

Małgorzata Milewska-Puchała

**Wpływ białka CTCF na strukturę genomu ssaków i jego rola
w utrzymaniu spójności ekspresji genów**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Biologii
Chromatyny i Epigenomiki
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
dr hab. Aleksandra Pękowska,
prof. Instytutu Nenckiego PAN

Warszawa, 2025

Praca finansowana ze środków:



Grantu OPUS17 Narodowego Centrum Nauki przyznanych dr hab.
Aleksandrze Pękowskiej na podstawie decyzji nr.: 2019/33/B/NZ2/02437,
„Regulacja i dynamika czasowo-przestrzenna elementów insulatorowych
w rozwoju ssaków

oraz



Preludium22 Narodowego Centrum Nauki przyznanych mgr inż. Małgorzacie
Milewskiej-Puchale na podstawie decyzji nr.: 2023/49/N/NZ2/04203,
„Identyfikacja ncRNA istotnych dla dynamiki Ctcf w rozwoju ssaków.”

”



STRESZCZENIE

CTCF to zachowane w toku ewolucji białko wiążące DNA, kluczowe dla regulacji trójwymiarowej architektury genomu. Wyznacza granice domen powiązanych topologicznie (TAD, z ang. *topologically associated domain*) i reguluje interakcje między promotorami a wzmacniaczami. W komórkach ssaków wykazano, że lokalizacja miejsc wiązania CTCF (CBS, z ang. *CTCF binding sites*) pozostaje w dużej mierze niezmienna podczas różnicowania embrionalnych komórek macierzystych (ES, z ang. *embryonic stem cells*) do progenitorowych komórek pnia nerwowego (NS z ang. *neural stem cells*), mimo wzrostu liczby i stabilności pętli chromatynowych. Zmiany architektury chromatyny w których uczestniczy CTCF mogą wpływać na regulację ekspresji genów. Nie jest jednak jasne, czy i w jaki sposób funkcje CTCF zmienia się w trakcie rozwoju.

Celem tej rozprawy doktorskiej było określenie roli białka CTCF w regulacji ekspresji genów podczas różnicowania komórek embrionalnych. W badaniach wykorzystano system degronowy CTCF umożliwiający kontrolowane i szybkie usunięcie białka CTCF w komórkach ES i NS. Następnie przeprowadzono profilowanie transkryptomów i regulomów w obu typach komórek. Wykazano, że utrata CTCF zmieniała ekspresję genów bez bezpośredniego wpływu na aktywność elementów regulatorowych. Geny o obniżonej ekspresji po usunięciu CTCF były wcześniej silnie eksprymowane i miały wiązanie CTCF w promotorze, natomiast geny o zwiększonej ekspresji cechowały się niskim poziomem transkrypcji i brakiem CTCF w promotorze. Dane te wspierają model, w którym w promotorach, CTCF wspomaga transkrypcję poprzez kontakt z odległymi wzmacniaczami, natomiast w regionach międzygenowych działa jako izolator.

Ponadto, wykazano, że mimo zachowanego wiązania z DNA, CTCF reguluje różne zestawy genów w komórkach ES i NS, co wskazuje na jego funkcje zależne od kontekstu epigenetycznego. Potwierdzono to edycją genomu w *locus Aldh1a3*. Dane proteomiczne otrzymane niezależnie w laboratorium, ujawniły zwiększoną interakcję CTCF z białkami wiążącymi RNA podczas różnicowania komórek ES do komórek NS. Komórki pozyskane w niniejszej pracy przyczyniły się do zidentyfikowania długiego niekodującego RNA (lncRNA, z ang. *non-long-coding RNA*) *Pantr1* jako mediatora tego procesu.

W ramach rozprawy opracowano wstępny projekt systemu wizualizacyjnego do obserwacji wybranych *loci* w żywych komórkach. To rozwiązanie to może stanowić podstawę do badania dynamiki interakcji między kotwicami pętli chromatyny w czasie rzeczywistym.

ABSTRACT

CTCF is a conserved DNA-binding protein that plays a key role in regulating the three-dimensional architecture of the genome. It defines the boundaries of topologically associated domains (TADs) and controls interactions between promoters and enhancers. In mammalian cells, the positions of CTCF-binding sites (CBS) have been shown to remain essentially unchanged during embryonic stem (ES) cell to neural stem (NS) cell differentiation, despite an increase in the number and stability of chromatin loops. Changes in chromatin architecture involving CTCF may influence its role in regulating gene expression. However, it remains unclear whether, and how, this regulatory function changes during development.

