo* sistemose, PNA sudėtingas pristatymas į ląsteles ar šių zondu apribotas nutaikymo į tam tikras genomo sekas pasirinkimas.

1.3. Šiuolaikiniai chromatino tyrimų metodai

Aptarti klasikiniai metodai leidžia tyrinėti chromatino organizaciją *post factum*, todėl yra apribotas nepertraukiamas dinamikos vaizdinimas realiu laiku. Tam gali būti pritaikomi šiuolaikiniai fluorescencinės mikroskopijos vaizdinimo metodai, kaip STORM, PAINT, PALM ar kiti aukštos skiriamosios rezoliucijos fluorescencinė mikroskopijos metodai kartu su pažangiais molekuliniiais įrankiais, pritaikytais tiksliniams chromatino lokusams žymėti ir detektuoti, tokiais kaip CRISPR-Cas (angl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated protein*) sistema. Didelis privalumas yra, jog ši sistema bei kitos panašios sistemos gali būti pritaikomos nefiksuotų (gyvų) ląstelių chromatino fluorescenciniam žymėjimui.

1.3.1. Fluorescencinė represoriaus-operatoriaus sistema

Fluorescencinė represoriaus-operatoriaus sistema (angl. *Fluorescent Repressor-Operator System*, FROS) remiasi daugelio operatoriaus sekų integracija į genomą. Šias sekas atpažįsta ir su jomis sąveikauja fluorescenciškai žymėtas represoriaus baltymas (1.3 pav.).



1.3 pav. FROS sistemos scheminė reprezentacija. Modifikuota pagal Viushkov et al., 2022.

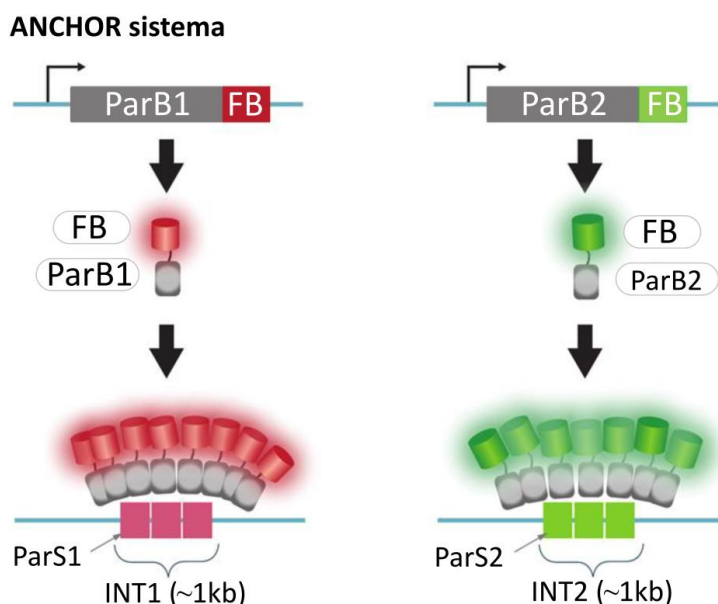
Pirmą kartą ši sistema, paremta LacO ir GFP-LacI sąveika, buvo pritaikyta gyvoje *S. cerevisiae* mielių ir žinduolių CHO ląstelėse (Robinett et al., 1996). Šių tyrimų metu buvo bandyta į mielių ląstelių geno viena lokusą integruoti $256 \times LacO$ pasikartojimus. Tokiame kaminiame, vykdamas GFP-LacI raišką, buvo stebimas ryškus, aukšto kontrasto difrakcija apribotas fluorescencinis taškelis branduolio plote, kurio bendra fluorescencija yra padidėjusi dėl laisvai difunduojančių GFP-LacI baltymų. Šiai žymėjimo strategijai yra svarbus žemas branduolio fluorescencinis fonas (žema GFP-LacI raiška), kad išgauti aukštą taškelių kontrastą (Du et al., 2019). Fluorescenciniam genomines DNR žymėjimui taip pat buvo pritaikyta $336 \times TetO$ pasikartojimų ir TetR-GFP sąveika (Michaelis et al., 1997). Kitų organizmų, kaip *Pseudomonas putida*, *cuO* operatoriaus seka ir fluorescenciškai žymėtas CymR

represorius (Alexander et al., 2019) bei lambda bakteriofago koduojami λO ir λcI (Lassadi et al., 2015) taip pat gali būti pritaikomi FROS sistemai. Daugiaspalvis žymėjimas gali būti pasiekiamas tuo pačiu metu pritaikant kelias skirtingas represoriaus-operatoriaus sistemas.

1.3.2. ANCHOR sistema

Bakterijų chromosomų ir plazmidžių segregacija remiasi ParABS sistema. Ją sudaro *ParS* DNR seka, kuri funkcinio požiūriu primena centromerą. *ParS* seką atpažįsta ParB baltymai. ParB sąveikauja ne tik su DNR seka, bet ir su kitais ParB baltymais, oligomerizuojasi ir sudaro multimerinius kompleksus (Graham et al., 2014; Sanchez et al., 2015).

Ši sistema gali būti pritaikyta pavienių chromatinio lokusų fluorescenciniam žymėjimui. Jos veikimo principas yra panašus į FROS sistemą. Abiem atvejais į genomą reikia integruoti DNR seką, tačiau šiuo atveju fluorescencinio signalo aukštas kontrastas yra ne dėl ilgo pasikartojančių sekų regiono, bet dėl fluorescenciniais baltymais pažymėtų ParB baltymų oligomerizacijos (1.4 pav.).



1.4 pav. ANCHOR sistemos scheminė reprezentacija. INT1/INT2 vaizduoja į genomą integruotą *ParS1/ParS2* sekų lokusą. Modifikuota pagal Viushkov et al., 2022.

ANCHOR sistema buvo pritaikyta specifinių DNR lokusų vaizdinimui gyvose ląstelėse: dvigrandinių trūkių įvedimui ir atsistatymui (Saad et al., 2014), *CCND1* geno lokalizacijai žmogaus ląstelių branduolyje (Germier et al., 2017), enhanserio ir promotoriaus sąveikų tyrimams *Drosophila melanogaster* embriono ląstelėse (Chen et al., 2018) ir kt.

1.3.3. ZF motyvai ir TALE baltymai

Pažangesni metodai, nereikalaujantys DNR sekų integracijos į genomą, pagrįsti specifinių DNR sekų atpažinimu. Tam gali būti taikomi molekuliniai įrankiai, tokie kaip cinko piršto (angl. *Zinc Finger*, ZF) domenai ar į transkripcijos aktyvatorių panašūs efektoriniai (TALE) baltymai.

Vienas Cys₂His₂ ZF domenas sudarytas iš 30 aminorūgščių ir atpažįsta trijų bazių porų ilgio seką, esančią didžiajame DNR griovyje (Fairall ir kt., 1993). Siekiant atpažinti ilgesnę DNR seką, keli ZF domenai, su jiems būdingu specifiškumu, gali būti suliejami lanksčia jungtimi. Buvo parodyta, kad ZF domenų suliejimas su fluorescenciniu baltymu leidžia žymėti ir vizualizuoti pasikartojančias DNR sekas genome, pavyzdžiui, išsidėsčiusias centromeriniuose regionuose (Lindhout et al., 2007).

TALE baltymai taip pat gali būti pritaikomi specifinių DNR sekų atpažinimui ir jų fluorescenciniam žymėjimui. Skirtingai nuo ZF motyvų, 33-35 aminorūgščių ilgio TALE motyvai specifiškai atpažįsta tik vieną o ne tris nukleotidus (Boch et al., 2009; Moscou & Bogdanove, 2009). Dėl šios priežasties šie baltymai gali būti pritaikyti specifiškai atpažinti bet kokią seką genome. TALE įrankiai yra tinkami pasikartojančių sekų, esančių telomerinėse ar centromerinėse srityse, vaizdinimui bei jų dinamikos tyrimams (Ma et al., 2013; Miyanari et al., 2013).

Nors šie metodai tinkami pasikartojančių sekų fluorescenciniam žymėjimui, jų pritaikymą riboja sudėtingas dizainas ir konstravimas. Be to, dėl silpno fluorescencinio signalo, jie yra sunkiau pritaikomi pavienių lokusų žymėjimui genome.

1.3.4. CRISPR-Cas sistema

CRISPR-Cas yra bakterijoms ir archėjoms būdinga adaptyvaus imuniteto antivirusinė sistema. Pagal efektorinių baltymų skaičių, ši sistema yra skirstoma į dvi klases (Koonin et al., 2017). Skirtingai nuo 1-os klasės, 2-ai klasei yra būdingas tik vienas efektorinis baltymas (Makarova et al., 2015). Efektoriniai baltymai sąveikauja su nukreipiančiąja CRISPR RNR (crRNR) molekule. Susidaręs Cas baltymo-ribonukleorūgšties kompleksas yra nukreipiamas link DNR sekos, kur pagal komplementarumo principą sąveikauja su taikinine DNR seka, esančia šalia su protoskirtuku asocijuoto motyvo (angl. *protospacer adjacent motif*, PAM).

Keičiant crRNR seką, Cas baltymai gali būti nesudėtingai perprogramuojami atpažinti bet kurią taikininės DNR seką. II ir V tipo efektorinio baltymo-nukleorūgšties kompleksas atpažinęs PAM seką, su taikiniu sąveikauja susidarant R kilpai ir RNR-DNR heterodupleksui. Tai lemia efektorinio baltymo konformacijos pokytį, dėl ko, tikslinėje srityje yra įvedamas DNR dvigrandininis trūkis.

Cas12 šeimos ir Cas9 baltymų katalitinio centro taškiniai mutantai yra praradę endonukleazinį aktyvumą, bet nepraradę gebėjimo sąveikauti su taikinine DNR seka (Qi et al., 2013; Yamano et al., 2016). Tolimesnis katalitiškai neaktyvių Cas baltymų suliejimas fluorescenciniais baltymais, ankstyvųjų tyrimų metu, leido juos pritaikyti telomerų vaizdinimui bei pavienių genomo lokusų žymėjimui žmogaus ląstelėse (Chen et al., 2013). Buvo parodyta, kad pavienių lokusų efektyviam žymėjimui yra reikalingas dCas9-eGFP nutaikymas į bent 26-36 skirtingas taikines DNR žmogaus ląstelėse.

1.4. *Schizosaccharomyces pombe*, kaip modelinė sistema chromatino tyrimams

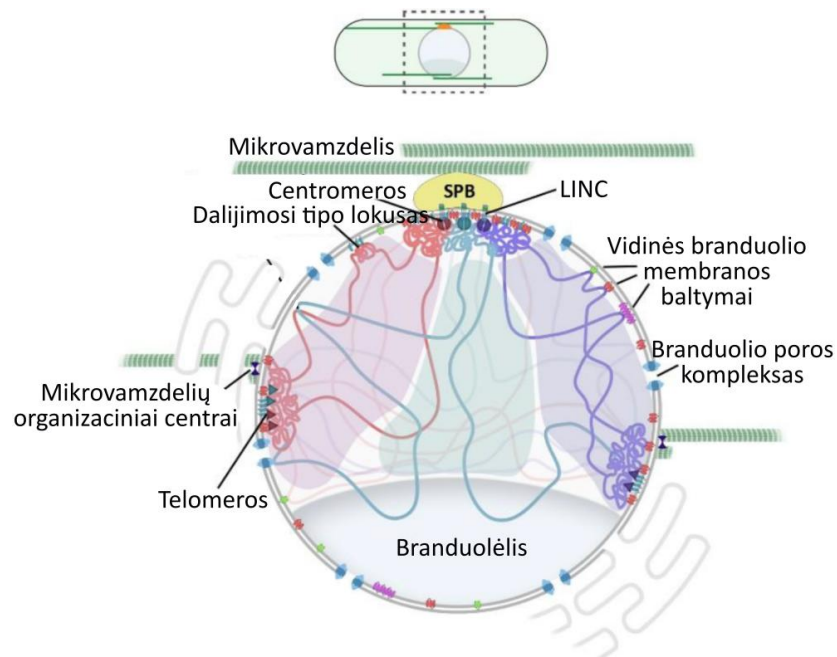
Mielės yra vienaląsčiai organizmai, priklausantys grybų karalystės *Ascomycota* tipui. Pagal dalijimosi būdą jos skirstomos į besipumpuruojančias (pavyzdžiui, *Saccharomyces cerevisiae*) ir skylančias (pavyzdžiui, *Schizosaccharomyces pombe*) mieles. Abi rūšys yra plačiai taikomos kaip modelinės sistemos tiriant evoliuciškai konservatyvius ląstelinius procesus, būdingus aukštesniesiems eukariotiniams organizmams. Taip pat, mielių ląstelės yra lengvai kultivuojamos, o jų genomu galima nesudėtingai manipuluoti pasitelkiant įvairius molekulinis įrankius.

Nors *S. pombe* ir *S. cerevisiae* genomo dydis panašus (~12–14 Mb), jų genomo struktūra gerokai skiriasi. *S. pombe* genomui būdingas didelis kiekis intronų (~4730), ilgi centromeriniai regionai ir išreikštas heterochromatinas, o *S. cerevisiae* genome randamos tik ~272 introninės sekos, centromeros yra trumpos (Wood et al., 2002). Be to, nors *S. cerevisiae* turi 16 chromosomų, o *S. pombe* tik 3, tačiau pastarosios yra ilgesnės ir struktūriškai sudėtingesnės (Pidoux & Allshire, 2004). Dėl kompleksiskumo, *S. pombe* yra tinkamas modelinis organizmas tirti chromosomų organizaciją ir struktūrą.

1.4.1. *S. pombe* chromatino ir chromosomų struktūra

Kadangi *S. pombe* haploidiniam organizmui yra būdingos tik 3 chromosomos, chromatino organizacijos ir dinamikos tyrimų analizė yra daug paprastesnė, o haploidinių ląstelių interfazės stadijoje yra stebimas labai struktūrizuotas chromosomų išsidėstymas branduolyje.

S. pombe chromosomoms yra būdinga Rabl konfigūracija. (Funabiki et al., 1993). Visų trijų chromosomų centromeros yra susitelkusios šalia branduolio periferijos, kur yra išsidėstęs verpstės poliaus kūnelis (angl. *spindle pole body*), mielėse atliekantis centrosomos funkciją. Tuo tarpu telomeros yra susitelkusios priešingame branduolio pusėje, netoli branduolėlio. Branduolėlis išsidėsto viename iš branduolio polių, o jame lokalizuojasi III chromosomoje esančios pasikartojančios ribosominės DNR sekos (Uzawa & Yanagida, 1992) (1.5 pav.).



1.5 pav. *S. pombe* mielių branduolio organizacija. Modifikuota pagal Gallardo et al., 2019.

Tyrimai rodo, kad *S. pombe*, kaip ir aukštesniesiems eukariotiniams organizmams, yra būdingos chromosomų teritorijos (Mizuguchi et al., 2014).

1.4.2. *S. pombe* šiuolaikiniai chromatino tyrimų metodai

Gyvų *S. pombe* ląstelių genomines DNR vaizdinimui dažniausiai yra pritaikoma vienspalvė FROS sistema, kuri remiasi LacI-*LacO* sąveika.

Ankstyvųjų tyrimų metu, integravus *LacO* pasikartojančias DNR sekas šalia centromerinės srities, mitozės metu buvo tirta centromeros dinamika (Tatebe et al., 2001). Kito tyrimo metu buvo sukurta *S. pombe* biblioteka, apimanti *LacO* sekų integraciją į vieną iš 143 galimų genomo lokusų, kurie bibliotekoje yra išsidėstę maždaug kas 90 kbp (Ding et al., 2019). Toks kamienas buvo naudojamas identifikuoti chromosomų sritis, su kuriomis sąveikauja Seb1–mCherry baltymas. Šiame tyrime genomo lokusai buvo identifikuoti kolokalizuoiant LacI–GFP ir Seb1–mCherry fluorescencinius taškelius.

Pirminių tyrimų metu buvo sekamas tik vienas genomo lokusas, tačiau siekiant fluorescenciškai tirti du skirtingus genomo lokusus, LacI-*LacO* ir TetR-*TetO* sistemos gali būti pritaikomos kartu. Dvispalvė FROS sistema *S. pombe* mielių ląstelėse buvo naudojama didelio masto chromosomų kondensacijos tyrimams. Buvo parodyta, kad atstumas tarp dviejų fluorescencinių signalų koreliuoja su chromatino kondensacijos lygiu: interfazės ar G2 dalijimosi stadijoje atstumas tarp dviejų FROS sistemos fluorescencinių taškių yra apie 2 kartus didesnis už atstumą mitozės profazės ar metafazės stadijose. Taikant genomo inžineriją, šis metodas yra tinkamas baltymų, dalyvaujančių chromatino kondensacijos procese, nustatymui ir jų svarbos įvertinimui (Petrova et al., 2013). FROS metodas buvo pritaikytas ir kito tyrimo metu, pirmą kartą parodant, kad transkripcijos faktorius Zasl yra svarbus mitotinių chromosomų kondensacijos reguliatorius (Schiklenk et al., 2018).

Nors FROS sistema yra tinkama kelių genomo lokusų fluorescenciniam žymėjimui, šiam metodui yra reikalinga ilgų pasikartojančių sekų integracija į genomą, dėl ko gali būti sutrikdytas genomo integralumas ir stabilumas. CRISPR-Cas sistema iki šiol buvo pritaikyta tik *S. pombe* genomo redagavimui (Torres-Garcia et al., 2020), genų interferencijai (Ishikawa et al., 2021; Ishikawa et al., 2023), bet ne chromatinio vaizdinimui.

1.5. Fluorescencinė mikroskopija

Fluorescencija yra molekulių savybė, leidžianti sugerti aukštesnės energijos elektromagnetinę spinduliuotę (trumpesnio bangos ilgio) ir išspinduliuoti mažesnės energijos (ilgesnio bangos ilgio) spinduliuotę.

Fluorescencinės mikroskopijos metodai klasifikuojami pagal bandinio žadinimo būdą ir optinės sistemos skiriamąją gebą. Plataus lauko epifluorescencinė mikroskopija pasižymi viso bandinio tolygiu Z ašies žadinimu. Tačiau dėl viso bandinio tūrio žadinimo gali būti sužadinamos pašalinės molekulės, dėl ko suprastėja tikslinių fluoroforų surenkamo signalo ir foninio triukšmo santykis.

Vienas iš metodų, leidžiančių padidinti kontrastą, yra visiško vidaus atspindžio fluorescencinė mikroskopija (angl. *Total Internal Reflection Fluorescence*, TIRF) (Axelrod et al., 2001). Kai į stikliuko paviršių (ant kurio yra žemesnio aplinkos lūžio rodiklio terpė) krentančios spinduliuotės kampas yra didesnis už kritinį kampą, susidaro evanescencinė banga, kuri sužadina tik labai nedidelį paviršiaus sluoksnį (~100 nm) arti stikliuko paviršiaus. Tai reiškia, kad žadinantis laukas prasiskverbia į bandinį labai negiliai. TIRF metodas ypač tinkamas pavienių molekulių stebėjimui dėl didelio kontrasto ir mažo foninio triukšmo. Tačiau gyvų biologinių sistemų vaizdinimui šis metodas nėra tinkamas dėl ne viso ląstelės tūrio sužadinimo (žadinama tik apatinė membrana).

Dar vienas metodas – konfokalinė mikroskopija, pasižymi tuo, kad žadinimo spindulys fokusuojamas viename taške, o detektorius surenka fluorescenciją tik iš sufokusuoto tūrio (Nwaneshiudu et al., 2012). Papildomai pasitelkiami bandinio arba lazerio spindulio skeneriai leidžia išgauti aukštos raiškos trimatį vaizdą. Tačiau dėl taškinio žadinimo ir skenavimo šis metodas nėra optimalus greitiems dinaminiams procesams vaizdinti, ypač gyvose sistemose.

1.5.1. Fluorescenciniai zondai

Molekulių detekcijai taikant fluorescencinę mikroskopiją yra reikalingi fluorescuojantys zondai. Be absorbcijos ir emisijos spektrų, jie taip pat yra charakterizuojami ekstincijos koeficientu, apibūdinančiu, kokią elektromagnetinės spinduliuotės dalį fluorescuojanti molekulė gali sugerti. Fotostabilumas yra kita fluorescuojančių molekulių savybė, nusakanti, kaip greitai fluoroforas negrįžtamai išbluks. Fluoroforai taip pat turi savitas kvantines išeigas, apibūdinančias fluorescencijos efektyvumą. Kitos savybės, pagal kurias fluoroforai gali būti charakterizuojami, yra jautrumas aplinkos pH, fluorescencijos gyvavimo trukmė ar kt. (Schirripa Spagnolo & Luin, 2022).

Yra trys fluorescuojančių molekulių tipai: fluorescenciniai baltymai, fluorescenciniai dažikliai, nanodalelės (kvantiniai taškai, nanodeimantai). Kiekvienas tipas turi trūkumų ir privalumų, todėl zondo tipas yra pasirenkamas pagal eksperimento dizainą.

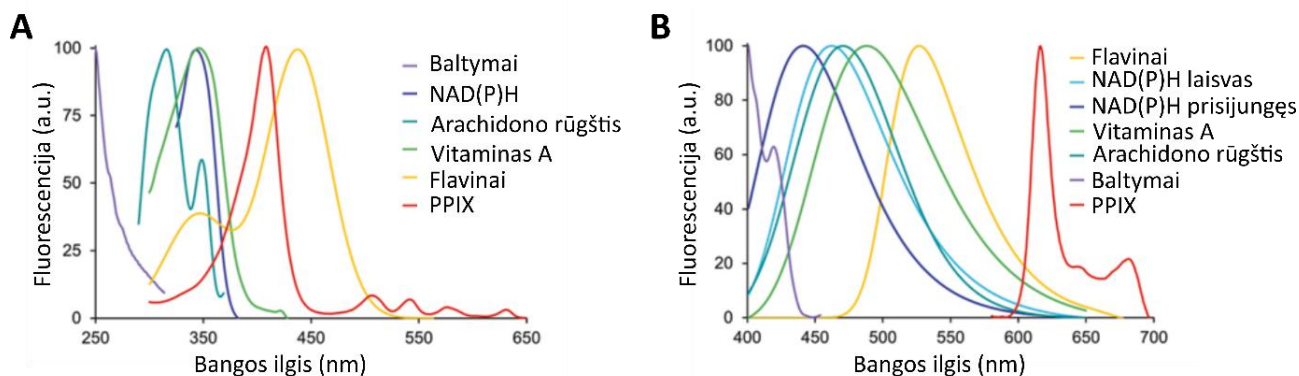
Fluorescenciniai dažikliai yra nedidelio dydžio (< 1 nm), pasižymi didele kvantine išeiga, aukštu fotostabilumu ir dideliu ekstincijos koeficientu, todėl jų pritaikymas yra ypač tinkamas *in vitro* tyrimams. Tokie dažikliai dažniausiai kovalentiškai prijungiami prie tikslinių molekulių per specifines chemines grupes. Vis dėlto, jų taikymas *in vivo* tyrimuose yra sudėtingesnis dėl nespecifinės sąveikos su kitomis molekulėmis ir galimo toksiškumo.