This doctoral thesis aimed to address this question and assess the functions of CTCF during the differentiation of ES cells into NS cells. To investigate this, a CTCF degron system enabling precise, inducible protein depletion was used, followed by transcriptome and regulome profiling in both cellular states. CTCF loss altered gene expression, but did not directly affect regulatory element activity. Genes downregulated upon CTCF depletion were highly expressed and contained CTCF binding at their promoters, whereas upregulated genes showed low basal expression and lacked promoter-bound CTCF. These findings support a model in which promoter-bound CTCF facilitates transcription by mediating contacts with distal enhancers, while intergenic CTCF acts as an insulator. The experiments outlined in this dissertation revealed that, despite stable DNA binding, CTCF regulates distinct gene sets in ES and NS cells, indicating cell-type-specific functions of this factor in development. This was further validated by genome editing at the *Aldh1a3* locus. To unveil what underlies the changes in CTCF functions in development, proteomic analysis was performed independently in the lab. These data revealed enhanced interactions between CTCF and RNA-binding proteins (RBP) in the NS compared to the ES cells. The cells derived in this work help identify long non-coding RNA (lncRNA) *Pantr1* as a mediator of the gain of CTCF-RBP interactions upon the ES-to-NS transition. In addition, a visualisation system was developed to monitor selected genomic *loci* in living cells, which has the potential, in the future, to enable real-time tracking of chromatin loop anchor dynamics.

In summary, although the localisation of CTCF binding sites remains stable during differentiation, its transcriptional regulatory function is dynamic and highly context-dependent.

SPIS TREŚCI

WSTĘP	16
1. Regulacja ekspresji genów i organizacja genomu	16
1.1. Przestrzenna regulacja ekspresji genów: rola elementów cis-regulatorowych.	17
1.2. Epigenetyczna kontrola ekspresji genów w trakcie różnicowania komórek...	19
1.3. Historyczne i współczesne podejścia do organizacji przestrzennej genomu ..	21
1.4. Mapy kontaktów Hi-C - narzędzie analizy organizacji przestrzennej genomu	23
2. Białko CTCF: kluczowy regulator architektury genomu oraz interakcji między CRE ..	26
2.1. Białko CTCF jako izolator genomu, czyli czynnik umożliwiający blokowanie niepożądanych interakcji między CRE	28
2.2. Funkcja CTCF w organizacji przestrzennej genomu	28
2.3. Białko CTCF jako architekt genomu	33
2.4. Zaburzenie funkcji czynnika CTCF przyczynia się zmian fenotypowych	34
2.4.1. RNA jako regulator architektury jądra i aktywności transkrypcyjnej	37
2.4.2. Interakcje pomiędzy RNA a białkiem CTCF i ich znaczenie funkcjonalne	38
3. Metody analizy funkcji białka CTCF i organizacji genomu	38
CEL PRACY	43
MATERIAŁY	45
1. Materiały laboratoryjne jednorazowego użytku	45
2. Sprzęt laboratoryjny	45
3. Linie komórkowe jako modele badawcze	46
3.1. Linie ES i NS	46
3.2. Linie nowotworowe	50
4. Odczynniki stosowane do hodowli komórkowej	51
4.1. Hodowla linii ES w warunkach standardowych (FBS/LIF)	51
4.2. Hodowla komórek ES w warunkach (2i/LIF)	51
4.3. Hodowla komórek NS	52
4.4. Hodowla komórek HEK293	53
4.5. Inne odczynniki stosowane przy hodowli komórkowej	53
4.6. Antybiotyki selekcyjne	53