Fluorescenciniai baltymai yra koduojami DNR sekoje. Genų inžinerija leidžia nesudėtingai sulieti tikslinį baltymą su fluorescuojančiu zonu. Toks žymėjimas yra specifinis ir nereikalauja papildomų cheminių modifikacijų. Fluorescenciniai baltymai suderinami su biologinėmis sistemomis ir pasižymi mažu fototoksiškumu. Tačiau fluorescenciniai baltymai dažniausiai turi mažesnę ekstincijos koeficientą, yra mažiau fotostabilūs ir dėl to greičiau išblunka nei cheminiai dažikliai.

Nanodalelės yra trečiasis fluorescuojančių zonų tipas. Kvantiniai taškai ir nanodeimantai yra itin fotostabilūs ir gali fluorescuoti ilgą laiką, todėl jie idealiai tinka ilgo laiko vaizdinio eksperimentams. Tačiau tiek kvantiniai taškai, tiek nanodeimantai yra palyginti dideli (dažnai > 10 nm), o tai gali paveikti jų difuziją ir sąveiką su biologinėmis struktūromis (Medintz et al., 2005; Mochalin et al., 2012).

1.5.2. Iššūkiai fluorescencinės mikroskopijos tyrimuose gyvoje biologinėse sistemose

In vivo fluorescencinės mikroskopijos tyrimuose dažniausiai naudojami zondai – fluorescenciniai baltymai. Nors jie pasižymi geru suderinamumu su biologinėmis sistemomis ir užtikrina specifinį tikslinių molekulių žymėjimą, jų fluorescencinė išeiga yra nedidelė. Fluorescencinių baltymų signalo kontrastą dar labiau susilpnina ląstelių autofluorescencija. Tyrimų metu buvo pastebėta, kad ląstelių autofluorescenciją sukelia redukuota nikotinamido adenino dinukleotido forma (NADH) (Chance & Thorell, 1959), redukuota flavino adenino dinukleotido forma (FADH/FADH₂), riboflavinai (Aubin, 1979), vitaminas A (Exan & Hardy, 1979), PPIX (Bissonnette et al., 1998), arachidono rūgštis (Croce et al., 2004). Didelė dalis šių molekulių yra randama mitochondrijose ir liposomose. Šios molekulės pasižymi skirtingais sugerties (1.6A pav.) ir emisijos spektrais (1.6B pav.) ir prisideda prie ląstelių autofluorescencijos, biologinį bandinį žadinant skirtingo ilgio aukštos energijos spinduliuote.



1.6 pav. Ląstelių autofluorescenciją sukeliančių molekulių sugerties ir emisijos spektrai.

(A) Sugerties spektras. (B) Emisijos spektras. PPIX - Protoporfirinas IX. Modifikuota, pagal Croce & Bottiroli, 2017.

Fluorescenciniams baltymams taip pat yra būdingas blyksėjimas (angl. *blinking*) – atsitiktinis signalo nutrūkimas ir greitas fotoblyškimas (angl. *photobleaching*), kai fluoroforas negrįžtamai praranda gebėjimą fluorescuoti.

Viena iš galimų strategijų, naudojamų fluorescencinio signalo sustiprinimui, yra dviejų komponentų fluorescencinių baltymų sistemos. Taikant šias sistemas, rekombinantiniai baltymai gali būti suliejami su trumpesniais fluorescencinių baltymų fragmentais, o tai padidina baltymo tirpumą ir teisingą susilankstymą, palengvina klonavimą. Be to, priliejant kelias GFP₁₁ β klostes, ši sistema leidžia išgauti geresnį fluorescencinio signalo kontrastą, nes viena molekulė yra pažymima keliais fluorescenciniais baltymais.

Pirmą kartą tokia sistema buvo sukonstruota GFP baltymo pagrindu, atskiriant 1-10 β klostes nuo 11-osios β klostės (Cabantous et al., 2005). Esant abiem GFP komponentams yra galima negrįžtama spontaninė komplementacija. Atskiri sistemos komponentai nepasižymi fluorescencija ir tik po komplementacijos GFP baltymas vėl gali fluorescuoti. Lyginant su pilno ilgio GFP baltymu, dviejų komponentų GFP sistemai yra būdingos tos pačios spektrinės savybės, maždaug apie 200 ps trumpesnė fluorescencijos gyvavimo trukmė, ~10 % mažesnė kvantinė išeiga (Köker et al., 2018).

Pasitelkus baltymų inžineriją, buvo sukurti ir kitų fluorescencinių baltymų, tokių kaip sfCherry, mRuby4, mNeonGreen2, EGFP2, Capri, Cerulean ir CFP, dviejų komponentų sistemos (Feng et al., 2017; Tamura et al., 2021).

Fluorescencinių baltymų fotoblyškimas, kita vertus, galėtų būti prailginamas naudojant PAINT (angl. *point accumulation in nanoscale topography*) mikroskopiją, pagrįstą dviejų komponentų silpna tarpusavio sąveika (Sharonov & Hochstrasser, 2006). Norint žymėti tikslinius genetinius lokusus gyvoje ląstelėje PAINT mikroskopija galėtų būti derinama kartu su šiuolaikiniais chromatino žymėjimo metodais, kaip CRISPR-Cas sistema. Šiuo atveju, fluoroforų blyškimo trukmė galėtų būti prailginta skatinant su DNR sąveikaujančių baltymų disociaciją nuo DNR molekulės. Dėl greitesnės disociacijos

vienas išblyškęs fluorescencinis baltymas greitai gali būti pakeistas kitu, dar neįblyškusiu fluorescenciniu baltymu. Iki šiol ši strategija nebuvo pritaikyta *S. pombe* ląstelėse.

Visgi yra žinoma, kad *SpCas9*-sgRNR komplekso ir DNR taikinio sąveika yra labai stabili. *Escherichia coli* ląstelėse, katalitiškai neaktyvaus *SpCas9* mutanto ir sgRNR komplekso asociacija su pilnai komplementariu taikiniu yra stabili iki kol prasideda DNR molekulės replikacija (Jones et al., 2017).

V tipo Cas12a šeimos baltymams taip pat yra būdinga stabili sąveika su taikinine DNR. Pavyzdžiui, katalitiškai neaktyvaus *AsCas12a* baltymo ir crRNR komplekso k_{off} vertė yra $2.3 (\pm 0,3) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, tai rodo, kad d*AsCas12a*-crRNR kompleksas, atpažinęs taikininę seką, disocijuoja maždaug po 72 min (Strohkendl et al., 2018). Tačiau buvo parodyta, kad įvedant 1 nukleotido nesutapimus skirtingose vietose tarp crRNR ir jai komplementarios DNR sekos, pasikeičia d*AsCas12a*-crRNR komplekso disociacija. Pavyzdžiui, nesutapimo įvedimas 4-oje pozicijoje (nuo PAM sekos) lemia baltymo-ribonukleorūgšties komplekso disociaciją po ~7,1 sek., tuo tarpu nesutapimas 10-oje pozicijoje – vos ~0,2 sek. trunkančią sąveiką iki pilnos disociacijos (Strohkendl et al., 2018).

Taigi Cas baltymų-nukleorūgšties kompleksų disociacija nuo substratinės DNR galėtų būti pagreitinama įvedant vieno nukleotido nesutapimus tarp crRNR/sgRNR ir jai komplementarios taikininės DNR. Tokia sistema galėtų būti pritaikoma PAINT mikroskopijos metodui, siekiant netiesiogiai prailginti fluorescencinio signalo trukmę.

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

2.1 lentelė. Darbo metu naudoti *S. pombe* ląstelių kamienai.

Kamienas	Genotipas
C2566	<i>h⁻, LacO::lys1⁺, LacI-GFP::his7⁺, ChrI 1.5Mb::TetO-hphMX, Z locus::TetR-tdTomato-natMX, leu1-32, ura4-D18, ade6-M210</i>
TA369	<i>h⁻ ura4-D18</i>

2.2 lentelė. Darbo metu naudoti *E. coli* ląstelių kamienai.

Kamienas	Genotipas
DH5α	<i>F⁻ ϕ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>
DH10B	<i>F⁻mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ-rpsL(StrR) nupG</i>

2.3 lentelė. Darbo metu naudoti cheminiai reagentai

Reagentas	Gamintojas
Adeninas	SERVA Electrophoresis GmbH
Agaras	FORMEDIUM
Amonio chloridas	Carl Roth
Biotinas	Thermo Scientific
Boro rūgštis	Carl Roth
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Carl Roth
Cinko sulfatas heptahidratas	Carl Roth
Citrinų rūgštis	Carl Roth
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Carl Roth
DTT	Thermo Scientific
FeCl ₂ ·6H ₂ O	Carl Roth
Gliukozė	Carl Roth
HEPES	Sigma Aldrich
Histidinas	Sigma Aldrich
Inozitolis	Thermo Scientific
IPTG	Sigma Aldrich
Kalio vandenilio ftalatas	Thermo Scientific
KCl	Carl Roth
KH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich
KI	Carl Roth
L-leucinas	Sigma Aldrich
L-lizinas	Sigma Aldrich
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Carl Roth
Mielų ekstraktas	FORMEDIUM
MnSO ₄	Carl Roth
Molibdeno rūgštis	Sigma Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth
Na ₂ SO ₄	Carl Roth
NaCl	Sigma Aldrich
NH ₄ Cl	Sigma Aldrich

2.3 lentelė. Darbo metu naudoti cheminiai reagentai. Lentelės tęsinys.

Reagentas	Gamintojas
Nikotino rūgštis	Carl Roth
Pantoneno rūgštis	Sigma Aldrich
Peptonas	FORMEDIUM
Sorbitolis	Carl Roth
Uracilas	Sigma Aldrich
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma Aldrich

Rinkiniai

- „GeneJET PCR Purification Kit“ (Thermo Scientific)
- „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Scientific)
- „GeneJET Gel Extraction Kit“ (Thermo Scientific)

Schizosaccharomyces pombe mitybinės terpės

- YE skysta terpė: mielių ekstraktas (5 g/L), D-gliukozė (30 g/L), adeninas (225 mg/mL), uracilas (225 mg/mL), L-leucinas (225 mg/mL), histidinas (225 mg/mL), lizinas (225 mg/mL). Sterilizuojama be L-gliukozės, autoklavuojant 20 min. 121 °C temperatūroje esant 1 atm. slėgiui.
- EMM skysta terpė: kalio vandenilio ftalatas (3 g/L), Na₂HPO₄ (2.2 g/L), NH₄Cl (5 g/L), L-gliukozė (20 g/L), 50× druskų tirpalas (20 mL/L), 1000× vitaminų tirpalas (1 mL/L), 10000× mineralų tirpalas (0,1 mL/L). Terpė sterilizuojama filtruojant pro 0,22 µm filtrus.

Escherichia coli mitybinės terpės

- LB skysta terpė: mielių ekstraktas (5 g/L), peptonas (10 g/L), NaCl (10 g/L).
- M9 skysta terpė: 5× druskų tirpalas (1×), MgSO₄ (2 mM), CaCl₂ (0.1 mM), 50× MEM EAA (1×), 100× MEM NEAA (1×), L-gliukozė (4 g/L) arba glicerolis (4 g/L). M9 kieta terpė buvo ruošama vandenyje autoklavuotą agarą (3 g/L) papildant aprašytais komponentais.

Tirpalai ir buferiai

- 50× druskų tirpalas: CaCl₂·2H₂O (4,99 mM), KCl (0,67 M), Na₂SO₄ (14,1 mM), MgCl₂·6H₂O (0,26 M). Darbo metu naudotas ruošiant EMM mitybinę terpę.
- 1000× vitaminų tirpalas: biotinas (40,8 µM), inozitolis (55,5 mM), nikotino rūgštis (81,2 mM), pantoteno rūgštis (4,2 mM). Darbo metu naudotas ruošiant EMM mitybinę terpę.
- 10000× mineralų tirpalas: KI (6,02 mM), MnSO₄ (23,7 mM), ZnSO₄·7H₂O (13,9 mM), FeCl₂·6H₂O (7,4 mM), CuSO₄·5H₂O (1,6 mM), boro rūgštis (80,9 mM), citrinos rūgštis (47,6 mM), molibdeno rūgštis (2,47 mM). Darbo metu naudotas ruošiant EMM mitybinę terpę.
- 5× druskų tirpalas: Na₂HPO₄ (238,7 mM), KH₂PO₄ (110,2 mM), NaCl (42,77 mM), NH₄Cl (93,47 mM). Darbo metu naudotas ruošiant M9 mitybinę terpę.

- DTT elektroporacijos buferis: DTT (25 mM), sorbitolis (0,6 M), HEPES (20 mM, pH 7,5). Darbo metu naudotas ruošiant elektrokompetentines *Schizosaccharomyces pombe* ląsteles.

2.4. lentelė. Darbo metu naudoti fermentai.

Tipas	Pavadinimas	Gamintojas
Polimerazės	Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific
Restrikcijos endonukleazės	FastDigest DpnI	Thermo Scientific
	FastDigest MssI	Thermo Scientific
	FastDigest BstXI	Thermo Scientific
	FastDigest XhoI	Thermo Scientific
	FastDigest BamHI	Thermo Scientific
	FastDigest Eco31I	Thermo Scientific
Fosfatazė	T4 PNK (10 U/μL)	Thermo Scientific
Ligavimo rinkiniai	NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	New England Biolabs (NEB)
	T4 DNA ligazė	Thermo Scientific

2.5. lentelė. Darbo metu naudotos *S. pombe* plazmidės.

Pavadinimas	Svarbiausi elementai	Šaltinis
pAV0612	pAde6(PmeI)-p(tdh1)-3mTagBFP2-RitC-terminator(ScADH1)-bsdMX	Dovana iš Sophie Martin (Addgene plazmidė: #133505)
pMR4	pAde6(PmeI)-p(tdh1)-GFP1-10-RitC-terminator(ScADH1)-bsdMX	Sukonstruota šio darbo metu
pYZ714	ADH1-dFnCas12a-Clr4-pfba1-BsaI pad	Addgene plazmidė: #132955
pMR6	ADH81-dFnCas12a-Clr4-pfba1-BsaI pad	Sukonstruota šio darbo metu
pMR7	ADH1-dFnCas12a-GFP11×7-pfba1-BsaI pad	Sukonstruota šio darbo metu
pMR8	ADH81-dFnCas12a-GFP11×7-pfba1-BsaI pad	Sukonstruota šio darbo metu
pFA6a-kanMX6-P81nmt1	pFA6a-kanMX6-P81nmt1	Addgene plazmidė: #39282
pMR11	ADH1-dFnCas12a-GFP11×7-pfba1-3×crRNA-SPAC7D4.12c	Sukonstruota šio darbo metu
pMR12	ADH81-dFnCas12a-GFP11×7-pfba1-3×crRNA-SPAC7D4.12c	Sukonstruota šio darbo metu
pMR13	Nmt81-dFnCas12a-GFP11×7-pfba1-BsaI pad	Sukonstruota šio darbo metu
pMR14	Nmt81-dFnCas12a-GFP11×7-pfba1-3×crRNA-SPAC7D4.12c	Sukonstruota šio darbo metu
pMR17	Nmt81-dFnCas12a-GFP11×7-pfba1-9×crRNA-SPAC7D4.12c	Sukonstruota šio darbo metu
pMR20	Nmt81-dFnCas12a-GFP11×7-pfba1-3×crRNA-ade6	Sukonstruota šio darbo metu
pMR26	Nmt81-dFnCas12a-GFP11×7-pfba1-1×crRNA-LacO	Sukonstruota šio darbo metu
pMR27	Nmt81-dFnCas12a-GFP11×7-pfba1-1×crRNA-TetO	Sukonstruota šio darbo metu
pMR30	Nmt81-dFnCas12a-E2C-pfba1-1×crRNA-LacO	Sukonstruota šio darbo metu
pMR31	Nmt81-dFnCas12a-E2C×7-pfba1-1×crRNA-TetO	Sukonstruota šio darbo metu

2.6. lentelė. Darbo metu naudotos *E. coli* plazmidės.

Pavadinimas	Svarbiausi elementai	Šaltinis
pTK145	pBAD- <i>FnCas12a</i>	Skyriaus kolekcija
pMJ26	pBAD-d <i>FnCas12a</i> -GFP-HaloTag	Skyriaus kolekcija
pRZ170	pACYC-SpeI-crRNA-T2-HDV-Cm	Skyriaus kolekcija
pMR29	pACYC-SpeI-crRNA-T1(LacO)-HDV-Kn	Sukonstruota šio darbo metu
pMR28	pBAD- <i>FnCas12a</i> -eGFP-HaloTag	Sukonstruota šio darbo metu
pSMART1	14×LacO	Skyriaus kolekcija
pSMART2	0×LacO	Skyriaus kolekcija
pJP9	pBAD- <i>SpCas9</i> -eGFP-HaloTag	Skyriaus kolekcija
pJP10	pBAD-d <i>SpCas9</i> -eGFP-HaloTag	Skyriaus kolekcija
pUB2	SpeI-T1(LacO)-gRNA	Skyriaus kolekcija

2.7 lentelė. Darbo metu naudoti susintetinti DNR fragmentai.

Pavadinimas	Paskirtis	Šaltinis
GFP ₁₋₁₀	Fragmento įklonavimas į pAV0612 vektoriaus karkasą	Twist Bioscience
GFP ₁₁ ×7	Fragmento įklonavimas į pYZ714 ir pMR6 vektoriaus karkasą	Twist Bioscience

2.8 lentelė. Darbo metu naudoti pradmenys.

Pavadinimas	Seka (5'→3')	Paskirtis
MT-334	TGATTTACACTTGATTCAAATGTC	GFP ₁₋₁₀ fragmento PGR
MT-335	ATTCGCTTATTAGAAAGTGTTAC	GFP ₁₋₁₀ fragmento PGR
MT-326	CCATGGGAGGCGTCAAACCGA	pAV0612 karkaso PGR
MT-327	ATGTGGGTGGTGGACAGGTGCC	pAV0612 karkaso PGR
MT-331	CGGTCCGGTACTTCTTCCTG	pMR4 kolonijų PGR
MT-317	GCTGCGCACGTCAAGACTG	pMR4 kolonijų PGR
MT-332	CTCTGACACATGCAGCTC	3' pusės genotipavimui, po integracijos
MT-333	GCAGCTCTCAACAGCAG	3' pusės genotipavimui, po integracijos
MT-343	TCTTCGATAATGTCGAGTTCC	5' pusės genotipavimui, po integracijos
MT-344	GTATATACCTTGGCAGCTCAG	5' pusės genotipavimui, po integracijos
MT-345	GGTATAAATAGAGGCAGGCG	Integruoto GFP ₁₋₁₀ PGR
MT-230	CAGTATAGCGACCAGCATTC	Integruoto GFP ₁₋₁₀ PGR
MT-326	CCATGGGAGGCGTCAAACCGA	ADH1 promotoriaus keitimui į ADH81
MT-327	ATGTGGGTGGTGGACAGGTGCC	ADH1 promotoriaus keitimui į ADH81
MT-340	CCATAAGGTGATCCATGCTTCC	pMR6 kolonijų PGR
MT-341	CGCTAATCTGTTTCTTGATGGTG	pMR6 kolonijų PGR
BD-1	CAATCCGCCCTCACTACAACCG	GFP ₁₁ ×7 fragmento PGR
BD-2	CTACTCTGGCGTCGATGAGGGA	GFP ₁₁ ×7 fragmento PGR
MT-17	AAATAAACAAATAGGGGTTCCG	pMR7 ir pMR8 kolonijų PGR
MT-328	GAACAATCAGGAGGGGAAG	pMR7 ir pMR8 kolonijų PGR
MT-347	GGTCTCGAGATAACCATAACCAAAC CGAATTTTAAATTTCTACTGTTGGG AGACC	pMR7 PGR
MT-348	GGTCTCGGTTGTAGATCACGAACAA TGTGCATATCAGAAAATTTCTACTG GAGACC	pMR7 PGR

2.8. lentelė. Darbo metu naudoti pradmenys. Lentelės tęsinys.

MT-349	GGTCTCGGTTGTAGATCACGAACAA TGTGCATATCAGAAAATTTCTACTG GAGACC	Nmt81 promotoriaus PGR
MT-350	GGTCTCCAGTAGAAATTTTCTGATA TGCACATTGTTTCGTGATCTACAACC GAGACC	Nmt81 promotoriaus PGR
MT-320	CAGGAAAAACGTAACCTCTCG	pMR13 kolonijų PGR
MT-357	GCTTCTCATCGTCCAGAATC	pMR13 kolonijų PGR
MT-230	CAGTATAGCGACCAGCATTC	Plazmidės, su įklonuota crRNR kasete, kolonijų PGR
MT-342	GCGCTACTGTTGCAGTATC	Plazmidės, su įklonuota crRNR kasete, kolonijų PGR

2.9. lentelė. DNR taikiniai į kuriuos darbo metu buvo nutaikytas dFnCas12a-GFP₁₁×7 baltymas.

Pavadinimas	PAM	Taikininės DNR Seka (5'→3')
T1 (<i>SPAC7D4.12c</i>)	TTTG	AACCATAACCAAACCGAATTTTA
T2 (<i>SPAC7D4.12c</i>)	TTTA	CACGAACAATGTGCATATCAGAA
T3 (<i>SPAC7D4.12c</i>)	TTTG	TAGCTCCAGCGAACCACAAAGTA
T4 (<i>SPAC7D4.12c</i>)	TTTG	AAGTTGGTCCATGACATATATAA
T5 (<i>SPAC7D4.12c</i>)	TTTG	AGTAGATACCGGACATGAAGTTG
T6 (<i>SPAC7D4.12c</i>)	TTTG	AAGCACACTGATCCTACAAAATG
T7 (<i>SPAC7D4.12c</i>)	TTTA	GAAGAACATATGGCTTCTGCAGC
T8 (<i>SPAC7D4.12c</i>)	TTTG	AACGAAGAATATAAAATCACTAT
T9 (<i>SPAC7D4.12c</i>)	TTTC	TACCACGAGAATGACCTGTTTTA
T1 (<i>ade6</i>)	TTTA	AGCGATGGGCTGCCTCTACCATC
T2 (<i>ade6</i>)	TTTA	CCATAAAGATGCAAAGTTGCACC
T3 (<i>ade6</i>)	TTTA	AGCAAGATGAAAGATGCTGCCGT
T1 (<i>LacO</i>)	TTTG	TGGCCACATGTGGAATTGTGAGC
T1 (<i>TetO</i>)	TTTA	CCACTCCCTATCAGTGATAGAGA

2.2. Metodai

2.2.1. *S. pombe* integratyvinio vektoriaus konstravimas

pAV0612 vektoriaus amplifikacijai PGR metodu buvo naudojami MT-326 ir MT-327 pradmenys, o *GFP₁₋₁₀* amplifikacijai – MT-334 ir MT-335 pradmenys. PGR reakcijai buvo naudota Phusion polimerazė, reakcija vykdyta pagal gamintojo rekomendacijas. PGR produktų ilgis įvertintas vykdant 1 % agarozės gelio elektroforezę. Amplifikuota pAV0612 vektoriaus DNR seka papildomai, 30 min., 37 °C temperatūroje, buvo inkubuota su DpnI restrikcijos endonukleaze. Abiejų reakcijų produktai tuomet išgryninti naudojant „GeneJET PCR Purification Kit“ rinkinį. *GFP₁₋₁₀* įklonuotas į pAV0612 vektoriaus karkasą Gibson klonavimo metodu, naudojant „NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix“. Tuomet 5 µL reakcijos mišinio transformuoti į *E. coli* DH5α kamieną. Sukonstruota pMR4 plazmidė buvo tikrinama vykdant kolonijų PGR su Phusion polimeraze ir MT-331 bei MT-317

pradmenimis. Plazmidinė DNR buvo išgryninta naudojant „GeneJET Plasmid Purification Kit“ rinkinį. Visos pMR4 plazmidės DNR seka nustatyta Nanopore sekoskaitos metodu (SeqVision).

2.2.2. Mielių vektoriaus integracija į genomą

Sukonstruotas pMR4 vektorius, pagal gamintojo rekomendacijas, inkubuotas FastDigest buferyje su MssI restrikcijos endonukleaze. Vektoriaus linearizacijos efektyvumas patikrintas 1 % agarozės gelio elektroforezės metodu. Vektorius išgrynintas „GeneJET PCR Purification Kit“ rinkinio pagalba. Linearizuotas vektorius elektroporuotas į *S. pombe* C2566 ir TA369 kamienus. Po elektroporacijos mielių ląstelės iš karto užsėtos ant EMM terpės be adenino. Mielių kolonijos atbrauktos ant EMM terpės be adenino, su blasticidinu. Iš teigiamų transformantų buvo išgryninta genominė DNR ir genotipuojama vykdant PGR su Phusion polimeraze. Galiausiai, integruotas *GFP₁₋₁₀* fragmentas buvo amplifikuotas PGR metu, naudojant MT-345 ir MT-320 pradmenis. Gautas PGR produktas išgrynintas su „GeneJET PCR Purification Kit“ rinkiniu ir nusekvenuotas Sanger sekoskaitos būdu (Azenta).

2.2.3. Mielių genominės DNR skyrimas

10 mL *S. pombe* ląstelių, esančių stacionarioje augimo fazėje, buvo centrifuguotos 2500 × g, 10 min. Ląstelių nuosėdos buvo resuspenduotos 1 mL CSE buferyje, papildytos 2 mg/mL mielių lizės fermentu, ir inkubuotos 37 °C temperatūroje 1 val. Sulizuotos ląstelės centrifuguotos 14000 × g, 1 min, 4 °C temperatūroje. Supernatantas pašalintas, o nuosėdos toliau buvo resuspenduotos 450 µL 5× TE buferio. Į mėgintuvėlį buvo įpilta 50 µL 10 % SDS tirpalo ir inkubuota 65 °C temperatūroje 1 val. Po inkubacijos pridėta 150 µL 5 M KAc tirpalo ir inkubuota ant ledo 10 min. Tada mėginiai centrifuguoti 14 000×g, 15 min, 4 °C temperatūroje. Supernatantas pašalintas, o DNR nuosėdos praplautos 70 % EtOH ir išdžiovintos kambario temperatūroje.

Išdžiuvusiose nuosėdose suspenduota 350 µL 5× TE buferio, papildyto 50 µg/mL RNazės A, ir inkubuota 60 °C, 10 min. Po to pridėta 300 µL fenolio:chloroformo:izoamilalkoholio (25:24:1) mišinio, mėginiai buvo intensyviai vorteksuoti 20 sek. ir centrifuguoti 20 min, 4 °C. Vandeninė fazė perkelta į naują mėgintuvėlį ir ekstrakcija buvo pakartota su fenolio:chloroformo:izoamilalkoholio mišiniu. Į galutinį vandeninės fazės tūrį pridėta 30 µL 3 M NaAc ir 750 µL absoliutaus EtOH, mėginiai inkubuoti ant ledo 10 min, po to centrifuguoti 10 min. Nuosėdos plautos 70 % EtOH ir išdžiovintos kambario temperatūroje. Genominė DNR ištirpinta MiliQ vandenyje, o jos koncentracija įvertinta spektrofotometriškai, naudojant NanoDrop.

2.2.4. ADH1 promotoriaus keitimas į ADH81 (pMR6 plazmidės konstravimas)

pYZ714 vektoriuje esančio dFnCas12a-Clr4 baltymo geno ADH1 promotorius buvo pakeistas į silpnesnį promotoriaus variantą – ADH81. pYZ714 vektorius buvo amplifikuotas PGR metodu, naudojant MT-326 ir MT-327 pradmenis ir Phusion polimerazę. PGR metu promotoriujė esanti TATA

dėžutė nebuvo amplifikuota. PGR produkto ilgis įvertintas vykdant 1 % agarozės gelio elektroforezę. Tikslinio ilgio produktas buvo išgrynintas iš gelio, naudojant „GeneJET Gel Extraction Kit“ rinkinį. PGR produkto 5' galai buvo fosforilinti su T4 PNK kinaze (pagal gamintojo reikalavimus). Po fosforilinimo reakcijos, T4 PNK kinazė inaktyvuota 75 °C, 10 min. Fosforilintas DNR produktas buvo liguojamas, naudojant T4 ligazę (pagal gamintojo reikalavimus), 4 °C, 16 val. Tuomet 5 µL ligavimo mišinio transformuoti į *E. coli* DH5α kamieną. Teigiamų *E. coli* transformantų plazmidės tikrintos kolonijų PGR produktą, gautą naudojant MT-340 ir MT-341 pradmenis, inkubuojant su BstXI restrikcijos endonukleaze. Produkto hidrolizė buvo stebima reakcijos mišinį elektroforezės metu išfrakcionuojant 2 % agarozės gelyje. Plazmidės, kurių PGR produktas buvo hidrolizuotas, išgrynintos „GeneJET Plasmid Purification Kit“ rinkiniu. Visos plazmidės DNR seka nustatyta Nanopore sekoskaitos metodu (SeqVision).

2.2.5. GFP₁₁×7 suliejimas su dFnCas12a (pMR7 ir pMR8 plazmidžių konstravimas)

GFP₁₁×7 fragmentas amplifikuotas PGR metodu, naudojant Phusion polimerazę, BD-1 ir BD-2 pradmenis. pYZ714 ir pMR6 plazmidės ir GFP₁₁×7 fragmentas karpyti su XhoI ir BamHI restrikcijos endonukleazėmis (pagal gamintojo rekomendacijas). Reakcijos mišiniai išgryninti naudojant „GeneJET PCR Purification Kit“ rinkinį. Naudojant T4 ligazę, GFP₁₁×7 fragmentas įliguotas į pMR6 ir pYZ714 vektorių karkasus. Ligavimas vykdomas kambario temperatūroje, 1 val. Tuomet 5 µL ligavimo mišinio transformuoti į *E. coli* DH5α kamieną. Teigiamų *E. coli* transformantų plazmidės tikrintos kolonijų PGR produktą, gautą naudojant MT-17 ir MT-328 pradmenis, išfrakcionuojant 1,5 % agarozės gelyje po elektroforezės. Iš atrinktų transformantų plazmidės išgrynintos „GeneJET Plasmid Purification Kit“ rinkiniu. pMR7 plazmidės, su ADH1 promotoriumi, ir pMR8 plazmidės, su ADH81 promotoriumi, DNR seka nustatyta Nanopore sekoskaitos metodu (SeqVision).

2.2.6. crRNR koduojančios kasetės įklonavimas į pMR7, pMR8 ir pMR13 plazmides

Kiekvieną crRNR koduojanti seka užsakyta iš IDT, kaip atvirkštinis ir tiesioginis pradmuo. Šie pradmenys tarpusavyje suldyti 1,5 mM NaCl buferyje, nuo 95 °C kas 3 sek. temperatūrą sumažinant po 0,1 °C. Suldyti pradmenys į vektorių karkasą (pMR7, pMR8 ar pMR13) įklonuoti Golden Gate metodu, naudojant BsaI restrikcijos endonukleazę ir T4 DNR ligazę, termocikleryje 30 ciklų inkubuojant reakcijos mišinį 1-ajame etape 37 °C, 2 min ir 2-ajame etape 16 °C, 2 min. Tuomet 5 µL reakcijos mišinio transformuoti į *E. coli* DH5α kamieną. Sukonstruota plazmidė buvo tikrinama vykdant kolonijų PGR, naudojant Phusion polimerazę ir MT-230 bei MT-342 pradmenis. Plazmidinė DNR buvo išgryninta naudojant „GeneJET Plasmid Purification Kit“ rinkinį. Visos plazmidės DNR seka nustatyta Nanopore sekoskaitos metodu (SeqVision).

2.2.7. ADH1 promotoriaus keitimas į nmt81

pMR7 plazmidė padauginta PGR metodu, naudojant Phusion polimerazę, MT-347 ir MT-348 pradmenis. Nmt81 promotorius, esantis pFA6a-kanMX6-P81nmt1 plazmidėje, amplifikuotas PGR metodu, naudojant MT-349 ir MT-350 pradmenis. Po DNR sekų amplifikacijos, produktų ilgis įvertintas 1 % agarozės gelyje po elektroforezės. Gauti produktai išgryninti „GeneJET PCR Purification Kit“ rinkiniu. PGR produktai liguoti Gibson klonavimo metodu, naudojant „NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix“. Tuomet 5 µL reakcijos mišinio transformuoti į *E. coli* DH5α kamieną. Sukonstruota plazmidė buvo tikrinama vykdant kolonijų PGR, naudojant Phusion polimerazę ir MT-320 bei MT-357 pradmenis. Plazmidinė DNR buvo išgryninta naudojant „GeneJET Plasmid Purification Kit“ rinkinį. Visos plazmidės DNR seka nustatyta Nanopore sekoskaitos metodu (SeqVision).

2.2.8. Vektorių elektroporacija į *S. pombe* ląsteles

Mielių ląstelės auginamos 10 mL EMM terpėje iki kol mielių kultūros optinis tankis (OD) pasiekia 0,5-0,8. Ląstelės centrifuguojamos 5 min., 3000 aps./min. greičiu. Mielių ląstelių nuosėdos yra resuspenduojamos 1 mL atvėsintu steriliu H₂O ir perkeliama į sterilius 1,5 mL mėgintuvėlius. Tuomet ląstelės vėl yra nusodinamos 4 °C, 2 min., 3000 aps./min. greičiu ir praplaunamos 1 mL 1 M sorbitolio tirpalu. Ląstelės vėl nusodinamos ir resuspenduojamos 1 mL DTT tirpalu bei inkubuojamos 15 min., 30 °C. Po inkubacijos, ląstelės resuspenduojamos lede atvėsintu 160 µL 1 M sorbitolio tirpalu. 40 µL ląstelių tūris yra perkeliama į atvėsintą 1,5 mL mėgintuvėlį su 10 ng DNR, papipetuojamas ir perkeliama į elektroporacijos kiuvetę. Elektroporacija vykdoma 1 M sorbitolio tirpale pagal šiuos parametrus: 2,0 kV, 1 impulsas. Po elektroporacijos mielių ląstelės greitai surenkamos ir greitai užsėjamos ant selektyvios EMM terpės. Lėkštelės apvyniojamos parafilmu ir inkubuojamos 30 °C termostate 4-6 dienas.

2.2.9. *S. pombe* ląstelių paruošimas mikroskopijai

S. pombe kolonija nuo lėkštelės užsėjama į kolbutę su 10 mL EMM terpe ir auginama 16-20 val. purtyklėje, 30 °C, 200 aps./min. Po 16-20 val. inokuliuojamas nedidelis mielių suspensijos tūris į kolbutę su šviežia 10 mL EMM terpe. Persėjamas tūris priklauso nuo ląstelių suspensijos OD. Šviežiai persėtoje terpėje ląstelių koncentracija yra lygi 0,01-0,04 OD/mL, priklausomai nuo auginamo kamieno. Toliau mielės yra auginamos ~13-16 val. purtyklėje, 30 °C, 200 aps./min. iki kol ląstelės pasiekia vidutinę esponentinę fazę. 1 mL mielių suspensijos yra perkeliama į 1,5 mL mėgintuvėlį.

Surenkama tėkmės celė su su oro plazma paveiktu, švari dengiamuoju stikliuku. Į tėkmės celės kanalą suleidžiamas sojų pupelių lektino tirpalas, praskiestas PBS tirpale ir toliau inkubuojamas 7-10 min. Po inkubacijos periodo, tėkmės celės kanalas yra praplaunamas ~2 mL EMM terpės. Mielių suspensija 10 kartų praskiedžiama EMM terpėje ir 2 min. pavartant vorteksuojama. 200 µL praskiestos

S. pombe suspensijos yra suleidžiama į tėkmės kanalą ir ~10-15 min. inkubuojama iki kol ląstelės nusėda ir įmobilizuojasi ant sojų pupelių lektinu padengto dengiamojo stikliuko paviršiaus.

2.2.10. C2566 kamieno vaizdinimas

Darbe aptariami mikroskopijos eksperimentai buvo atlikti naudojantis mūsų tyrimų grupės sukonstruota ir išvystyta mikroskopijos sistema – miEye (Alsamsam et al., 2022).

C2566 kamienas prieš vaizdų registravimą augintas EMM terpėje 1 val. su IPTG (1 mM) arba 16 val. su tetraciklinu (1 µg/mL). Kamienas su *dFnCas12a-GFP_{11x7}* koduojančia plazmide augintas selektyvioje EMM terpėje be uracilo 1 val. su IPTG (1 mM). Mielų ląstelės buvo paruoštos vaizdinimui pagal anksčiau aprašytas procedūras. Vaizdinimo metu buvo pritaikytas epifluorescencinis viso bandinio Z ašies tolygus žadinimas. GFP žadinimui naudotas 488 nm lazerio bangos ilgis, surenkant 65 % GFP emisijos spektro dalį. Tuo tarpu, *tdTomato* žadinimui naudotas 561 nm lazerio bangos ilgis, surenkant 46 % *tdTomato* emisijos spektro dalį. Vaizdai registruojami naudojant 100 ms ekspozicijos trukmę. Analizė atlikta naudojant Fiji programą. Analizės metu 10, vienoje paviršiaus pozicijoje, užregistruotų kadrų buvo suvidurkinti, naudojant vidutinio intensyvumo projekciją.

2.2.11. *S. pombe* ląstelių branduolių, su būdingu vizualiu fluorescenciniu taškeliu, analizė

Ląstelės mikroskopijai buvo paruoštos pagal 2.2.9. aprašytas procedūras. GFP ir *tdTomato* vaizdinimas aprašytas 2.2.10. Kiekvienoje grupėje buvo tiriamos ~8-10 skirtingų paviršiaus pozicijų. Kiekvienoje pozicijoje vizualiai buvo suskaičiuotas bendras branduolių skaičius ir branduolių skaičius su vizualiai nesunkiai aptinkamu fluorescenciniu *tdTomato* ar GFP taškeliu. Kiekvienoje grupėje buvo tiriama 152-165 branduolių imtis. Procentinė, branduolių su aptinkamu GFP ar *tdTomato* taškeliu, dalis atidėta sudarytos histogramos Y ašyje.

2.2.12. *S. pombe* ląstelių fluorescencinio taškelių signalo-fono santykio analizė

Ląstelės mikroskopijai buvo paruoštos pagal 2.2.9. aprašytas procedūras. GFP ir *tdTomato* vaizdinimas aprašytas 2.2.10. Kiekvieną grupę sudarė 21-30 branduolių, su vizualiai aptinkamu taškeliu, imtis. Analizės metu buvo išmatuotas viso branduolio ir taškelių neapdorotas integruotas intensyvumas (angl. *raw integrated density*) bei pikselių, sudarančių branduolį ar taškelį, skaičius. Neapdorotas integruotas intensyvumas apibūdina pasirinktame regione esančių visų pikselių intensyvumo sumą. Branduolio fono vieno pikselio vidutinis intensyvumas buvo apskaičiuotas pagal iš branduolio integruoto intensyvumo atėmus taškelių integruotą intensyvumą ir padalijus iš branduolio foną (be taškelių) sudarančių pikselių skaičiaus. Taškelių signalo-fono santykis buvo apskaičiuotas signalo integruotą intensyvumą padalijus iš branduolio fono vieno pikselio vidutinio intensyvumo. Kiekvienos ląstelės branduolio taškelių signalo-fono santykis atidėtas stačiakampėje diagramoje.

2.2.13. *E. coli* augimo ribojimo eksperimentai

SpCas9-eGFP-HaloTag ir *FnCas12a-eGFP-HaloTag* sulietinių baltymų pSMART žiedinio substrato kirpimo įvertinimui ir skirtingų sgRNR įtakos *SpCas9* baltymo kirpimo įvertinimui buvo atlikti *in vivo* augimo ribojimo eksperimentai. *E. coli* DH10B kamieno, transformuoto su pSMART ir pBAD-*SpCas9-eGFP-HaloTag* arba pBAD-*FnCas12a-eGFP-HaloTag* plazmidėmis arba, atitinkamai, transformuoto su pSMART ir skirtingas sgRNR koduojančiomis plazmidėmis, kolonijos užsėtos į 4 mL LB skystą terpę su karbenicilinu (50 µg/mL) ir chloramfenikoliu (25 µg/mL) ir augintos 16-18 val. purtyklėje, 37 °C, 200 aps./min. Po 16-18 val., 100 µL *E. coli* suspensijos persėta į 4 mL šviežią LB terpę su atitinkamais antibiotikais ir inkubuojama 2-4 val., 37 °C purtyklėje, 200 aps./min., iki kol kultūros optinis tankis (angl. *optical density*, OD) pasiekia 0,5-0,6. Tuomet ~1 mL ląstelių suspensijos staigiai perkeltos į ledo vonelę ir 3 kartus praplautos su atvėsintu steriliu H₂O, centrifuguojant 4 °C, 2 min., 6000 aps./min. greičiu. Galiausiai, ląstelės resuspenduojamos 100 µL steriliame H₂O su 2 µL, 10 ng/µL koncentracijos plazmidiniu vektoriumi, koduojančiu sgRNR arba crRNR, o tarp taikininės DNR ir sgRNR bazių neatitikimo įtakos substrato kirpimo įvertinimo atveju – elektroporuojamas plazmidinis vektorius, koduojantis pBAD-*FnCas12a-eGFP-HaloTag*. Ląstelės surenkamos ir perkeliama į atvėsintas elektroporacijos kiuvetes. Elektroporacija vykdoma BIO-RAD elektroporatoriuje pagal šiuos parametrus: 1,8 kV, 1 impulsas. Po elektroporacijos ląstelės greitai perkeliama į LB terpę ir 1 val. inkubuojamos purtyklėje, 37 °C, 200 aps./min. Po inkubacijos, ląstelės 1× praplaunamos steriliame H₂O ir resuspenduojamos 100 µL M9 terpėje. Tuomet M9 terpėje atliekami serijiniai 10× skiedimai ir 5 µL kiekvieno skiedimo taškuojami ant augimą neribojančios ir augimą ribojančios (su 0,2% L-arabinoze) agarizuotos M9 terpės lėkštelių. Lėkštelės inkubuojamos 20 val. 37 °C oriniame termostate.

2.2.14. *E. coli* plazmidinių vektorių konstravimas

crRNR koduojantis vektorius buvo sukonstruotas pRZ170 plazmidėje pakeitus atsparumo antibiotikui geną ir crRNR kasetę. Gibson klonavimo metodu chloramfenikoliui atsparumo genas buvo pakeistas į *kanR*. Tuo tarpu, crRNR kasetė įklonuota pRZ170 vektorių amplifikuojant PGR metodu ir naudojant pradmenis su iškyšomis. PGR produkto ilgis įvertintas elektroforezės metodu. Galai fosforilinti su T4 PNK kinaze (pagal gamintojo rekomendacijas). Vektorius recirkuliarizuotas ligavimo metodu, naudojant T4 DNR ligazę (pagal gamintojo rekomendacijas). Ligavimo mišinys cheminės transformacijos būdu transformuotas į kompetentines DH5α kamieno ląsteles. Sėkmingas ligavimas patikrintas kolonijų PGR produktą karpant su Eco52I restrikcijos endonukleaze ir visos plazmidės sekoskaita (SeqVision).

Laukinio tipo *FnCas12a-eGFP-HaloTag* baltymą koduojantis plazmidinis vektorius sukonstruotas Gibsono klonavimo būdu prie pTK145 esančio *FnCas12a* geno priliejant eGFP-HaloTag

koduojančią seką. Sėkmingai sukonstruotas vektorius patikrintas kolonijų PGR ir visos plazmidės sekoskaita (SeqVision).

CRISPR-Cas9 sistemos sgRNR koduojančio vektoriaus sgRNR pakeista vykdant visos plazmidės PGR su iškyšas turinčiais pradmenimis. PGR produkto ilgis įvertintas elektroforezės metodu. Galai fosforilinti su T4 PNK kinaze (pagal gamintojo rekomendacijas). Vektorius recirkuliarizuotas ligavimo metodu, naudojant T4 DNR ligazę (pagal gamintojo rekomendacijas). Ligavimo mišinys cheminės transformacijos būdu transformuotas į kompetentines DH5α kamieno ląsteles. Sėkmingas ligavimas patikrintas vykdant visos plazmidės sekoskaita (SeqVision).

2.2.15. *E. coli* cheminė transformacija

E. coli DH5α arba DH10B kamienas nuo agarizuotos LB terpės užsėjamas į 4 mL skystą LB terpę ir inkubuojamas 16-18 val. purtyklėje, 37 °C, 200 aps./min. 100 µL *E. coli* suspensijos persėjama į 4 mL šviežią LB terpę ir inkubuojama 2-4 val., 37 °C purtyklėje, 200 aps./min., iki kol kultūros OD pasiekia 0,5-0,6. 1 mL *E. coli* suspensijos perkeliama į atvėsintą 1.5 mL mėgintuvėlį ir centrifuguojama 4 °C, 2 min., 6000 aps./min. greičiu. Ląstelių nuosėdos resuspenduojamos 1 mL Na⁺ tirpale ir centrifuguojamos 2 min., 6000 aps./min. greičiu. Susidariusios ląstelių nuosėdos resuspenduojamos 1 mL Ca²⁺ tirpale ir 30 min. inkubuojamos lede. Paruoštos kompetentinės ląstelės centrifuguojamos 2 min., 6000 aps./min. greičiu ir resuspenduojamos 70 µL Ca²⁺ tirpale su 1-5 ng plazmidiniu DNR vektoriumi. Ląstelės su DNR papildomai 30 min. inkubuojamos lede. Po 30 min. mėgintuvėliai perkeliama į 42 °C vandens vonelę ir inkubuojami 45 sek., tuomet greitai perkeliama į ledą ir inkubuojami 2 min. Į 1,5 mL mėgintuvėlius įpilama 900 µL LB terpės. Tuomet transformuotos *E. coli* ląstelės 1 val. inkubuojamos 37 °C purtyklėje, 200 aps./min. Po inkubacijos ląstelės centrifuguojamos o susidariusios ląstelių nuosėdos yra užsėjamos ant agarizuotos mitybinės LB terpės su atitinkamais antibiotikais. Lėkštelės inkubuojamos oriniame 37 °C termostate, 16-18 val.