4.7. Znacznik HaloTag wykorzystane do detekcji metki Halo	54
5. Odczynniki stosowane w eksperymentach biologii molekularnej	54
5.1. Enzymy restrykcyjne.....	54
5.2. Odczynniki do klonowania molekularnego	54
5.3. Oczyszczanie i izolacja fragmentów DNA.....	55
5.4. Antybiotyki stosowane w hodowli bakterii.....	56
5.5. Odczynniki do transfekcji komórek ssaczych.	56
5.6. Odczynniki do genotypowania	57
5.7. Odczynniki do rozdziłu elektroforetycznego	57
6. Odczynniki do analizy aktywności genomu	57
6.1. RNA-seq	57
6.2 ATAC-seq	58
6.3. ChIP-seq.....	58
7. Odczynniki wykorzystane do konstrukcji systemu wizualizacji.....	59
7.1. Projektowanie zmodyfikowanych jednostek CARGO.....	59
7.2. Plazmid użyty jako wektor w konstrukcji wektora CARGO	60
7.3. Sekwencje ukierunkowujące na powtórzenia telomerowe	61
7.4. Sekwencje starterów sgRNA ukierunkowanych na kotwice pętli w <i>locus Celf4</i>	61
7.5. Zestawy i materiały wykorzystane do konstrukcji wektorów metodą CARGO.	65
7.6. Plazmidy wykorzystane do konstrukcji wektorów ekspresyjnych	65
7.7. Plazmidy lentiwirusowe wykorzystane do produkcji cząsteczek wirusa	66
METODYKA	67
Część I i II Analiza funkcji CTCF i ncRNA regulującego jego aktywność w komórkach ES i NS	67
1. Warunki hodowli komórkowej.....	67
1.1. Hodowla linii ES w warunkach standardowych (FBS/LIF)	67
1.2. Hodowla linii ES w warunkach (2i/LIF)	68
1.3. Hodowla komórek NS.....	68
1.4. Warunki hodowli linii HEK293K.....	69
1.5. Procedura wyznaczania krzywej śmierci komórek.....	70

1.6. Selekcja prekursorów neuronalnych z użyciem markera CD44.....	70
1.7. Mrożenie komórek.....	71
1.8. Degradacja CTCF wywołana auksyną.....	71
2. Analiza dostępności chromatyny	71
2.1. RNA-seq.....	72
2.2. ATAC-seq.....	73
2.3. ChIP-seq	73
2.4. Analiza bioinformatyczna	73
3. Techniki biologii molekularnej.....	74
3.1. Hodowla bakterii <i>Escherichia coli</i>	74
3.2. Edycja genomu CRISPR-Cas9 w komórkach ES	75
3.3. Generowanie prób kontrolnych.....	78
3.4. Analiza ekspresji genów: izolacja RNA i analiza ilościowa	79
Część III Konstrukcja systemu do pomiaru kinetyki interakcji pomiędzy kotwicami pętli w czasie rzeczywistym	81
4. Projektowanie i konstrukcja narzędzia do wizualizacji <i>loci</i>	81
4.1. Projektowanie i konstrukcja narzędzia do wizualizacji kotwic pętli w czasie rzeczywistym.....	82
5. Nadekspresja wybranych białek w komórkach ES i NS.....	86
5.1. Produkcja wektora lentiwirusowego umożliwiającego ekspresję białek	86
5.2. Transdukcja lentiwirusowa komórek ES i NS.....	87
5.3. Oznaczenie toksycznego poziomu blastycydyny	88
6. Projektowanie i konstrukcja wektorów zawierających sgRNA.....	88
6.1. Projektowanie oligonukleotydów umożliwiających wizualizację kotwic pętli w czasie rzeczywistym	92
6.2. Fosforylacja i hybrydyzacja wybranych oligonukleotydów	93
6.3. Przygotowanie zmodyfikowanych jednostek CARGO.....	93
6.4. przygotowanie wektora docelowego.	94
6.5. Tworzenie struktur minicircle sgRNA.....	94
6.6. Ligacja wektora px-filler z jednostkami CARGO zawierającymi sgRNA	95
6.7. Transformacja i walidacja	96
7. Wizualizacja.....	97

7.1. Przygotowanie komórek do wizualizacji	97
7.2. Obrazowanie	97
7.3. Obróbka obrazów mikroskopowych	97
WYNIKI.....	98
Część I Analiza wpływu CTCF w regulacji ekspresji genów różnicowania	98
1. Rola CTCF w regulacji ekspresji genów	98
1.1. Funkcje izolacyjne CTCF determinują zmiany transkrypcyjne	101
1.2. Zyskanie funkcji CTCF jako izolatora po utracie pluripotencji.....	103
1.3. Utrata pluripotencji komórki wzmacnia rolę CTCF jako izolatora	109
Podsumowanie części I.....	114
Część II Identyfikacja ncRNA istotnych w topologii chromatyny	115
2. ncRNA stabilizuje interakcję CTCF-RBP w komórkach NS.	115
Podsumowanie części II.....	122
Część III Przyżyciowa analiza kinetyki pętli CTCF w komórkach ES i NS.....	123
3.Strategia eksperymentalna badająca kinetykę pętli CTCF w żywych komórkach	123
3.1. Wybór <i>locus</i>	124
3.2. Konstrukcja stałej linii komórkowej ES i NS do wizualizacji <i>loci</i>	127
3.3. Wizualizacja i testowanie systemu.....	130
Podsumowanie części III.....	134
DYSKUSJA.....	135
PODSUMOWANIE I WNIOSKI	148
BIBLIOGRAFIA	149
PUBLIKACJE DOKTORANTKI.....	173