2.2.16. *E. coli* mikroskopija

E. coli DH10B kamieno, transformuoto su pBAD-SpCas9-eGFP-HaloTag arba pBAD-FnCas12a-eGFP-HaloTag, substratiniu DNR vektoriumi – pSMART ir sgRNR arba, atitinkamai, crRNR koduojančiu vektoriumi, ~5-10 kolonijos užsėtos į 4 mL M9 terpės su chloramfenikoliu (25 µg/mL), kanamicinu (50 µg/mL) ir karbenicilinu (50 µg/mL). *E. coli* auginta 16-18 val. purtyklėje, 37 arba 30 °C, 200 aps./min. Po 16-18 val. 150 µL *E. coli* kultūros suspensijos persėta į šviežią M9 terpę su atitinkamais antibiotikais ir 3-5 val. auginta purtyklėje, 37 arba 30 °C, 200 aps./min. Ląstelių OD pasiekus 0,5-0,6, ląstelės greitai perkeliama į ledo vonelę.

Tėkmės celė surenkama su oro plazma paveiktu, švairiu dengiamuoju stikliuku. Į tėkmės celę suleidžiamas 0,015% chitozano tirpalas, praskiestas steriliame H₂O ir inkubuojamas 7-10 min. Tuomet tėkmės celė yra praplaunama 1 mL M9 terpės. 3 kartus M9 terpėje praskiedžiama ląstelių suspensija ir

suleidžiama į tėkmės celę. Tėkmės celė centrifuguojama $1000\times g$, 5 min. Ant stiklo paviršiaus neįmobilizuotos ląstelės yra nuplaunamos 2-3 mL M9 terpės, 2,6 mL/min tėkmės greičiu. Vaizdai yra registruojami naudojant 1,49 skaitmeninės apertūros $60\times$ didinimo objektyvą, bandinį apšviečiant daugiamode skaidula paremtu žadinimu. Emisijos kelyje naudotas filtras, praleidžiantis bangos ilgį, esantį 502,5-547,5 nm intervale. Vaizdų registravimo metu mikroskopo kamera yra papildomai vėsinama iki 16 °C. Vaizdai buvo registruojami naudojant skirtingos 488 nm bangos ilgio lazerio galias, 50 ms trukmės ekspoziciją. Užregistruoti vaizdai papildomai apdoroti Fiji programa.

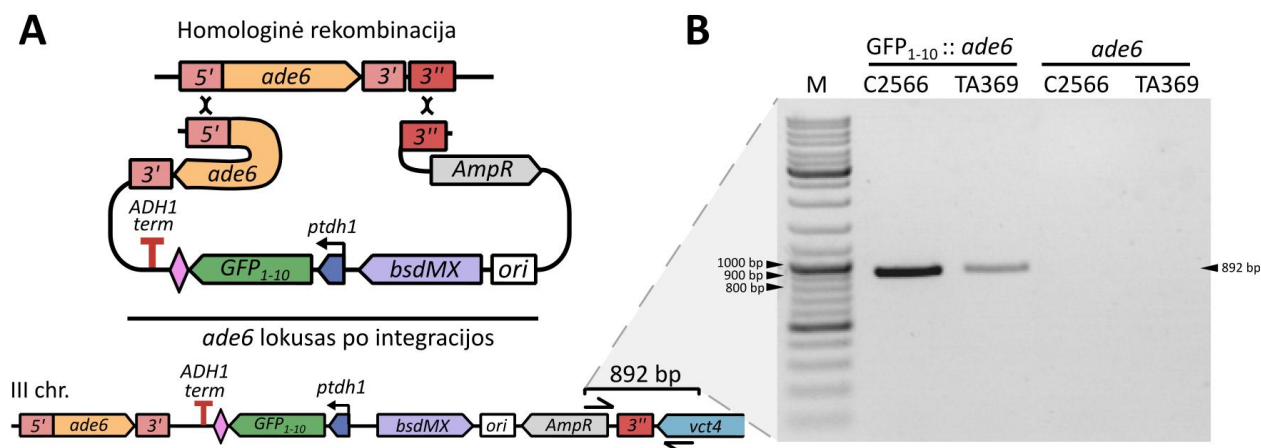
3. Rezultatai

3.1. *S. pombe* genominės DNR fluorescencinio žymėjimo optimizacija

Skirtingų genomo DNR lokusų vaizdinimas yra svarbi chromatino organizacijos ir chromosomų dinamikos tyrimų dalis. Šiuo metu egzistuojantys žymėjimo metodai turi trūkumų. Mūsų anksčiau sugalvota strategija teoriškai galėtų leisti juos išspręsti. Taigi, šio darbo metu buvo pradėta vystyti CRISPR-Cas sistema paremta genominės DNR lokusų žymėjimo strategija *in vivo*. Kaip tyrimų objektą buvo nuspręsta naudoti *Schizosaccharomyces pombe* modelinį organizmą, o fluorescenciniam genetinių lokusų žymėjimui buvo pasirinktas CRISPR-Cas sistemos V tipo *Francisella novicida* dCas12a baltymas, sulietas su fluorescenciniu baltymu. Šio darbo metu buvo konstruojama *S. pombe* chromatino lokusų vaizdinimui reikalinga sistema.

Fluorescenciniam vaizdinimui buvo pritaikyta dviejų žaliai fluorescuojančio baltymo (GFP) fragmentų (GFP 1-10 ir 11-oji β klostės) sistema, kurių raiška yra vykdoma nuo atskirų promotorių. Tik po šių fragmentų spontaninės komplementacijos, kuriai yra būdingas didelis afiniškumas ir itin stabili sąveika (disociacija beveik nestebima), yra atstatoma pilna GFP tretinė struktūra, reikalinga chromoforo brendimui ir fluorescencijai.

Visų pirma, genetiškai buvo modifikuojamas šios strategijos įgyvendinimui pasirinktas ir turimas C2566 *S. pombe* kamienas (Petrova et al., 2013), kuris koduoja FROS sistemą. Tolimesnių darbų metu buvo modifikuotas ir naujai gautas TA369 kamienas (Weisman et al., 2005), kuris primena laukinio tipo kamieną. Linearizuota plazmidė, koduojanti *GFP₁₋₁₀* geną, homologinės rekombinacijos būdu, buvo integruota į *ade6* lokusą, taip atstatant C2566 kamieno auksotrofiškumą *ade6* atžvilgiu (3.1A pav.). Sėkminga DNR vektoriaus integracija buvo įvertinta agarozės gelio elektroforezės metodu, nustatant amplifikuoto PGR produkto ilgį (3.1B pav.) ir Sanger sekoskaita.



3.1 pav. *GFP₁₋₁₀* integracija į *S. pombe* genomą. (A) Integracijos strategija ir integruojamos linijinės DNR sekos elementai. **(B)** PGR produktai agaroziniame gelyje, gauti PGR metodu amplifikuojant integruoto fragmento ir genomo sandūrą.

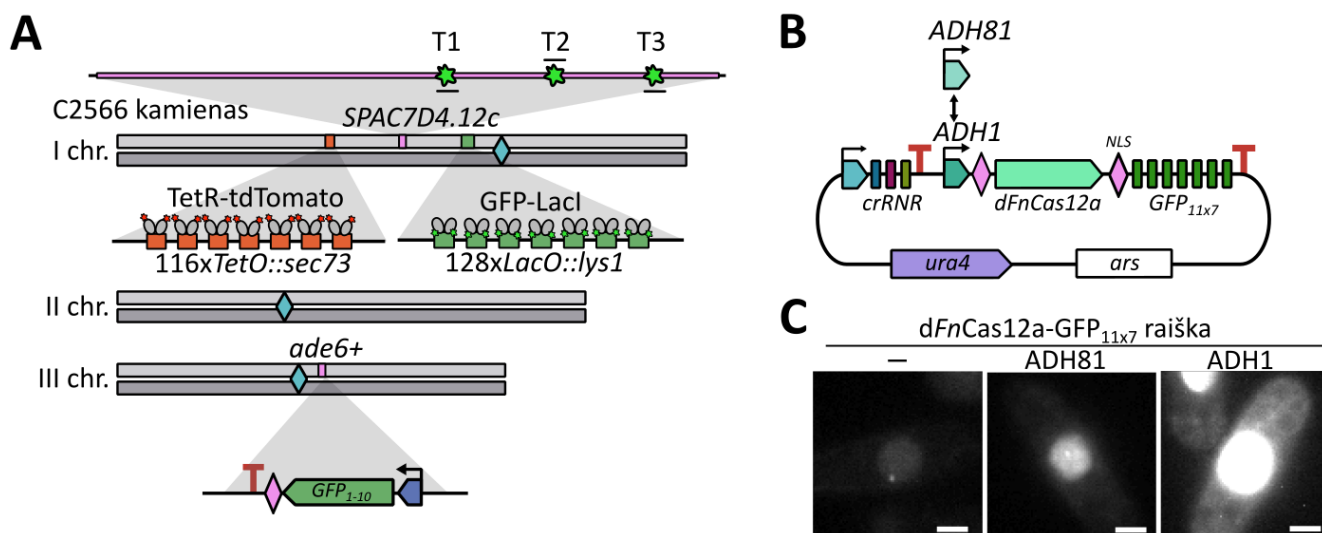
GFP₁₋₁₀ fragmento raiška yra vykdoma nuo stipraus konstatyvaus *tdh1* promotoriaus, taip siekiant palaikyti didesnę šio fragmento koncentraciją ląstelėje, lyginant su *dFnCas12a-GFP_{11×7}* konstruktu. Tokiu būdu – tikslingai padidinti GFP atskirų fragmentų komplementacijos tikimybę ir, tuo pačiu, išlaikyti nedidelį *dFnCas12a-GFP_{11×7}* molekulių skaičių branduolyje.

Fluorescenciškai žymėtas dCas12a baltymas, prisijungęs prie genetinio lokuso, lokalizuojasi branduolio plote ir atrodo kaip difrakcijos apribotas (< 300 nm dydžio) individualus fluorescuojantis taškelis, kuris juda tokiu pat greičiu kaip chromosoma. Kadangi užregistruoto kadro ekspozicijos trukmė yra sąlyginai trumpa (100 ms), specifiškai prisijungęs fluorescuojantis taškelis atrodo nejudantis. Tuo tarpu neprisijungęs fluorescenciškai žymėti dCas12a baltymai greitai difunduoja branduolyje ir sukelia susiliejusį foną. Jei lokuse yra bent keli DNR taikiniai ir prie jų sėkmingai prisijungia fluorescenciškai žymėti dCas12a, tada minėto taškelio kontrastas padidėja. Taigi genetinį lokusą atspindinčio taškelio kontrastas yra atvirkščiai proporcingas nuo raiškos ir tiesiogiai proporcingas nuo prisijungusio baltymo kiekio.

dFnCas12a-GFP_{11×7} nukreipimas į FROS sistemą turinčią *S pombe* chromosomą gali papildomai pasitarnauti minėto taškelio aptikimui ir erdvinei lokalizacijai branduolyje. Vienas iš tokių variantų, yra fluorescenciškai žymėto *dFnCas12a* baltymo nutaikymas į taikininę seką, esančią tarp *LacO* ir *TetO* sekų pasikartojimų I chromosomoje. Taigi, sėkmingo *dFnCas12a-GFP_{11×7}* prisijungimo prie šio taikinio atveju, turėtume matyti du žaliai fluorescuojančius taškus (1-as – GFP-LacI, 2-as – *dFnCas12a-GFP_{11×7}*) ir vieną geltonai fluorescuojantį taškelį (TetR-tdTomato). Šių taškų kontrastas vaizduose priklauso nuo fono lygio, esant žemam fonui, kontrastas turėtų būti didesnis.

Turėdami tai mintyje, genominės DNR žymėjimo darbus pradėjome C2566 kamienne, su genome integruotu *GFP₁₋₁₀* fragmentą koduojančiu genu bei FROS sistema. Pirminių eksperimentų metu buvo pasirinktos trys DNR taikininės sekos, *SPAC7D4.12c* lokuse. *SPAC7D.12c* lokusas yra išsidėstęs ~1,1 Mb atstumu nuo *LacO* ir ~1,1 Mb atstumu nuo *TetO* pasikartojančių sekų (3.2A pav.). Siekiant įvertinti ir palyginti fluorescenciškai žymėto *dFnCas12a* raišką ir jos įtaką signalo aptikimui, buvo sukonstruoti du plazmidžių variantai, kuriuose *dFnCas12a* raiška vyksta nuo konstatyvaus stipraus ADH1 arba silpnescio – ADH81 promotoriaus (3.2B pav.). Replikatyviniai mielių vektoriai buvo elektroporuoti į C2566 kamieną. Tolimesnių teigiamų C2566 transformantų epifluorescencinių vaizdinimų metu buvo

perdengti žalio ir raudono kanalų vaizdai, vizualiai palyginta skirtingų promotorių raiška (3.2C pav.).



3.2 pav. dFnCas12a fluorescencinio DNR žymėjimo strategijos pritaikymas FROS sistemą koduojančiame C2566 kamiene. **(A)** C2566 kamieno FROS sistemos ir dFnCas12a baltymo taikinių išsidėstymas genome, vienas kito atžvilgiu. **(B)** Mielių replikatyviniai vektoriai, koduojantys dFnCas12a-GFP_{11x7} ir crRNR kasetę. **(C)** Vizualus DNR žymėjimo strategijos vizualizavimas gyvoje *S. pombe* ląstelėse. Vaizdų ryškumo skalės suvienodintos. Skalė 2 μm.

Remiantis šiais rezultatais, buvo gauti keli pastebėjimai. Pirma, *S. pombe* kamieno, su pilna DNR žymėjimo sistema, branduolio fluorescencija yra didesnė už kontrolinę grupę, kurioje buvo vaizduojamas *S. pombe* kamienas, netransformuotas su dFnCas12a koduojančiu vektoriumi. Antra, vyksta dFnCas12a-GFP_{11x7} ir GFP₁₋₁₀ nepriklausoma raiška ir abu komponentai yra transportuojami į branduolį. Trečia, dFnCas12a baltymo raiškos lygio padidėjimas tiesiogiai koreliuoja su didesne branduolio fluorescencija, kurią užtikrina mūsų pasirinktoje biologinėje sistemoje teisingai vykstanti spontaniinė GFP_{11x7} ir GFP₁₋₁₀ fragmentų komplementacija. Ketvirta, net ir su mažesniu branduolio fonu, dFnCas12a-GFP_{11x7} prisijungimo taškų nepastebėjome, todėl yra reikalinga tolimesnė sistemos optimizacija.

FROS sistemos integracija į C2566 *S. pombe* genomą ir, to pasekoje, vykstanti GFP-LacI baltymo raiška (ne visas GFP-LacI yra prisijungęs prie *LacO* sekų masyvo) lemia branduolio fluorescencinį foną, kuris stebimas žaliame spektriniame kanale, bandinį žadinant su 488 nm bangos ilgiu. Su šio ilgio bangos spinduliuote yra žadinamas ir dFnCas12a-GFP_{11x7} baltymas.

FROS sistemos pasitelkimas fluorescenciškai žymėto dFnCas12a-GFP_{11x7} prisijungimo vietų paprastesniam išsiaiškinimui turi potencialo, nes šiame kamiene jau yra koduojami du fluorescuojantys atskaitos taškai: su *LacO* sekomis sąveikaujantis GFP-LacI ir su *TetO* sekomis sąveikaujantis TetR-tdTomato. Tačiau aukštas branduolio fonas sumažina taškelių kontrastą ir apsunkina dFnCas12a-GFP_{11x7} vaizdinimą. Taigi, žymėjimo strategijos optimizacijos etapuose nusprendėme pritaikyti naujai gautą, fluorescencinių baltymų nekoduojantį, uracilui auktrofį kamieną – TA369, į kurio genomą įterpėme GFP₁₋₁₀ fragmentą.

Siekdami įvertinti koreliaciją tarp fluorescenciškai žymėto dCas12a ekspresijos lygio ir branduolio fono, sukonstravome DNR vektorius, turinčius d*Fn*Cas12a-GFP_{11×7} koduojančio geno 3 promotorių variantus: ADH1, ADH81 ir nmt81 (3.3A pav.). Nmt81 promotorius papildomai gali būti slopinamas mielių augimo terpę praturtinant tiaminu, todėl iš viso galėjome patikrinti keturis d*Fn*Cas12a-GFP_{11×7} baltymo raiškos intensyvumus. Siekdami stebėti ryškų taškelį, kuris atsiranda dėl prie chromosomos prisijungusio d*Fn*Cas12a, fluorescenciškai žymėtą d*Fn*Cas12a-GFP_{11×7} baltymą, nutaikėme į 3 skirtingas sritis *SPAC7D4.12c* lokuse (3.3B pav.). Raišką nuo skirtingų promotorių galėjome įvertinti matuodami ląstelės branduolio fluorescenciją (3.3C pav.).

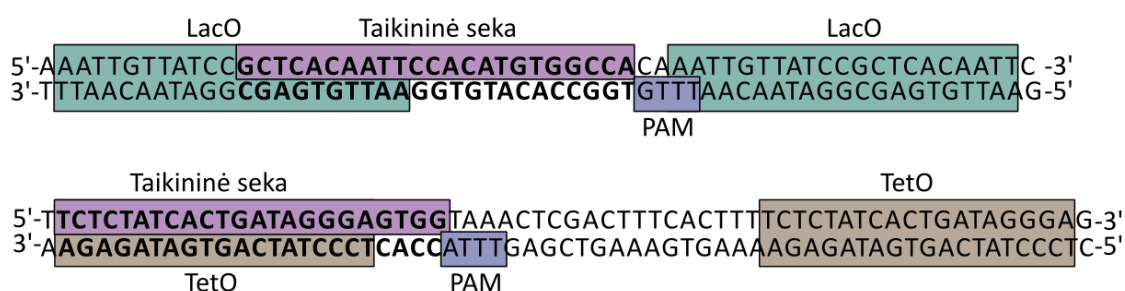
Stebėjimai patvirtino, kad ADH1 promotorius yra netinkamas, nes sukelia didelį fluorescencinį foną. Raišką nuo ADH81 promotoriaus lėmė vidutinį branduolio fluorescencinį foną. Siekdami ląstelės branduolyje palaikyti nedidelį fluorescencinį foną, tolimesniems darbams pasirinkome silpniausią nmt81 promotorių.

Nutaikius d*Fn*Cas12a-GFP_{11×7} baltymo-nukleorūgšties kompleksą į 3 skirtingus taikinius *SPAC7D4.12c* lokuse, už branduolio foną ryškesnis fluorescencinis taškelis branduolio plote nebuvo stebimas. Tai nebūtinai reiškia, kad d*Fn*Cas12a-GFP_{11×7} nesijungia prie chromosomos lokuso. Vienas iš paaiškinimų yra, kad ant lokuso prisijungusių baltymų kiekis yra nepakankamas, kad jų suminis signalo lygis perkoptų fono lygį. Todėl, toliau tęsdami darbus, pasirinkome įvertinti d*Fn*Cas12a-GFP_{11×7} taškelio aptikimą, papildomai, baltymą nutaikius į 3 sritis *ade6* gene arba į 9 skirtingas sritis *SPAC7D4.12c* lokuse (3.3B pav.). Didesnis taikininių DNR sekų kiekis lemia didesnę d*Fn*Cas12a-GFP_{11×7} RNP kompleksų skaičiaus išsidėstymą greta, o tai gali padėti išgauti stipresnį fluorescuojantį taškelį. Vaizdai buvo registruojami skenuojant bandinį pagal Z ašį, atliekant 400 nm žingsnį (3.3D pav.). Visgi vieno užtektinai ryškaus GFP fluorescencinio taškelio branduolio plote pastebėti nepavyko, vietoje to buvo stebimi keli intensyvesni taškai, kurie galėjo atsirasti dėl įvairių su d*Fn*Cas12a-GFP_{11×7} baltymo-nukleorūgšties kompleksu susijusių priežasčių: nespecifinės kompleksų sąveikos su DNR, lėtesnio kompleksų difuzijos greičio tam tikrose branduolio dalyse, kompleksų agregacijos ar kt.

darbams pasirinkome nmt81 promotorių. Taip pat buvo išbandyta keletas tikslinio lokuso žymėjimo variantų, tačiau nei viename iš jų tikslo lokuso fluorescencinio taškelio pastebėti nepavyko.

3.2. dFnCas12a-GFP_{11×7} nutaikymas į FROS sistemos pasikartojančias sekas

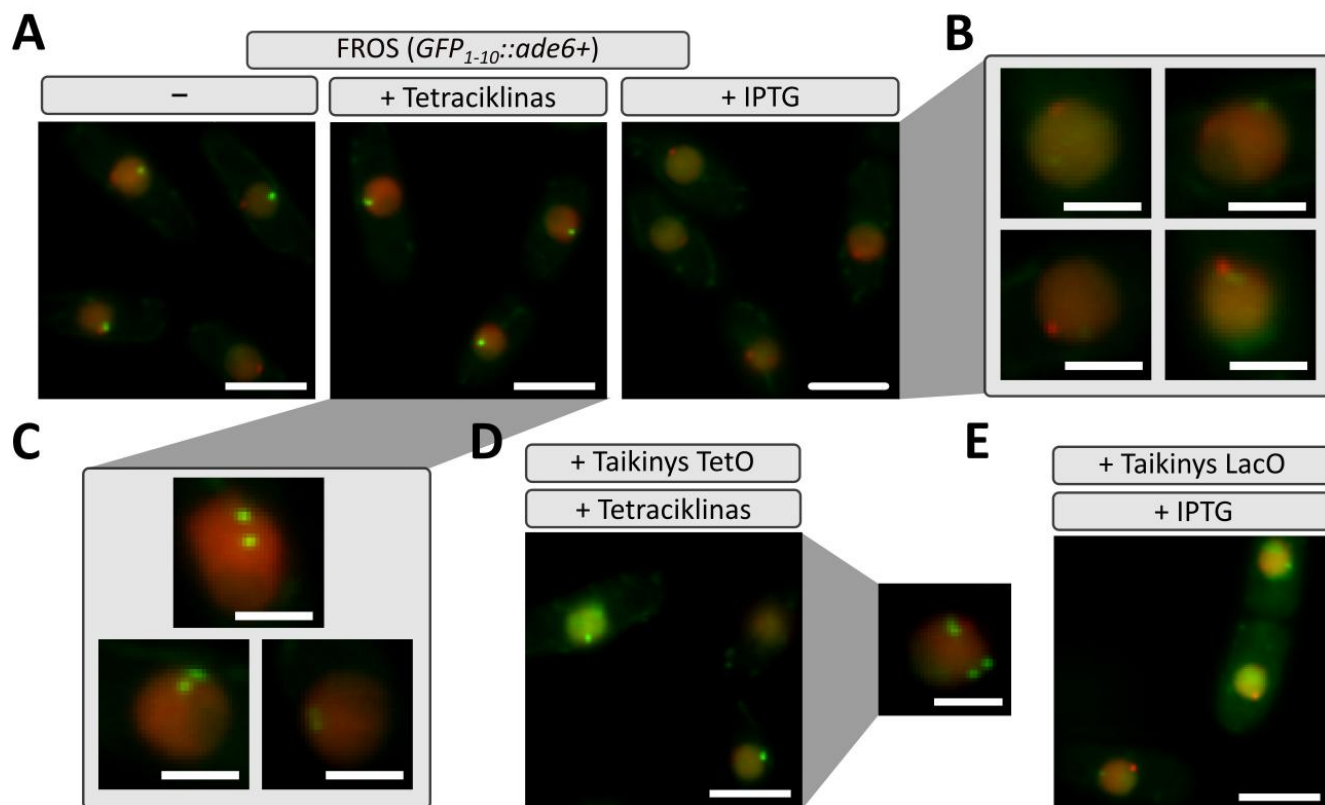
Ankstyvųjų tyrimų metu nepavyko pastebėti tikslinio dFnCas12a-GFP_{11×7} prisijungimo įvykio, kuris gali būti identifikuojamas kaip, *S. pombe* branduolio plote esantis, fluorescencinis taškelis. Taip galėjo atsitikti dėl keleto priežasčių: per mažo taikinių sekų skaičiaus, taikinių neprieinamumo ir t.t. Todėl, tolimesnių darbų metu buvo siekiama dFnCas12a-GFP_{11×7} RNP kompleksą nutaikyti į C2566 kamieno pasikartojančias 128×*LacO* ir 116×*TetO* sekas (Schiklenk et al., 2018; Petrova et al., 2013). Toks nutaikymas į pasikartojančias sekas turėtų sukelti didesnę taškelio (esančio branduolio fone) kontrastą. Taškelio aptikimo atveju būtų galima daryti išvadą, kad šis baltymas gali prisijungti prie taikinio lokuso. Tačiau, kad galėtume nutaikyti į sekas, mums pirma reikėjo išsiaiškinti kokia yra į šį kamieną įterpto *LacO/TetO* masyvo seka. Ši informacija nebuvo publikuota. Todėl nutarėme nusekvenuoti turimą C2566 kamieno, koduojančio GFP₁₋₁₀ fragmentą, genomą. Kiek mums žinoma, mes esame pirmi, kurie šiame darbe nusekvenavome C2566 kamieno, koduojančio GFP₁₋₁₀ fragmentą, genomą, pritaikydami NanoPore sekoskaitos metodą. Iki šiol nebuvo žinoma į *S. pombe* genomą integruotų *LacO* ir *TetO* DNR motyvų seka. Sekoskaitos rezultatai ir tolimesnė pasikartojančių sekų paieška atskleidė *TetO* ir *LacO* elementų skaičių, DNR sekas bei išsidėstymą genome. Skirtingai nei pateikta literatūroje (Schiklenk et al., 2018; Petrova et al., 2013), C2566 kamiene iš viso buvo aptiktos 62×*LacO* ir 73×*TetO* sekos. Žinodami sekas, galėjome parinkti tinkamus taikinius, šalia kurių yra išsidėsčiusi PAM seka ir į šiuos pasikartojančius elementus nukreipti dFnCas12a-GFP_{11×7} RNP kompleksą (3.4 pav.).



3.4 pav. FROS operatorių DNR sekos, nustatytos nanoporos sekoskaitos metodu ir pasirinktos *FnCas12a* taikininės DNR sekos.

dFnCas12a-nukleorūgšties komplekso sąveikai su taikinine DNR yra reikalingas šių *LacO* ir *TetO* sekų atlaisvinimas. C2566 kamiene su jomis sąveikauja, atitinkamai LacI ir TetR baltymai. GFP-LacI ir TetR-tdTomato baltymų disociacija nuo jiems giminingų operatoriaus sekų buvo skatinama *S. pombe* mielių kultūroje kultivuojant minimalioje terpėje, praturtintoje IPTG arba tetraciklinu (3.5A pav.). Tiesa, nors auginant *S. pombe* terpėje su tetraciklinu pavyko pasiekti 100 % *TetO* sekų atlaisvinimą

(3.6A pav.), tokių pačių rezultatų nepavyko pasiekti LacO operatoriaus atžvilgiu. Silpnas LacI signalas buvo stebimas ~29 % tirtų branduolių (3.5B pav. ir 3.6A pav.).

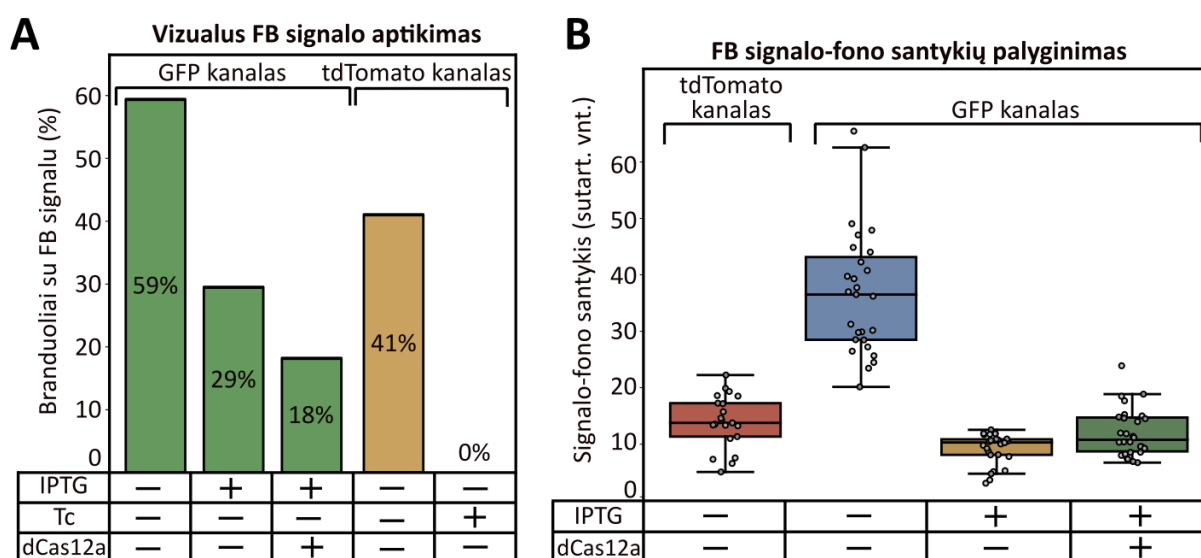


3.5 pav. dFnCas12a RNP komplekso nukreipimo į FROS pasikartojančius elementus strategija. **(A)** Tetraciklino ir IPTG poveikis TetR-tdTomato ir GFP-LacI disociacijai nuo TetO ir LacO sekų. Skalė 5 μ m. **(B)** Nevisiška GFP-LacI disociacija nuo LacO sekų terpėje esant IPTG. Skalė 2 μ m. **(C)** 2 GFP-LacI signalai. Skalė 2 μ m. **(D)** dFnCas12a-GFP_{11x7} nutaikymas į FROS LacO sekas. Skalė 5 μ m. **(E)** dFnCas12a-GFP_{11x7} nutaikymas į FROS TetO sekas. Skalė 5 μ m. Visų lyginamų vaizdų skalės suvienodintos.

Pirmiausia nutaikėme dFnCas12a-GFP_{11x7} į FROS sistemos *TetO* (3.5D pav.) arba *LacO* (3.5E pav.) sekas. Jeigu dFnCas12a-GFP_{11x7} sąveikauja su taikinine DNR seka, persidengiančia su *TetO*, tai ląstelių branduoliuose turėtume stebėti ≥ 2 fluorescencinius taškelius. GFP kanale, 1 arba, kai kuriose ląstelėse, 2 taškai (3.5C pav.) yra aptinkami dėl FROS sistemos GFP-LacI sąveikos su *LacO*. 2 fluorescuojantys taškai gali būti aptinkami po DNR replikacijos. Todėl dFnCas12a-GFP_{11x7} sąveikos su *TetO* seka atveju, turėtume aptikti papildomus 1 arba 2 GFP taškelius. Didžiojoje dalyje ląstelių buvo stebimi ≤ 2 fluorescenciniai signalai. Tačiau avyko aptikti pavienes ląsteles su 3 fluorescenciniais signalais (3.5D pav.), kas neatmeta hipotezės, kad dFnCas12a-GFP_{11x7} sąveikauja su taikinine seka.

dFnCas12a-GFP_{11x7} sėkmingo nutaikymo į taikininę seką, persidengiančią su *LacO*, atveju tikėtumėmės stebėti GFP taškelio atsiradimą branduolio plote arba šio taškelio kontrasto padidėjimą. Svarbu paminėti, kad tik apie 18 % visų ląstelių branduolių buvo stebimas GFP taškelis (3.5E pav. ir

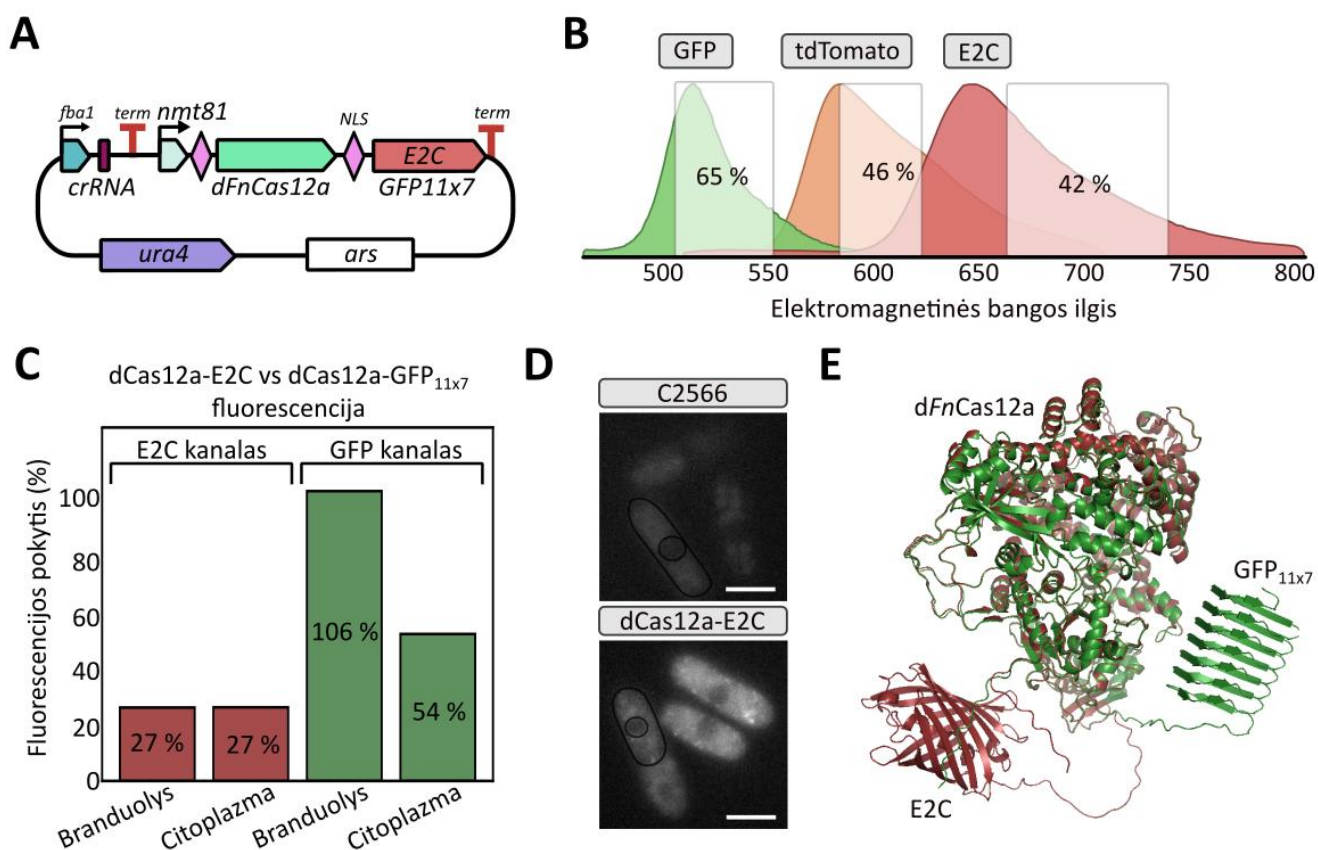
3.6A pav.). Tolimesnės analizės metu buvo palyginti tdTomato kanale ir GFP kanale, branduolio plote esančių, taškelių-fonų santykiai (3.6B pav.). Buvo nustatyta, kad GFP kanale, esant dFnCas12a-GFP_{11×7} baltymo ekspresijai, bet nesant Tc ar IPTG, GFP-LacI taškelis buvo aptiktas 59 % ląstelių branduolių ir pasižymėjo aukštu signalo-fono santykiu (vidurkis – 36,9 sutart. vnt.), tuo tarpu tdTomato kanale, kuriame buvo stebima TetR-tdTomato taškai, šis santykis siekė tik 14,0 sutart. vnt., ir buvo stebimas tik 41 % tirtuose branduoliuose. IPTG pridėjimas skatino GFP-LacI disociaciją nuo *LacO* sekų, o tai lėmė 29% ląstelių branduoliuose vis dar aptinkamą, tačiau žemo signalo-fono santykio GFP taškelį (vidurkis – 9,2 sutart. vnt.). Galiausiai, sąlygomis, kai buvo pridėtas IPTG ir kartu ekspresuojamas dFnCas12a-GFP_{11×7}, taškelių signalas GFP kanale išliko nedidelis. Vidutinis signalo-fono santykis siekė tik 12,0 sutart. vnt. (3.6B pav.).



3.6 pav. Žymėjimo efektyvumo ir fluorescencinio signalo-fono santykio analizė GFP ir tdTomato kanaluose. **(A)** Branduolių, su vizualiai aptinkamu FB signalu, procentinis pasiskirstymas skirtingomis sąlygomis GFP ir tdTomato kanaluose. **(B)** FB signalo-fono santykių palyginimas tarp skirtingų grupių. dCas12a nurodo su GFP_{11×7} sulietą dFnCas12a variantą.

Kitas aspektas, kodėl galėjo nesimatyti ryškaus taškelių branduolio fone, galėtų būti tai, kad GFP tag'as neleido baltymui jungtis prie taikinių sekų. Be to, dFnCas12a-GFP_{11×7} sulietinio baltymo emisijos spektras yra toks pat kaip GFP-LacI todėl fonas sumuojasi. Todėl tolimesnių darbų metu buvo sukonstruotas dar vienas mielių vektoriaus variantas, koduojantis dFnCas12a-E2 Crimson (E2C) sulietinį baltymą (3.7A pav.). Skirtingai nuo dFnCas12a-GFP_{11×7}, kurio fluorescencinis signalas persidengia su GFP-LacI signalu, E2C fluorescencinis baltymas turi su FROS sistemos reporteriais nepersidengiantį emisijos maksimumą (3.7B pav.).

Šių tyrimų metu į *LacO* ir *TetO* sekas buvo nutaikytas su E2C sulietas dFnCas12a RNP kompleksas. Darbo metu naudotas 638 nm lazerio bangos ilgis buvo tinkamas tik E2C, bet ne kitų fluorescencinių baltymų, sužaditimui.



3.7 pav. dFnCas12a-E2C sulietinio baltymo nutaikymas į pasikartojančias FROS sistemos sekas. **(A)** Darbe pritaikytų mielių DNR vektorių variantai. **(B)** E2C ir FROS koduojamų fluorescencinių baltymų emisijos spektrai. Darbe naudotų fluorescencinių baltymų emisijos filtrų sugertis (%) pavaizduota skaidriais stačiakampiais. **(C)** dFnCas12a-E2C arba dFnCas12a-GFP_{11x7} sulietinių baltymų ekspresijos įtaka fluorescencijos procentiniam padidėjimui branduolio ar citoplazmose srityse. **(D)** Fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, vaizduojantys kontrolinio C2566 kamieno autofluorescenciją (viršutinis vaizdas), žadinant su 638 nm bangos ilgiu ir dFnCas12a-E2C ekspresuojančių ląstelių fluorescenciją (apatinis vaizdas). Juoda spalva apibrauktos ląstelės ir branduolys atitinka tirtų imčių branduolio ir citoplazmos vidurkius, +/- 1 sutart. vnt. Skalė 5 μm. **(E)** dFnCas12a-E2C ir dFnCas12a-GFP_{11x7} sulietinių baltymų perdengti struktūrų modeliai. Struktūros padarytos naudojantis AlphaFold 3 versija. Struktūros perdengtos naudojantis PyMOL programa.

Sulietinio dFnCas12a-E2C baltymo ekspresija lėmė fluorescencijos padidėjimą 27-iais % citoplazmoje ir branduolyje, lyginant su C2566 kamieniu, kuriame dFnCas12a-E2C baltymo ekspresija nevyko (3.7C pav.). Tą atspindi ir fluorescencinės mikroskopijos vaizdai (3.7D pav.). Tuo tarpu dFnCas12a-GFP_{11x7} sulietinio baltymo raiška lėmė 106 % fluorescencijos padidėjimą branduolyje ir tik 54 % citoplazmoje. Su E2C ar GFP_{11x7} sulietų dFnCas12a baltymų struktūrų modeliavimas atskleidė fluorescencinių baltymų ar jų fragmentų išsidėstymą erdvėje (3.7E pav.). Pagal struktūrų analizę galima manyti, kad abu sulietiniai dFnCas12a baltymai susilanksto teisingai. dFnCas12a N' gale bei tarp dFnCas12a C' galo ir fluorescencinių baltymų išsidėstę į branduolį nukreipiantys signalai yra eksponuojami baltymo išorėje. Šie rezultatai rodo, kad baltymai turėtų būti eksportuojami į branduolį.

3.3. CRISPR-Cas komplekso disociacijos moduliavimas *E. coli* ląstelėse

Šiame darbe lygiagrečiai buvo dirbama su V tipo dFnCas12a ir II tipo dSpCas9 baltymų pritaikymu taikinių plazmidžių fluorescenciniam žymėjimui gyvoje *E. coli* ląstelėje. Tai yra paprastesnė sistema, lyginant su *S. pombe*. *E. coli* ląstelės neturi branduolio, bakterijos greičiau auga ir yra daugiau publikuotų darbų, naudojant CRISPR-Cas sistemas.

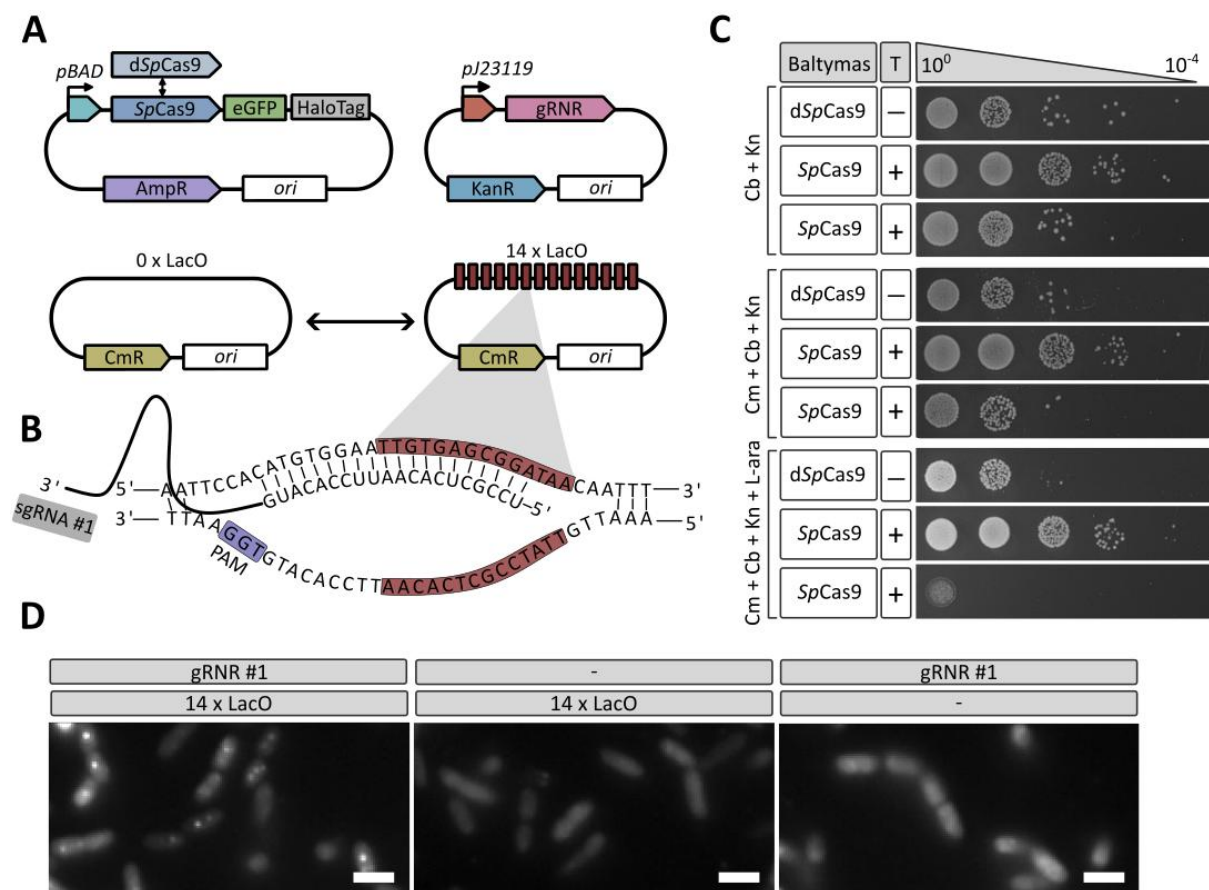
Ankstesnių darbų metu, kitiems taikymams mūsų laboratorijoje, buvo sukonstruoti *E. coli* plazmidiniai DNR vektoriai, kurie koduoja: 1) SpCas9-eGFP-HaloTag arba nukleaziniu aktyvumu nepasižymintį – dSpCas9-eGFP-HaloTag, 2) gidinę RNR, ir 3) taikines sekas – 0 arba 14 LacO operatoriaus sekų pasikartojimus (3.8A pav.). Plazmidėje koduojama sgRNR #1 seka yra surišama SpCas9 baltymo. Gidine RNR užkrautas Cas9 baltymas yra nutaikytas į trečios plazmidės taikines sekas, persidengiančias su LacO seka (3.8B pav.). Šio darbo metu buvo siekiama padidinti Cas-nukleorūgšties komplekso disociaciją nuo taikinio (įvedant nukleotido nesutapimus tarp sg/crRNR ir DNR taikinio) ir taip tokį įrankį pritaikyti kuriant CRISPR-Cas sistema paremtą DNR sekų PAINT mikroskopiją. Toks žymėjimo būdas turėtų būti mažiau invazinis ląstelei, nes Cas RNP kompleksai yra silpniau ir trumpiau sąveikauja su DNR taikiniu. Ši strategija taip pat galėtų leisti ilgiau stebėti fluorescencinį Cas sulietinio baltymo taškėlį, nes išblyškęs fluorescencinis baltymas greitai būtų pakeistas dar neišblyškusiu fluorescenciniu baltymu.

Pirmiausia reikėjo charakterizuoti du dalykus: 1) ar prie SpCas9 C' galo prilietas eGFP-HaloTag netrukdo baltymui sąveikauti su taikinine DNR seka ir 2) ar sgRNR#1 yra tinkama sąveikai su taikinio sritimi. Išsikelti klausimai buvo atsakyti atlikus *E. coli* augimo ribojimo eksperimentus, kurie buvo atlikti mikroskopijos eksperimentams tinkamomis sąlygomis (3.8C pav.). Šių eksperimentų rezultatai parodė, kad, kaip ir tikėtasi, minimalios *E. coli* terpės praturtinimas 0,2 % L-arabinoze lėmė SpCas9 baltymo raiškos padidėjimą. Esant taikininei DNR seka ir aktyviai SpCas9 nukleazei, indukuojančiomis sąlygomis, buvo stebimas *E. coli* visiškas augimo ribojimas, siejamas su atsparumo chloramfenikoliui praradimu dėl taikinius koduojančios plazmidės perkirpimo (3.8C pav.). Šis eksperimentas patvirtino išsikeltą hipotezę, kad SpCas9-eGFP-HaloTag-sgRNR#1 kompleksas gali sąveikauti su taikine DNR.

Įsitikinus, kad WT žymėtas baltymas yra funkcionalus ir reporterinė sistema veikia, perėjome prie tolimesnių darbų. Šio etapo metu *E. coli* ląstelės, transformuotos trimis plazmidėmis, kurios koduoja: 1) katalitiškai neaktyvų dSpCas9-eGFP-HaloTag, 2) sgRNR#1 ir 3) taikinine plazmide, buvo vaizdinamos fluorescencinės mikroskopijos metodu. Šių tyrimų metu buvo vizualizuojami dSpCas9-eGFP-HaloTag prisijungimo įvykiai prie taikinės DNR, kurie turėtų atrodyti kaip difrakcija apriboti taškeliai esantys ląstelės ploto apribotame fone. Fluorescencinis ląstelės fonas yra sukeliamas dėl prie DNR taikinio neprisijungusio dSpCas9-eGFP-HaloTag RNP komplekso, kuris citozolyje difunduoja greičiau, nei su DNR taikiniu sąveikaujantis RNP kompleksas. Laisvai difunduojantis dSpCas9-eGFP-

HaloTag RNP kompleksas, suvidurkinus su 50 ms ekspozicijos trukme užregistruotus vaizdus, sukelia išblukusį fluorescencinį ląstelės foną.

Mūsų atliktų mikroskopijos eksperimentų rezultatai parodė, jog esant visoms trimis minėtoms plazmidėmis daugumoje stebėtų ląstelių matosi ryškus mažas fluorescencinis taškas (3.8D pav.). Kitais dviem kontroliniais atvejais, kai trūko arba sgRNR#1 arba DNR substrato, fluorescencinių taškelių neaptikome. Tai parodo, jog mūsų sistema veikia ir mikroskopijos būdą galime stebėti baltymo prisijungimus.

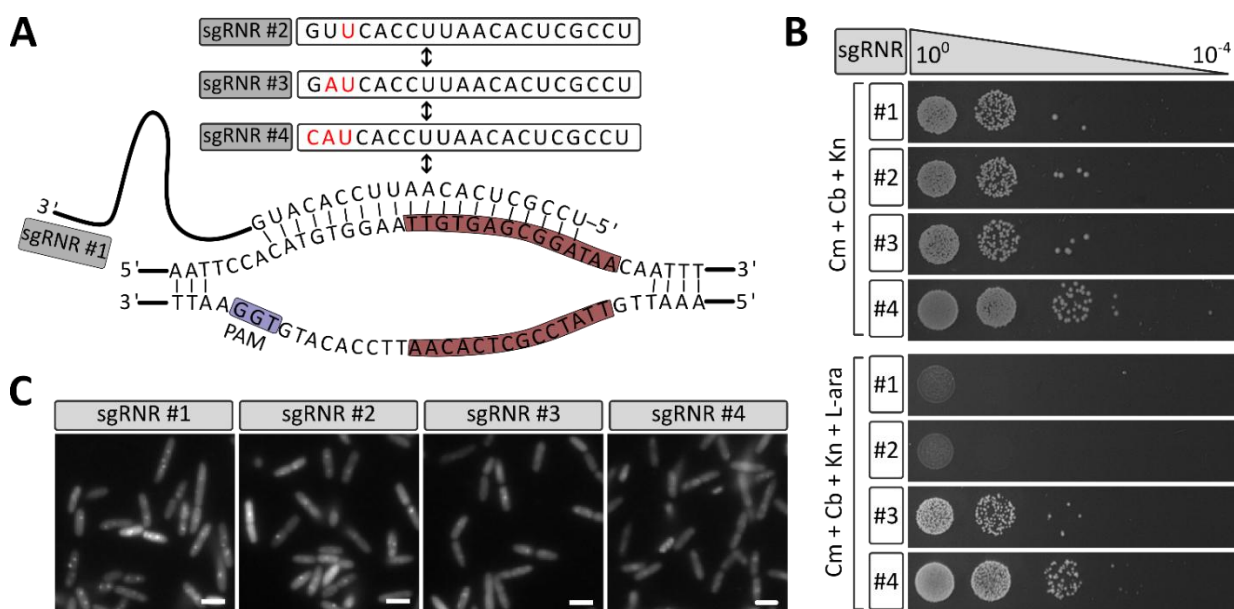


3.8 pav. CRISPR-Cas9 sistema ir jos veikimo tikrinimas *in vivo*. **(A)** Darbe naudoti plazmidiniai *E. coli* vektoriai. **(B)** Taikininės sekos pasirinkimas ir persidengimas su LacO seka. **(C)** Augimo ribojimo eksperimentas. T – taikiny. **(D)** dSpCas9-eGFP-HaloTag vaizdinimas gyvoje *E. coli* ląstelėse. Skalė 2 μm.

Šių eksperimentų teigiami rezultatai leido pereiti prie tolimesnių darbų, kurie reikalingi PAINT tipo žymėjimui atlikti. Tam tikslui pasiekti mes nusprendėme įvesti nukleotidų nesutapimus tarp taikininės DNR ir sgRNR, kurie turėtų susilpninti sąveiką. Todėl prie taikinio prisijungęs Cas9 RNP kompleksas greičiau disocijuotų nuo DNR molekulės. Pirma, mums buvo svarbu įprastais biocheminiais metodais ištirti minėtų sgRNR-taikinio nesutapimų įtaka SpCas9-eGFP-HaloTag baltymo nukleaziniam aktyvumui. Iš viso tarpusavyje buvo lyginamos 4 skirtingos sgRNR molekulės (3.9A pav.). Kai nesutapimai buvo įvesti tarp 2-3 (sgRNR #3) ir 1-3 (sgRNR #4) pozicijų (skaičiuojant nuo PAM sekos), dėl taikininės plazmidės linearizacijos ir tolimesnės DNR degradacijos, nebuvo stebimas *E. coli* augimo

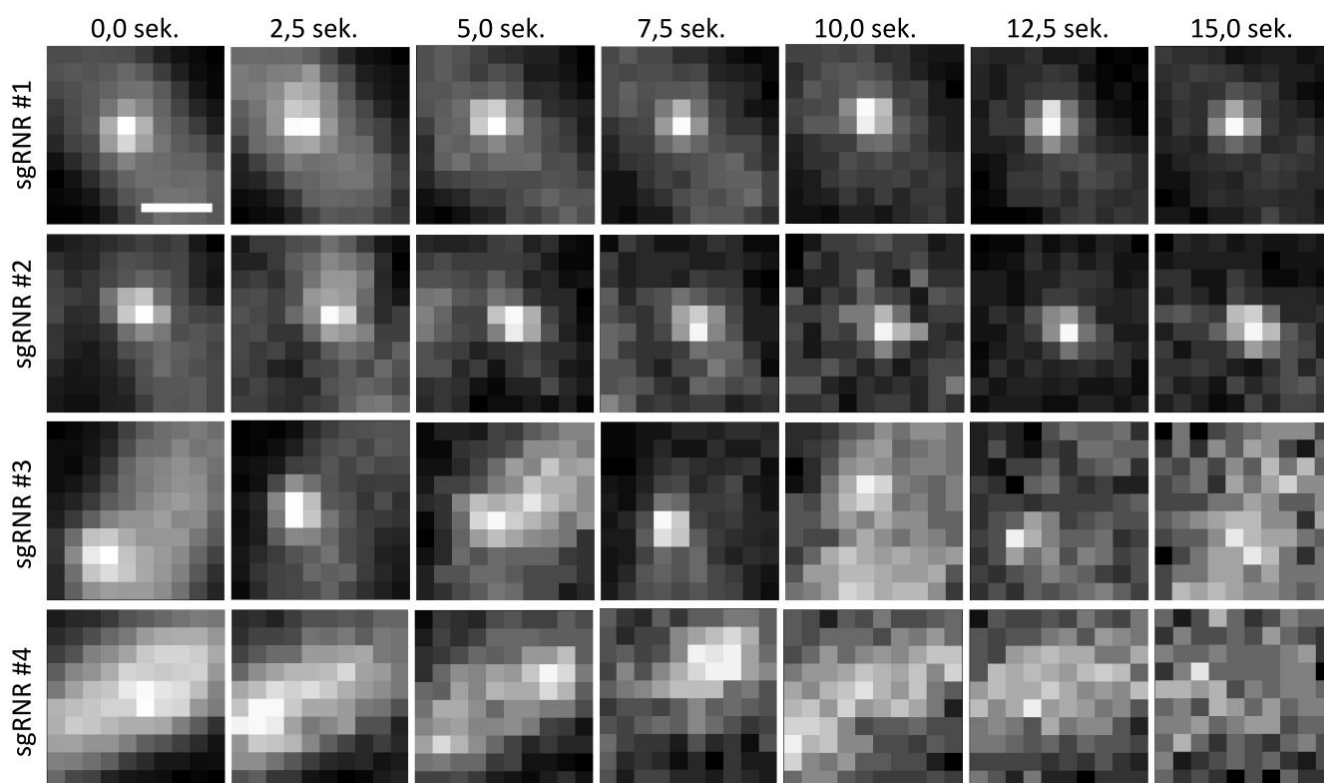
ribojimas (3.9B pav.). Tuo tarpu, 3-ioje pozicijoje esant nesutapimui tarp sgRNR #2 ir taikinės DNR, buvo stebimas visiškas *E. coli* augimo ribojimas. Šie rezultatai rodo, kad, esant 2 ar daugiau nesutapimams arti PAM sekos, *SpCas9*-eGFP-HaloTag baltymo-nukleorūgšties kompleksas praranda gebėjimą kirpti taikininę DNR molekulę.

Įsitikinus, kad tokia sistema veikia, toliau tęsėme darbus su šios sistemos fluorescencine mikroskopija. Tikėjomės, kad įvedus nesutapimus matysime arba mažiau ryškių taškelį ląstelėse arba jo visai nestebėsime, jei RNP komplekso ir DNR sąveika yra per silpna. d*SpCas9*-eGFP-HaloTag RNP komplekso sąveika su taikinine DNR molekule buvo vaizdinta fluorescencinės mikroskopijos metodu. Šių eksperimentų rezultatai parodė, jog ryškūs, sutelkti fluorescenciniai taškai buvo nesunkiai aptinkami esant sgRNR #1 ir sgRNR #2 raiškai (3.9C pav.). Mažiau ryškūs fluorescenciniai taškai buvo aptikti ekspresuojant sgRNR #3, o esant sgRNR #4 raiškai, fluorescenciniai taškai, šiomis mikroskopavimo sąlygomis, buvo beveik neaptinkami.



3.9 pav. Nesutapimų tarp gRNR ir taikininės DNR įtakos *SpCas9* sąveikai ir kirpimui įvertinimas *in vivo*. **(A)** Darbo metu tikrintos gidinės RNR. Raudona spalva žymi nesutapimus tarp gidinės RNR ir jai komplementarios taikininės DNR sekos. **(B)** Augimo ribojimo eksperimentai. **(C)** Su d*SpCas9*-eGFP-HaloTag vaizdinimas gyvoje *E. coli* ląstelėse. Skalė 2 μm.

Palyginus skirtingų sgRNR įtaką eGFP blyškimo trukmei, pastebėjome kad 1 nukleotido nesutapimas tarp sgRNR #2 ir taikininės DNR neturi didelės įtakos d*SpCas9*-eGFP-HaloTag RNP komplekso disociacijai (3.10 pav.). Net ir po 15 sek., yra stebimas eGFP baltymo signalas. Tuo tarpu, 2 nukleotidų nesutapimo įvedimas lėmė eGFP išblyškima jau po 7,5 sek. Tai rodo, kad 2 nukleotidų nesutapimo įvedimas sgRNR #3 sekoje, pagreitina d*SpCas9*-eGFP-HaloTag RNP komplekso disociaciją.

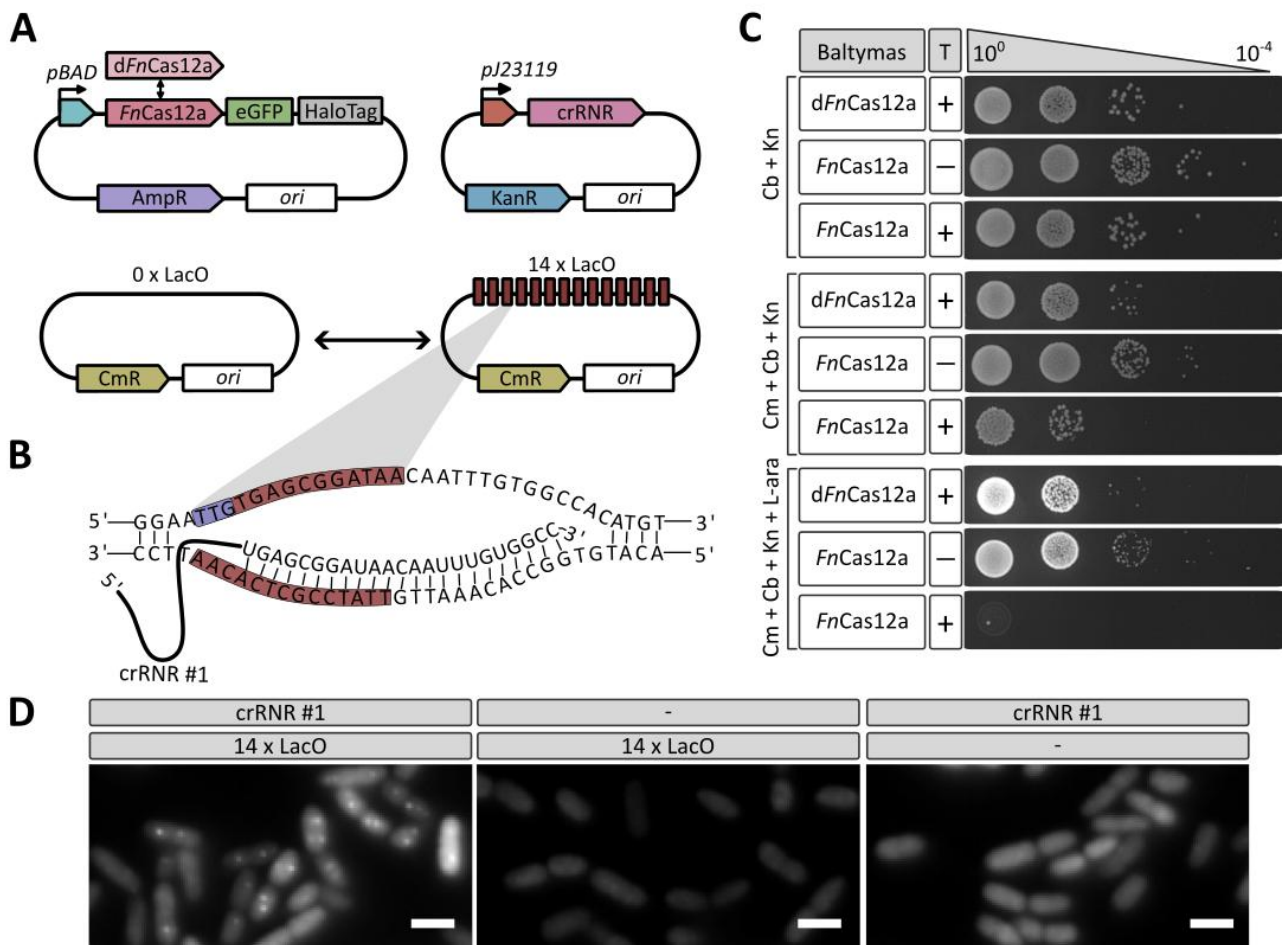


3.11 pav. dSpCas9-eGFP-HaloTag ir skirtingų sgRNR komplekso blyškimo trukmė. Kiekvienam vaizdui parinkta optimaliausia intensyvumo skalė. Skalė – 0,5 μm .

Galiausiai nutarėme patikrinti *FnCas12a* baltymo, prieš tai – taikyto *S. pombe* mielių tikslinių lokusų žymėjimui, disociacijos priklausomybę nuo nesutapimų tarp crRNR ir taikininės sekos bei pritaikymą PAINT mikroskopijai *E. coli* ląstelėse. Chromatino žymėjimo strategijai, mums taip pat svarbu turėti galimybę žymėti lokusus dviem skirtingomis spalvomis ir tada pritaikyti bar-coding'ą. Tai galime atlikti turėdami du skirtingus Cas baltymus, nes jų PAM skiriasi ir jie gali būti užkrauti skirtingais gidais.

Taigi, buvo sukonstruoti CRISPR-Cas9 sistemai naudoti ekvivalentūs CRISPR-Cas12a sistemos plazmidiniai vektoriai (3.11A pav.). d*FnCas12a*-eGFP-HaloTag ir crRNR komplekso sąveika su taikinine DNR (3.11B pav.) ir tolimesnis taikininės DNR kirpimas buvo įvertintas pagal augimo ribojimo eksperimentų rezultatus. Augimo ribojimo eksperimentui buvo naudojama minimali, fluorescencinėje mirksokopijoje naudojama, terpė. Šių eksperimentų rezultatai parodė, kad, indukuojančiose sąlygose, *FnCas12a*-eGFP-HaloTag sėkmingai atliko taikinio vektoriaus kirpimą, kuri lėmė atsparumo chloramfenikoliui praradimą (3.11C pav.).

Sėkmingi sistemos tikrinimo rezultatai mums leido pereiti prie sukonstruotos sistemos vaizdinimo. Šių fluorescencinės mikroskopijos eksperimentų rezultatai parodė, kad esant pilnai sistemai su visomis trimis plazmidėmis, daugumoje iš stebėtų ląstelių galime aptikti d*FnCas12a*-eGFP-HaloTag prisijungimo prie taikininės plazmidės sukeltą ryškų fluorescuojantį taškelį (3.11D pav.). Tuo tarpu kontroliniuose eksperimentuose su dviem plazmidėmis, tokių taškių išvis nestebime.



3.11 pav. CRISPR-Cas12a sistema ir jos veikimo tikrinimas in vivo. **(A)** Darbe naudoti plazmidiniai *E. coli* vektoriai. **(B)** Taikininės sekos pasirinkimas ir persidengimas su LacO seka. **(C)** Augimo ribojimo eksperimentas. T – taikiny. **(D)** dFnCas12a-eGFP-HaloTag vaizdinimas gyvoje *E. coli* ląstelėse. Skalė 2 μ m.

Tolimesnių darbų metu bus siekiama įvesti neatitikimus tarp crRNR sekos ir jai komplementarios DNR taikininės sekos bei įvertinti dFnCas12a baltymo – nukleorūgšties komplekso greitesnės disociacijos įtaką eGFP blyškimo atstatymui.

3.4. Rezultatų aptarimas

Šiame darbe *S. pombe* genomo DNR lokusų fluorescenciniam žymėjimui buvo pritaikyta 2 klasės, V tipo CRISPR-Cas sistema. Cas12 šeimos atstovai, skirtingai nuo Cas9 baltymų, pasižymi RNaziniu aktyvumu, todėl gali savarankiškai apdoroti crRNR molekules (Zetsche et al., 2017). Ši savybė leidžia vykdyti kelių crRNR molekulių raišką nuo vieno promotoriaus. Be to, Cas12 šeimos baltymai yra kompaktiškesni nei Cas9 baltymai, o tai sumažina DNR vektorių dydį bei palengvina jų konstravimą. Dėl šių privalumų, genomo DNR žymėjimo tyrimams buvo pasirinktas *Francisella novicida* organizmo dCas12a baltymas. Šiuo metu, tai yra vienintelis Cas12 baltymų šeimos atstovas sėkmingai pritaikytas *S. pombe* mielių ląstelių genomo redagavimui ir interferencijos tyrimams (Zhao & Boeke, 2020).

Šiame darbe į *S. pombe* TA369 ir C2566 kamienus homologinės rekombinacijos būdu buvo integruotas linearizuotas mielių integratyvinis vektorius, užtikrinantis ne daugiau, kaip vienos vektoriaus kopijos integraciją į tikslinę genomo sritį – *ade6* lokusą (Vještica et al., 2020). Mielių genomo sekoskaita patvirtino, kad į genomą integravosi tik viena DNR vektoriaus kopija. Stipri GFP₁₋₁₀ fragmento raiška buvo vykdoma nuo genominės DNR, tuo tarpu dFnCas12a-GFP_{11×7} ir crRNR sekų raiška buvo vykdoma nuo mielių replikatyvinio vektoriaus.

Pirmiausia buvo siekiama įvertinti ar galime stebėti dFnCas12a-GFP_{11×7} baltymo prisijungimą tarp *LacO* ir *TetO* regionų. Dėl šio tikslo dCas12a-crRNR kompleksas buvo nutaikytas į tris taikines DNR sekas, *SPAC7D.12c* gene. Jei dCas12a-crRNR kompleksas būtų atpažinęs taikininę DNR seką, tikėtumėmės stebėti fluorescencinį taškelį *S. pombe* branduolio plote, prilygstantį 21 GFP baltymo signalo intensyvumui. Tačiau fluorescencinis signalas iš viso nebuvo aptiktas. Tikėtina, kad tai galėjo nulemti nepakankamas taikinių skaičius, ribotas jų prieinamumas, crRNR dizainas. Silpni signalai taip pat galėjo būti neaptikti dėl didelės fono fluorescencijos, susijusios su aukšta dFnCas12a-GFP_{11×7} raiška. Branduolyje laisvai difunduojantis dFnCas12a-GFP_{11×7} baltymas sukelia išblyškusį fluorescencinį foną, o tai sumažina taškelio kontrastą. Be to, šiame kamieno taip pat yra ekspresuojamas GFP-LacI baltymas, dėl kurio raiškos sukiamas fluorescencinis branduolio fonas sumuojasi su dFnCas12a-GFP_{11×7} baltymo sukeliama fluorescencija.

Siekdami optimizuoti žymėjimo sistemą, tolimesniuose eksperimentuose naudojome laukinį fenotipą primenantį TA369 kamieną, kuris nekoduoja FROS sistemos. FROS sistema sukelia papildomą fluorescencinį foną branduolyje, o tai trukdo sistemos optimizacijai. dFnCas12a-GFP_{11×7} raiška buvo palyginta naudojant kelis promotorius, iš kurių silpniausias buvo nmt81 promotorius (Basi et al., 1993). Šio promotoriaus pilna indukcija yra pasiekama terpėje be tiarmino (Maundrell et al., 1990). Buvo pastebėta, kad tirtose grupėse dFnCas12a-GFP_{11×7} raiška (kuri buvo vertinama matuojant branduolio ploto fluorescenciją) nuo ADH81, nmt81 promotorių yra heterogeniška tarp vienos grupės skirtingų ląstelių. Ši variacija gali būti susijusi su skirtingu plazmidžių kopijų skaičiumi mielių ląstelėse.

Plazmidėse yra koduojama *arsI* (angl. *autonomous replication sequence I*) seka, kuri padeda užtikrinti nuo genominės DNR nepriklausomą plazmidžių replikaciją (Clyne & Kelly 1995; Maundrell et al., 1988). Literatūroje nurodoma, kad plazmidžių, su *ars* seka, kopijų skaičius ląstelėse gali svyruoti nuo 5 iki 30 (Hayles & Nurse, 1992). Vis dėl to, *ars* elementas neužtikrina tolygaus vektorių pasiskirstymo mitozės metu, todėl atsitiktinė plazmidžių segregacija dar labiau prisideda prie kintančio plazmidžių skaičiaus ląstelėse.

Skirtingai nuo *S. cerevisiae* YCp (angl. *Yeast Centromere plasmids*) vektorių pritaikymo, kurie leidžia išlaikyti pastovų vektorių kopijų skaičių ir užtikrinti tolygų jų pasiskirstymą mitozės metu, *S. pombe* organizme, dėl kompleksiškos ir ilgos centromerinės srities, YCp vektoriai nebuvo sėkmingai pritaikyti. Todėl tolimesniuose tyrimuose, siekiant sumažinti dFnCas12a-GFP_{11×7} raiškos heterogeniškumą vienos imties lygmenyje, būtų tikslinga integruoti dFnCas12a-GFP_{11×7} koduojančią seką į mielių genomą.

Siekdami palaikyti nedidelį dFnCas12a-GFP_{11×7} molekulių kiekį branduolyje ir taip sumažinti fluorescencinį foną, tolimesniems eksperimentams pasirinkome silpniausią nmt81 promotorių. Šiomis raiškos sąlygomis, dFnCas12a-GFP_{11×7} ir crRNR kompleksas buvo nukreiptas į: 1) į tris DNR taikinius *SPAC7D4.12c* lokuse, 2) devynis DNR taikinius *SPAC7D4.12c* lokuse, ir 3) tris taikinius *ade6* lokuse. Tokia strategija leido patikrinti dFnCas12a-GFP_{11×7} RNP komplekso nutaikymą į du skirtingus lokusus bei skirtingą DNR taikinių skaičių, esančių tame pačiame lokuse. Tyrimams pasirinkome *ade6* lokusą, nes į šį lokusą FnCas12a baltymas, *S. pombe* ląstelėse, sėkmingai buvo nutaikytas kitų tyrimų metu (Zhao & Boeke, 2020).

Šių darbų rezultatai parodė, jog dėl silpnesnės raiškos branduolio fonas sumažėja. Tai turėtų palengvinti taškelio aptikimą. Tačiau ląstelių vaizdinimas (net ir su Z ašies skenavimu, kuris leidžia sufokusuoti vaizdą skirtingame branduolio aukštyje), neleido aptikti aiškaus, lokalizuoto GFP fluorescencinio taškelio. Vis dėl to, kai kuriose ląstelėse buvo pastebimi labai silpni, išsklaidyti fluorescenciniai taškai branduolio srityje, tačiau jie nebuvo pakankamai ryškūs, kad būtų galima patikimai patvirtinti taikininės DNR tikslinį žymėjimą. Idealiomis sąlygomis, naudojant devynias taikines sekas būtų galima tikėtis aptikti GFP taškelį, kurio ryškumas prilygtų 63-ųjų GFP baltymų fluorescencijos sumai. Tačiau net ir šiuo atveju aiškaus žymėjimo nepavyko pasiekti. Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad dFnCas12a-GFP_{11×7} sulietinis baltymas gali neefektyviai sąveikauti su DNR substratu.

Kito, seniau publikuoto, tyrimo metu mokslininkai, *MUC4* lokuso žymėjimui žmogaus ląstelėse pritaikė dCas9-eGFP sulietinį baltymą. Palyginę žymėjimo efektyvumą, kai buvo ekspresuojamos 16, 26, 36 ar 73 skirtingos sgRNR, autoriai nustatė, kad nepasikartojančių lokusų žymėjimui, esant tam tikram fono lygiui, pakanka naudoti 26-36 skirtingas sgRNR. Tuo tarpu 16-os sgRNR ekspresija nebuvo pakankama vizualaus fluorescencinio signalo aptikimui (Chen et al., 2013). Šio darbo metu, net ir

nutaikius *dFnCas12a*-GFP_{11×7} RNP kompleksą į 9-ias *SPAC7D4.12c* lokuso sritis (63 GFP signalai), nepavyko aptikti fluorescencinio taškelio. Kadangi pirminis tyrimas buvo atliktas žmogaus ląstelėse esant skirtingoms slygoms, mūsų gauti rezultatai negali būti tiesiogiai lyginami. Fluorescencinių taškelių aptikimui branduolyje daro įtaką esama branduolio autofluorescencija, fluorescencinio baltymo raiškos lygis ir jo transportavimo į branduolį efektyvumas, taikinių DNR pasirinkimas ir kt.

Kadangi fluorescencinio signalo sanaka nebuvo stebima net ir *dFnCas12a*-GFP_{11×7} nutaikius į devynias taikines sritis, tolimesnių darbų metu nusprendėme *dFnCas12a*-GFP_{11×7} nukreipti į pasikartojančius DNR elementus, kurie yra koduojami FROS sistemoje. Šie elementai viename genomo lokuse yra išsidėstę šalia vienas kito. Tokia strategija, *dFnCas12a*-GFP_{11×7} RNP kompleksu sąveikos su taikine DNR atveju, leistų amplifikuoti GFP fluorescencinį signalą. Šiam tikslui pirmiausia reikėjo nustatyti *LacO* ir *TetO* masių DNR sekas.

Šis darbas yra pirmas, kuriame buvo nusekvenuotas *S. pombe* C2566 mielių kamieno genomas. Remiantis kitų tyrimų duomenimis, C2566 kamiene yra integruoti 128×*LacO* ir 116×*TetO* sekų pasikartojimai (Petrova et al., 2013). Tačiau atlikta genomo sekoskaita atskleidė, kad į *lys1*⁺ ir *sec73*⁺ lokusus atitinkamai yra integruoti vos 62×*LacO* ir 73×*TetO* pasikartojimai. Nustatytą mažesnę pasikartojančių sekų skaičių galėjo lemti nestabilus *LacO* ar *TetO* elementų palaikymas *E. coli* ląstelėse, mielių integracinio vektoriaus konstravimo ar sukonstruotos plazmidės padauginimo metu (Azpiroz & Laviña, 2017).

LacO ir *TetO* pasikartojančių sekų regiono sekoskaita leido identifikuoti PAM sekas ir potencialius taikinius. Tačiau *dFnCas12a*-GFP_{11×7} ir crRNR kompleksu nutaikymas į šias sritis vis tiek neleido aptikti aiškaus fluorescencinio taškelio branduolio plote. Nėra aišku ar GFP_{11×7} fragmentų suliejimas su *dFnCas12a* netrukdo jo sąveikai su taikine DNR seka ir ar pasirinkti DNR taikiniai yra tinkami.

Vis dėlto, nukreipus *dFnCas12a*-GFP_{11×7} į *LacO* sekas, kai kuriose ląstelėse buvo stebimas padidėjęs GFP taškelio kontrastas, lyginant su kontroline grupe. Rezultatai galėtų indikuoti, jog *dFnCas12a*-GFP_{11×7} RNP kompleksas gali atpažinti ir sąveikauti su taikine DNR. Visgi šio eksperimento metu nebuvo įtraukta kontrolinė grupė, kurioje *dFnCas12a*-GFP_{11×7} RNP kompleksas būtų nukreiptas į su *LacO* ir *TetO* sekomis nesusijusį lokusą. Todėl nebuvo įvertintas branduolio fluorescencinio fono padidėjimas vykstant *dFnCas12a*-GFP_{11×7} raiškai. Lieka neaišku, koks GFP-LacI taškelio kontrastas būtų terpėje su IPTG, kuris skatina GFP-LacI disociaciją nuo *LacO*.

Analizuojant branduolius, kuriuose buvo vizualiai aptinkamas aiškus GFP taškelis, buvo nustatyta, kad tiriamojoje grupėje (kurioje vyko *dFnCas12a*-GFP_{11×7} ekspresija ir ląstelės buvo auginamos terpėje su IPTG) tik apie 18 % visų branduolių pasižymėjo aiškiai aptinkamu fluorescenciniu taškelio. Tuo tarpu neigiamoje kontrolinėje grupėje (ląstelės buvo auginamos terpėje su IPTG, tačiau jose nevyko *dFnCas12a*-GFP_{11×7} ekspresija) – apie 29 % branduolių buvo aptikti GFP taškai. Šie

rezultatai gali būti paaiškinami tuo, kad dėl *dFnCas12a*-GFP_{11×7} raiškos padidėja branduolio fluorescencinis fonas, todėl sumažėja GFP-LacI kontrastas. Tikėtina, kad tai apsunkina GFP-LacI taškelių aptikimą tiriamojoje grupėje. Papildomas tyrimas, įtraukiant prieš tai aprašytą neigiamą kontrolę (*dFnCas12a*-GFP_{11×7} RNP kompleksas yra nukreipiamas į nesusijusį lokusą), leistų patvirtinti gautus rezultatus.

Nutakius *dFnCas12a*-GFP_{11×7} RNP kompleksą į pasikartojančias *TetO* sekas, esančias *S. pombe* I-oje chromosomoje, kai kuriose ląstelėse, branduolio srityje, buvo stebimi trys aiškūs GFP taškai. Papildomų taškelių aptikimas galėjo būti nulemytas *dFnCas12a*-GFP_{11×7} RNP komplekso specifinės sąveikos su pasikartojančiomis *TetO* sekomis. Tuo tarpu, 3 fluorescenciniai GFP taškai branduolio plote nebuvo aptikti vaizdinant C2566 kamieną, kuriame *dFnCas12a*-GFP_{11×7} raiška nevyko. Tiriamojoje grupėje, 3 taškai buvo aptikti tik pavienėse ląstelėse.

Gauti rezultatai leidžia manyti, kad DNR žymėjimas, naudojant *dFnCas12a*-GFP_{11×7} RNP kompleksą, yra ribotas arba neefektyvus. Kadangi FROS sistemos GFP-LacI emisija persidengia su *dFnCas12a*-GFP_{11×7} emisija, o IPTG pridėjimas nelemia visų GFP-LacI baltymų disociacijos nuo *LacO* sekų (šių sekų atlaisvinimas yra svarbus *dFnCas12a*-GFP_{11×7} RNP komplekso prisijungimui), tolimesnių eksperimentų metu, yra reikalingas C2566 kamienas su inaktyvuotu GFP-LacI baltymą koduojančiu genu.

E2C fluorescencinio baltymo priliejimas prie terminalinio *dFnCas12a* C' galo leido vaizdinti fluorescenciją trečiame (E2C) emisijos spektro kanale, kuris nepersidengia su GFP ar tdTomato fluorescencijos emisijos spektro kanalais. Tokia sistema leidžia aptikti ir stebėti kiekvieną fluorescencinį baltymą atskirai, nepriklausomai nuo kitų fluorescencinių baltymų. Vaizdinant C2566 kamieną, E2C kanale buvo stebima autofluorescencija mielių ląstelių citoplazmoje. Tiriamojoje grupėje *dFnCas12a*-E2C baltymas buvo nukreiptas į pasikartojančias *LacO* ar *TetO* sekas. Buvo stebimas citoplazmos ir branduolio fluorescencijos fono padidėjimas, abejais atvejais – 27-iais %. Tuo tarpu, *dFnCas12a*-GFP_{11×7} raiška lėmė beveik 2 kartus fluorescencijos padidėjimą branduolio srityje, lyginant su fluorescencijos padidėjimu citoplazmoje. Kadangi *dFnCas12a*-GFP_{11×7} fluorescencijai yra būtinas kitas komponentas – GFP₁₋₁₀, padidėjusi branduolio fluorescencija gali būti susijusi su efektyviu GFP₁₋₁₀ fragmento pernešimu į branduolį.

E2C baltymas yra 225 aminorūgščių ilgio, tuo tarpu vieną GFP 11β klostę sudaro tik 16 aminorūgščių. 7-ios β klostės tarpusavyje yra atskirtos linkeriais, todėl jų struktūra greičiausiai mažiau trukdo taisyklingam baltymo susilankstymui (Cabantous et al., 2005). Gauti rezultatai gali būti susiję su netaisyklingu *dFnCas12a*-E2C susilankstymu ar mažiau efektyvia translokacija į branduolį. Kitų tyrimų metu buvo parodyta, kad E2C fluorescencinis baltymas *S. pombe* ląstelėse pasižymi ~2,5-3,8 karto mažesniu signalo ir fono santykiu, lyginant su sfGFP ir mKO2, kai visų baltymų raiškai buvo naudotas silpnas *ade6* geno promotorius. Vis dėlto, E2C signalas buvo aiškiai aptinkamas, kai jo

raiškai buvo pritaikytas vidutinio stiprumo *swi6* geno promotorius (Al-Sady et al., 2016).

Tolimesniuose tyrimuose, dFnCas12a-E2C ekspresijai galėtų būti pritaikytas, už *nmt81* promotorių stipresnis, ADH81 promotorius.

Šio darbo metu, lygiagrečiai, taip pat buvo siekiama pritaikyti CRISPR-Cas sistemą DNR PAINT mikroskopijos metodui. PAINT strategija buvo vystoma *E. coli* bakterijų ląstelėse, CRISPR-Cas sistemą nutaikant į plazmidėje esančias taikines sekas. Fluorescencinio žymėjimo strategijai buvo sukonstruoti dSpCas9-eGFP-HaloTag ir dFnCas12a-eGFP-HaloTag koduojantys baltymai.

Iš pradžių buvo nustatyta, kad *SpCas9* ir *FnCas12a* sulietiniai baltymai išlieka funkcionalūs. Esant aktyviai nukleazei ir taikinei DNR sekai, buvo stebimas visiškas *E. coli* augimo ribojimas, kuris yra siejamas su atsparumo chloramfenikoliui praradimu. Tai parodo, kad sulietiniai Cas baltymai gali sąveikauti su substratinę DNR ir tikslinėje vietoje įvesti dvigrandininį trūkį. Fluorescencinės mikroskopijos tyrimų rezultatai parodė, kad dSpCas9-eGFP-HaloTag ir dFnCas12a-eGFP-HaloTag baltymų-ribonukleorūgščių kompleksai, esant taikinei plazmidei sąveikauja su substratu ir galime stabėti ryškų taškelį ląstelėse. Daugumoje ląstelių buvo stebimi aiškiai išreikšti 1-3 fluorescenciniai taškeliai. Tai patvirtina, kad sulietinių baltymų struktūra netrukdo sąveikai su taikine DNR seka.

Vėliau buvo tirta, kaip nesutapimai tarp gidinės RNR ir taikinės DNR, PAM proksimalinėje srityje, veikia *SpCas9*–gRNR komplekso ir taikinės DNR sąveiką bei kirpimą. Augimo ribojimo eksperimentai parodė, kad bent 2 nesutapimai arti PAM sekos stipriai sumažina *SpCas9* gebėjimą kirpti taikinį. Tuo tarpu mikroskopijos tyrimų rezultatai parodė, kad dauguma ląstelių turi joms būdingus silpnus fluorescencinius dSpCas9-eGFP-HaloTag taškelius, net kai PAM proksimalinėje srityje yra 2-iejų nukleotidų nesutapimai su sgRNR. Kitų tyrimų metu, taip pat buvo parodyta, kad nesutapimai, esantys PAM proksimalinėje srityje žymiai sumažina dSpCas9-eGFP-HaloTag prisijungimo įvykių tikimybę ir padidina komplekso disociaciją (Singh et al., 2016; Singh et al., 2018). Tai pastebėjome ir šio darbo metu.

Atėities darbuose planuojama įvesti bazių nesutapimus tarp crRNR ir taikinės DNR dFnCas12a baltymo atveju ir ištirti disociacijos dinamiką taikant fotoblyškimo atkūrimo (FRAP) metodą bei PAINT mikroskopiją.

Išvados

1. Nepaisant skirtingų DNR taikinių skaičiaus ar jų lokacijos genome, pavienių DNR lokų fluorescencinio žymėjimo *S. pombe* ląstelėse, pritaikant dFnCas12a-GFP_{11×7} RNP kompleksą, aptikti nepavyko.
2. Pasikartojančių DNR elementų, į juos nukreipiant dFnCas12a-GFP_{11×7} RNP kompleksą, fluorescencinis žymėjimas yra neefektyvus.
3. CRISPR-Cas9 ir CRISPR-Cas12 sistemos sėkmingai pritaikytos *E. coli* plazmidės fluorescenciniam žymėjimui, o tarp sgRNR ir taikininės DNR įvesti bazių porų nesutapimai padidino dCas9 baltymo disociaciją nuo taikinių DNR sekų.

Fluorescencinis DNR žymėjimas ir vaizdinimas gyvose ląstelėse pritaikant CRISPR-Cas sistemą

SANTRAUKA

Metodai, skirti genomines DNR pavienių lokusų fluorescenciniam žymėjimui ir dinamikos sekimui laike, dažnai yra apriboti keliais lokusais. Esami metodai, tokie kaip FROS, ANCHOR leidžia išgauti aukštą fluorescencinį kontrastą, tačiau jų pritaikymą riboja ilgų sekų integracija į genomą. Tuo tarpu, vis dažniau chromatinio žymėjimo tyrimuose pritaikoma, CRISPR-Cas sistema efektyviai leidžia žymėti tik pasikartojančias sekas genome, tačiau pavienių lokusų fluorescencinis žymėjimas nėra efektyvus dėl mažo fluorescencinio signalo kontrasto. Galiausiai, visuose egzistuojančiuose metoduose, greita fluorescencinių baltymų blukimo trukmė apsunkina ilgalaikius vaizdinimo eksperimentus.

Šio darbo tikslas buvo pirmą kartą pritaikyti *Francisella novicida* organizmo Cas12a baltymą *Schizosaccharomyces pombe* genomines DNR fluorescenciniam vaizdinimui bei pradėti vystyti CRISPR-Cas sistemomis paremtą PAINT mikroskopijos vaizdinimo metodą. Šis fluorescencinės mikroskopijos metodas remiasi silpna Cas ribonukleoproteino (RNP) komplekso sąveika su taikinine DNR seka. Silpna sąveika ir greita komplekso disociacija leistų vieną, su fluorescenciniu baltymu sulietą, Cas RNP kompleksą greitai pakeisti kitu kompleksu, prie kurio yra prilietas dar neišblyškęs fluorescencinis baltymas. Sėkmingas strategijos įgyvendinimas leistų šią sistemą pritaikyti ilgalaikiams chromatinio vaizdinimams.

Šio darbo metu buvo pradėta vystyti *S. pombe* chromatinio žymėjimo strategija, taikant dFnCas12a-GFP_{11×7} ir GFP₁₋₁₀, dviejų komponentų, fluorescencinę sistemą. Darbo metu dFnCas12a-GFP_{11×7} RNP kompleksas buvo nutaikytas į pasikartojančius ir pavienius *S. pombe* genomo lokusus. Tuo tarpu, PAINT strategijos principas buvo pradėtas tikrinti paprastesniame, *Escherichia coli*, modeliniame organizme, pritaikant *Streptococcus pyogenes* dCas9 ir dFnCas12a baltymus. Nors darbo metu pavyko sukonstruoti funkcionalias CRISPR-Cas sistemas *E. coli* plazmidinės DNR fluorescenciniam žymėjimui, visgi optimizuoti pavienių ir pasikartojančių lokusų žymėjimo strategijos, *S. pombe* ląstelėse, naudojant dFnCas12a-GFP_{11×7} RNP kompleksą, nepavyko.

CRISPR-Cas-Based Fluorescent DNA Labelling and Imaging in Living Cells

ABSTRACT

Methods for genomic DNA single loci fluorescent labeling and their dynamics tracking over time are often limited to a few loci. Existing methods such as FROS, ANCHOR allow to obtain high contrast of fluorescent signal. However, their application is limited due to integration of long sequences into the genome. Meanwhile, the CRISPR-Cas system, which is increasingly being applied for chromatin labeling studies, effectively allows labeling only repetitive sequences in the genome, since single loci fluorescent labeling is not efficient due to low contrast of the fluorescent signal. Finally, all existing methods encounters challenges due to rapid photobleaching of fluorescent proteins, which complicates long-term imaging experiments.

The aim of this work was to apply the Cas12a protein of *Francisella novicida* for the fluorescence imaging of *Schizosaccharomyces pombe* genomic DNA for the first time. Moreover we aimed to start the development of a CRISPR-Cas-based PAINT microscopy imaging method. PAINT microscopy is based on the weak interaction of the Cas ribonucleoprotein (RNP) complex with the target DNA sequence. The weak interaction and rapid dissociation would allow one Cas RNP complex which is fused to a fluorescent protein to be quickly replaced by another complex. Successful implementation of this strategy would be beneficial for long-term chromatin imaging.

In this work, a strategy for labeling *S. pombe* chromatin was developed using the dFnCas12a-GFP_{11×7} and GFP₁₋₁₀ two-component fluorescent system. During the work, dFnCas12a-GFP_{11×7} RNP complex was targeted to repetitive and single loci in the *S. pombe* genome. Meanwhile, the principle of the PAINT strategy was begun to be tested in a simpler model organism, *Escherichia coli*, by adapting the *Streptococcus pyogenes* dCas9 and dFnCas12a proteins.

Although the work succeeded in constructing functional CRISPR-Cas systems for fluorescent labeling of *E. coli* plasmid DNA, it was not possible to optimize the labeling strategy for single and repetitive loci in *S. pombe* cells using the dFnCas12a-GFP_{11×7} RNP complex.

Autoriaus asmeninis indėlis

Šio darbo metu atlikau visus eksperimentus, aprašytus metodų dalyje. Taip pat atlikau duomenų analizę ir interpretaciją, kuri yra pateikta rezultatų ir aptarimo dalyse. Galiausiai, parašiau visą magistro baigiamąjį darbą.

Padėka

Noriu nuoširdžiai padėkoti savo darbo vadovui, Marijonui Tutkui, už kantrybę, parodytą pasitikėjimą, vertingus patarimus, pagalbą darbuose ir suteiktą galimybę atlikti baigiamąjį darbą.

Taip pat noriu padėkoti komandos nariui, Aurimui Kopūstui, už konsultacijas, naudingas išvalgas ir apmokymus dirbti su fluorescencine mikroskopija.

Galiausiai, noriu padėkoti buvusiai komandos narei, Medai Jurevičiūtei už darbo metodų apmokymą, sklandų įvedimą į darbus laboratorijoje ir palaikymą.

Literatūros šaltiniai

- Alexander, J. M., Guan, J., Li, B., Maliskova, L., Song, M., Shen, Y., Huang, B., Lomvardas, S., & Weiner, O. D. (2019). Live-cell imaging reveals enhancer-dependent Sox2 transcription in the absence of enhancer proximity. *eLife*, 8, e41769. <https://doi.org/10.7554/eLife.41769>
- Al-Sady, B., Greenstein, R. A., El-Samad, H. J., Braun, S., & Madhani, H. D. (2016). Sensitive and quantitative three-color protein imaging in fission yeast using spectrally diverse, recoded fluorescent proteins with experimentally-characterized in vivo maturation kinetics. *PLOS ONE*, 11(8), e0159292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159292>
- Alsamsam, M. N., Kopūstas, A., Jurevičiūtė, M., & Tutkus, M. (2022). The miEye: Bench-top super-resolution microscope with cost-effective equipment. *HardwareX*, 12, e00368. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2022.e00368>
- Axelrod, D. (2001). Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2(11), 764–774. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.21104.x>
- Aze, A., Sannino, V., Soffientini, P., Bachi, A., & Costanzo, V. (2016). Centromeric DNA replication reconstitution reveals DNA loops and ATR checkpoint suppression. *Nature Cell Biology*, 18(6), 684–691. <https://doi.org/10.1038/ncb3344>
- Azpiroz, M. F., & Laviña, M. (2017). Analysis of RecA-independent recombination events between short direct repeats related to a genomic island and to a plasmid in Escherichia coli K12. *PeerJ*, 5, e3293. <https://doi.org/10.7717/peerj.3293>
- Basi, G., Schmid, E., & Maundrell, K. (1993). TATA box mutations in the Schizosaccharomyces pombe nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene*, 123(1), 131–136. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90552-E](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90552-E)
- Bauman, J. G. J., Wiegant, J., Borst, P., & Van Duijn, P. (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA. *Experimental Cell Research*, 128(2), 485–490. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(80\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(80)90087-7)
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., & Bonas, U. (2009). Breaking the code of dna binding specificity of tal-type iii effectors. *Science*, 326(5959), 1509–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- Boettiger, A. N., Bintu, B., Moffitt, J. R., Wang, S., Beliveau, B. J., Fudenberg, G., Imakaev, M., Mirny, L. A., Wu, C., & Zhuang, X. (2016). Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states. *Nature*, 529(7586), 418–422. <https://doi.org/10.1038/nature16496>
- Cabantous, S., Terwilliger, T. C., & Waldo, G. S. (2005). Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 23(1), 102–107. <https://doi.org/10.1038/nbt1044>
- Chen, B., Gilbert, L. A., Cimini, B. A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.-W., Park, J., Blackburn, E. H., Weissman, J. S., Qi, L. S., & Huang, B. (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized crispr/cas system. *Cell*, 155(7), 1479–1491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>
- Chen, H., Levo, M., Barinov, L., Fujioka, M., Jaynes, J. B., & Gregor, T. (2018). Dynamic interplay between enhancer–promoter topology and gene activity. *Nature Genetics*, 50(9), 1296–1303. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0175-z>

- Clyne, R. K., & Kelly, T. J. (1995). Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO Journal*, 14(24), 6348–6357. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00326.x>
- Davey, C. A., Sargent, D. F., Luger, K., Maeder, A. W., & Richmond, T. J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 319(5), 1097–1113. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00386-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00386-8)
- Ding, D.-Q., Okamasa, K., Katou, Y., Oya, E., Nakayama, J., Chikashige, Y., Shirahige, K., Haraguchi, T., & Hiraoka, Y. (2019). Chromosome-associated RNA–protein complexes promote pairing of homologous chromosomes during meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Communications*, 10(1), 5598. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13609-0>
- Du, M., Kodner, S., & Bai, L. (2019). Enhancement of LacI binding in vivo. *Nucleic Acids Research*, 47(18), 9609–9618. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz698>
- Durand, R. E., & Olive, P. L. (1982). Cytotoxicity, mutagenicity and dna damage by hoechst 33342. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 30(2), 111–116. <https://doi.org/10.1177/30.2.7061816>
- Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M., & Liu, L. F. (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *The Journal of Cell Biology*, 100(5), 1706–1715. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.5.1706>
- Fairall, L., Schwabe, J. W. R., Chapman, L., Finch, J. T., & Rhodes, D. (1993). The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature*, 366(6454), 483–487. <https://doi.org/10.1038/366483a0>
- Feng, S., Sekine, S., Pessino, V., Li, H., Leonetti, M. D., & Huang, B. (2017). Improved split fluorescent proteins for endogenous protein labeling. *Nature Communications*, 8(1), 370. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00494-8>
- Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., & Mirny, L. A. (2016). Formation of chromosomal domains by loop extrusion. *Cell Reports*, 15(9), 2038–2049. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.085>
- Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S., & Yanagida, M. (1993). Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *The Journal of Cell Biology*, 121(5), 961–976. <https://doi.org/10.1083/jcb.121.5.961>
- Gallardo, P., Barrales, R. R., Daga, R. R., & Salas-Pino, S. (2019). Nuclear mechanics in the fission yeast. *Cells*, 8(10), 1285. <https://doi.org/10.3390/cells8101285>
- Germier, T., Kocanova, S., Walther, N., Bancaud, A., Shaban, H. A., Sellou, H., Politi, A. Z., Ellenberg, J., Gallardo, F., & Bystricky, K. (2017). Real-time imaging of a single gene reveals transcription-initiated local confinement. *Biophysical Journal*, 113(7), 1383–1394. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.014>
- Graham, T. G. W., Wang, X., Song, D., Etson, C. M., Van Oijen, A. M., Rudner, D. Z., & Loparo, J. J. (2014). ParB spreading requires DNA bridging. *Genes & Development*, 28(11), 1228–1238. <https://doi.org/10.1101/gad.242206.114>
- Guo, T., Feng, Y.-L., Xiao, J.-J., Liu, Q., Sun, X.-N., Xiang, J.-F., Kong, N., Liu, S.-C., Chen, G.-Q., Wang, Y., Dong, M.-M., Cai, Z., Lin, H., Cai, X.-J., & Xie, A.-Y. (2018). Harnessing accurate non-homologous end joining for efficient precise deletion in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Genome Biology*, 19(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1518-x>
- Hayles, J., & Nurse, P. (1992). Genetics of the fission yeast *schizosaccharomyces pombe*. *Annual Review of Genetics*, 26(1), 373–402. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.26.120192.002105>
- Hansen, J. C., Maeshima, K., & Hendzel, M. J. (2021). The solid and liquid states of chromatin. *Epigenetics & Chromatin*, 14(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00424-5>

- Hauer, M. H., Seeber, A., Singh, V., Thierry, R., Sack, R., Amitai, A., Kryzhanovska, M., Eglinger, J., Holcman, D., Owen-Hughes, T., & Gasser, S. M. (2017). Histone degradation in response to DNA damage enhances chromatin dynamics and recombination rates. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(2), 99–107. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3347>
- Hoogsteen, K. (1959). The structure of crystals containing a hydrogen-bonded complex of 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallographica*, 12(10), 822–823. <https://doi.org/10.1107/S0365110X59002389>
- Yamano, T., Nishimasu, H., Zetsche, B., Hirano, H., Slaymaker, I. M., Li, Y., Fedorova, I., Nakane, T., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2016). Crystal structure of cpf1 in complex with guide rna and target dna. *Cell*, 165(4), 949–962. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.003>
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An introduction to performing immunofluorescence staining. W. H. Yong (Sud.), *Biobanking* (T. 1897, p. 299–311). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Ishikawa, K., Soejima, S., Masuda, F., & Saitoh, S. (2021). Implementation of dCas9-mediated CRISPRi in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 11(4), jkab051. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab051>
- Ishikawa, K., Soejima, S., & Saitoh, S. (2023). Genetic knockdown of genes that are obscure, conserved and essential using CRISPR interference methods in the fission yeast *S. pombe*. *Journal of Cell Science*, 136(9), jcs261186. <https://doi.org/10.1242/jcs.261186>
- Jones, D. L., Leroy, P., Unoson, C., Fange, D., Ćurić, V., Lawson, M. J., & Elf, J. (2017). Kinetics of dCas9 target search in *Escherichia coli*. *Science*, 357(6358), 1420–1424. <https://doi.org/10.1126/science.aah7084>
- Kanda, T., Sullivan, K. F., & Wahl, G. M. (1998). Histone–GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Current Biology*, 8(7), 377–385. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70156-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70156-3)
- Köcker, T., Fernandez, A., & Pinaud, F. (2018). Characterization of split fluorescent protein variants and quantitative analyses of their self-assembly process. *Scientific Reports*, 8(1), 5344. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23625-7>
- Lacen, A. N., & Lee, H.-T. (2024). Tracing the chromatin: From 3c to live-cell imaging. *Chemical & Biomedical Imaging*, 2(10), 659–682. <https://doi.org/10.1021/cbmi.4c00033>
- Lassadi, I., Kamgoué, A., Goiffon, I., Tanguy-le-Gac, N., & Bystricky, K. (2015). Differential chromosome conformations as hallmarks of cellular identity revealed by mathematical polymer modeling. *PLOS Computational Biology*, 11(6), e1004306. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004306>
- Leuba, S. H., Yang, G., Robert, C., Samori, B., Van Holde, K., Zlatanova, J., & Bustamante, C. (1994). Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24), 11621–11625. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11621>
- Li, G., Levitus, M., Bustamante, C., & Widom, J. (2005). Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(1), 46–53. <https://doi.org/10.1038/nsmb869>
- Lindhout, B. I., Fransz, P., Tessadori, F., Meckel, T., Hooykaas, P. J. J., & Van Der Zaal, B. J. (2007). Live cell imaging of repetitive DNA sequences via GFP-tagged polydactyl zinc finger proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(16), e107–e107. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm618>

- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Lukinavičius, G., Blaukopf, C., Pershagen, E., Schena, A., Reymond, L., Derivery, E., Gonzalez-Gaitan, M., D'Este, E., Hell, S. W., Wolfram Gerlich, D., & Johnsson, K. (2015). SiR–Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy. *Nature Communications*, 6, 8497. <https://doi.org/10.1038/ncomms9497>
- Luperchio, T. R., Sauria, M. E., Wong, X., Gaillard, M.-C., Tsang, P., Pekrun, K., Ach, R. A., Yamada, N. A., Taylor, J., & Reddy, K. L. (2017). *Chromosome conformation paints reveal the role of lamina association in genome organization and regulation*. <https://doi.org/10.1101/122226>
- Ma, H., Reyes-Gutierrez, P., & Pederson, T. (2013). Visualization of repetitive DNA sequences in human chromosomes with transcription activator-like effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), 21048–21053. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319097110>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Maundrell, K. (1990). Nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 10857–10864.
- Maundrell, K., Hutchison, A., & Shall, S. (1988). Sequence analysis of ARS elements in fission yeast. *The EMBO Journal*, 7(7), 2203–2209. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03059.x>
- Mazumdar, M., Sundareshan, S., & Misteli, T. (2004). Human chromokinesin KIF4A functions in chromosome condensation and segregation. *The Journal of Cell Biology*, 166(5), 613–620. <https://doi.org/10.1083/jcb.200401142>
- Meaburn, K. J., & Misteli, T. (2007). Chromosome territories. *Nature*, 445(7126), 379–381. <https://doi.org/10.1038/445379a>
- Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R., & Mattoussi, H. (2005). Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*, 4(6), 435–446. <https://doi.org/10.1038/nmat1390>
- Michaelis, C., Ciosk, R., & Nasmyth, K. (1997). Cohesins: Chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, 91(1), 35–45. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)80007-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)80007-6)
- Miyanari, Y., Ziegler-Birling, C., & Torres-Padilla, M.-E. (2013). Live visualization of chromatin dynamics with fluorescent TALEs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(11), 1321–1324. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2680>
- Mizuguchi, T., Fudenberg, G., Mehta, S., Belton, J.-M., Taneja, N., Folco, H. D., FitzGerald, P., Dekker, J., Mirny, L., Barrowman, J., & Grewal, S. I. S. (2014). Cohesin-dependent globules and heterochromatin shape 3D genome architecture in *S. pombe*. *Nature*, 516(7531), 432–435. <https://doi.org/10.1038/nature13833>
- Mochalin, V. N., Shenderova, O., Ho, D., & Gogotsi, Y. (2012). The properties and applications of nanodiamonds. *Nature Nanotechnology*, 7(1), 11–23. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.209>
- Moscou, M. J., & Bogdanove, A. J. (2009). A simple cipher governs dna recognition by tal effectors. *Science*, 326(5959), 1501–1501. <https://doi.org/10.1126/science.1178817>
- Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F. H., Rox Anderson, R., Schwarzenberger, K., & Young, R. C. (2012). Introduction to confocal microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12), 1–5. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.429>

- Petrova, B., Dehler, S., Kruitwagen, T., Hériché, J.-K., Miura, K., & Haering, C. H. (2013). Quantitative analysis of chromosome condensation in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 33(5), 984–998. <https://doi.org/10.1128/MCB.01400-12>
- Pidoux, A. L., & Allshire, R. C. (2004). Kinetochore and heterochromatin domains of the fission yeast centromere. *Chromosome Research*, 12(6), 521–534. <https://doi.org/10.1023/B:CHRO.0000036586.81775.8b>
- Pjura, P. E., Grzeskowiak, K., & Dickerson, R. E. (1987). Binding of Hoechst 33258 to the minor groove of B-DNA. *Journal of Molecular Biology*, 197(2), 257–271. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90123-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90123-9)
- Poonperm, R., Takata, H., Hamano, T., Matsuda, A., Uchiyama, S., Hiraoka, Y., & Fukui, K. (2015). Chromosome scaffold is a double-stranded assembly of scaffold proteins. *Scientific Reports*, 5(1), 11916. <https://doi.org/10.1038/srep11916>
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing crispr as an rna-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Rao, S. S. P., Huntley, M. H., Durand, N. C., Stamenova, E. K., Bochkov, I. D., Robinson, J. T., Sanborn, A. L., Machol, I., Omer, A. D., Lander, E. S., & Aiden, E. L. (2014). A 3d map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, 159(7), 1665–1680. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021>
- Ratilainen, T., Holmén, A., Tuite, E., Nielsen, P. E., & Nordén, B. (2000). Thermodynamics of sequence-specific binding of PNA to DNA. *Biochemistry*, 39(26), 7781–7791. <https://doi.org/10.1021/bi000039g>
- Robinett, C. C., Straight, A., Li, G., Willhelm, C., Sudlow, G., Murray, A., & Belmont, A. S. (1996). In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *The Journal of Cell Biology*, 135(6), 1685–1700. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1685>
- Robinson, P. J. J., Fairall, L., Huynh, V. A. T., & Rhodes, D. (2006). EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6506–6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601212103>
- Saad, H., Gallardo, F., Dalvai, M., Tanguy-le-Gac, N., Lane, D., & Bystricky, K. (2014). Dna dynamics during early double-strand break processing revealed by non-intrusive imaging of living cells. *PLOS Genetics*, 10(3), e1004187. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004187>
- Samejima, K., Samejima, I., Vagnarelli, P., Ogawa, H., Vargiu, G., Kelly, D. A., De Lima Alves, F., Kerr, A., Green, L. C., Hudson, D. F., Ohta, S., Cooke, C. A., Farr, C. J., Rappsilber, J., & Earnshaw, W. C. (2012). Mitotic chromosomes are compacted laterally by KIF4 and condensin and axially by topoisomerase II α . *Journal of Cell Biology*, 199(5), 755–770. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202155>
- Sanchez, A., Cattoni, D. I., Walter, J.-C., Rech, J., Parmeggiani, A., Nollmann, M., & Bouet, J.-Y. (2015). Stochastic self-assembly of parB proteins builds the bacterial dna segregation apparatus. *Cell Systems*, 1(2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.07.013>
- Schiklenk, C., Petrova, B., Kschonsak, M., Hassler, M., Klein, C., Gibson, T. J., & Haering, C. H. (2018). Control of mitotic chromosome condensation by the fission yeast transcription factor Zas1. *The Journal of Cell Biology*, 217(7), 2383–2401. <https://doi.org/10.1083/jcb.201711097>

- Schirripa Spagnolo, C., & Luin, S. (2022). Choosing the probe for single-molecule fluorescence microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14949. <https://doi.org/10.3390/ijms232314949>
- Seeber, A., Hauer, M., & Gasser, S. M. (2013). Nucleosome remodelers in double-strand break repair. *Current Opinion in Genetics & Development*, 23(2), 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.12.008>
- Shaban, H. A., Barth, R., Recoules, L., & Bystricky, K. (2020). Hi-D: Nanoscale mapping of nuclear dynamics in single living cells. *Genome Biology*, 21(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02002-6>
- Sharonov, A., & Hochstrasser, R. M. (2006). Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50), 18911–18916. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609643104>
- Singh, D., Sternberg, S. H., Fei, J., Doudna, J. A., & Ha, T. (2016). Real-time observation of DNA recognition and rejection by the RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature Communications*, 7(1), 12778. <https://doi.org/10.1038/ncomms12778>
- Singh, D., Wang, Y., Mallon, J., Yang, O., Fei, J., Poddar, A., Ceylan, D., Bailey, S., & Ha, T. (2018). Mechanisms of improved specificity of engineered Cas9s revealed by single-molecule FRET analysis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(4), 347–354. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0051-7>
- Strohkendl, I., Saifuddin, F. A., Rybarski, J. R., Finkelstein, I. J., & Russell, R. (2018). Kinetic basis for dna target specificity of crispr-cas12a. *Molecular Cell*, 71(5), 816–824.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.043>
- Tamura, R., Jiang, F., Xie, J., & Kamiyama, D. (2021). Multiplexed labeling of cellular proteins with split fluorescent protein tags. *Communications Biology*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01780-4>
- Tatebe, H., Goshima, G., Takeda, K., Nakagawa, T., Kinoshita, K., & Yanagida, M. (2001). Fission yeast living mitosis visualized by GFP-tagged gene products. *Micron*, 32(1), 67–74. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(00\)00023-8](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(00)00023-8)
- Thoma, F., Koller, T., & Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *The Journal of Cell Biology*, 83(2), 403–427. <https://doi.org/10.1083/jcb.83.2.403>
- Torres-Garcia, S., Di Pompeo, L., Eivers, L., Gaborieau, B., White, S. A., Pidoux, A. L., Kanigowska, P., Yaseen, I., Cai, Y., & Allshire, R. C. (2020). SpEDIT: A fast and efficient CRISPR/Cas9 method for fission yeast. *Wellcome Open Research*, 5, 274. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16405.1>
- Turchiano, G., Andrieux, G., Klermund, J., Blattner, G., Pennucci, V., El Gaz, M., Monaco, G., Poddar, S., Mussolino, C., Cornu, T. I., Boerries, M., & Cathomen, T. (2021). Quantitative evaluation of chromosomal rearrangements in gene-edited human stem cells by CAST-Seq. *Cell Stem Cell*, 28(6), 1136–1147.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.002>
- Uzawa, S., & Yanagida, M. (1992). Visualization of centromeric and nucleolar DNA in fission yeast by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Cell Science*, 101(2), 267–275. <https://doi.org/10.1242/jcs.101.2.267>
- Vignard, J., Mirey, G., & Salles, B. (2013). Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. *Radiotherapy and Oncology*, 108(3), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.013>

- Viushkov, V. S., Lomov, N. A., Rubtsov, M. A., & Vassetzky, Y. S. (2022). Visualizing the genome: Experimental approaches for live-cell chromatin imaging. *Cells*, 11(24), 4086. <https://doi.org/10.3390/cells11244086>
- Vještica, A., Marek, M., Nkosi, P. J., Merlini, L., Liu, G., Bérard, M., Billault-Chaumartin, I., & Martin, S. G. (2020). A toolbox of stable integration vectors in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*, 133(1), jcs240754. <https://doi.org/10.1242/jcs.240754>
- Weisman, R., Roitburg, I., Nahari, T., & Kupiec, M. (2005). Regulation of leucine uptake by tor1+ in *schizosaccharomyces pombe* is sensitive to rapamycin. *Genetics*, 169(2), 539–550. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.034983>
- Zetsche, B., Heidenreich, M., Mohanraju, P., Fedorova, I., Kneppers, J., DeGennaro, E. M., Winblad, N., Choudhury, S. R., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Wu, W. Y., Scott, D. A., Severinov, K., van der Oost, J., & Zhang, F. (2017). Multiplex gene editing by CRISPR–Cpf1 using a single crRNA array. *Nature Biotechnology*, 35(1), 31–34. <https://doi.org/10.1038/nbt.3737>
- Zhang, X.-H., Tee, L. Y., Wang, X.-G., Huang, Q.-S., & Yang, S.-H. (2015). Off-target effects in crispr/cas9-mediated genome engineering. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4, e264. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.37>
- Zhao, Y., & Boeke, J. D. (2020). CRISPR–Cas12a system in fission yeast for multiplex genomic editing and CRISPR interference. *Nucleic Acids Research*, 48(10), 5788–5798. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa329>