SPIS SKRÓTÓW

ATAC-seq - z ang. *Assay for Transposase-Accessible Chromatin using Sequencing*, sekwencjonowanie dostępności chromatyny z użyciem transpozazy

Aldh1a3 - z ang. *aldehyde dehydrogenase 1 family member A3*

BSA - z ang. *bovine serum albumin*, albumina surowicy bydlęcej

Cas9 - z ang. *CRISPR-associated protein 9*, endonukleaza, która tnie DNA w konkretnym miejscu, wskazanym przez sgRNA

CARGO - z ang. *Chimeric Array of gRNA Oligonucleotides*, system do seryjnego klonowania wielu powtarzających się modułów do jednego wektora docelowego

ChIP-seq - z ang. *chromatin immunoprecipitation-sequencing*, immunoprecypitacja chromatyny połączona z sekwencjonowaniem

CHIR - CHIR99021 z ang. *Glycogen Synthase Kinase3*, selektywny inhibitor kinazy GSK-3)

CRE - z ang. *cis-regulatory elements*, elementy cis-regulatorowe

CRISPR - z ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, sekwencje DNA bakterii stanowiące podstawę systemu edycji genów CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 - z ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9* system do edycji genomu, który wykorzystuje CRISPR jako mechanizm rozpoznawania DNA sekwencji oraz endonukleazę Cas9 jako narzędzie tnące DNA

CTCF - z ang. *CCCTC-binding factor*, białko wiążące motyw CCCTC w genomie

DEG - z ang. *differentially expressed genes*, geny o zmienionej ekspresji

dCas9 - z ang. „*dead*” *Cas9*, nieaktywna forma endonukleazy Cas9

DMSO - dimetylosulfotlenek

dpBS - z ang. *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*, bufor fosforanowy bez dodatku wapnia i magnezu

EGF - z ang. *Epidermal Growth Factor*, czynnik wzrostu naskórka

ES - z ang. *embryonic stem cells*, komórki macierzyste embrionalne

FGF - z ang. *Fibroblast Growth Factor*, czynnik wzrostu fibroblastów

fRIP - z ang. *fragmented RNA immunoprecipitation*, immunoprecypitacja pofragmentowanego RNA

HEPES - kwas N-2-hydroksyetylopiperazyno-N'-2-etanosulfonowy

Hi-C - technika mapowania interakcji chromatyny na skalę genomową

hiPSC - z ang.: human induced pluripotent stem cells, ludzkie indukowane komórki pluripotencjalne

ICR - z ang. *Imprinting Control Region*, region kontrolujący imprinting genomowy

IP - z ang. *Immunoprecipitation*, imuunoprecypitacja

kDa - kilodalton, jednostka masy cząsteczkowej

kpz - kilo par zasad

LB - z ang. *Lysogeny Broth*, pożywka do hodowli bakterii

LB-agar - stała forma pożywki LB zawierająca agar

LIPS - z ang. *Liquid-Liquid Phase Separation*

lncRNA - z ang. *long non-coding RNA*, długie niekodujące RNA

mRNA - z ang. *messenger RNA*, informacyjny RNA

NEAA - z ang. *non-essential amino acids*, aminokwasy nieesencjalne

nt - nukleotyd

ncRNA - z ang. *non-coding RNA*, niekodujące RNA

NS - z ang. *neural stem cells*, komórki pnia układu nerwowego, neuronalne komórki progenitorowe

OD - z ang. *optical density*, gęstość optyczna

PAR-CLIP - z ang. *photoactivatable ribonucleoside - enhanced crosslinking and immunoprecipitation*, technika krzyżowego wiązania RNA-białko z użyciem fotoaktywowanych rybonukleozydów

PCR - z ang. *polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy

pz - para zasad

RBR - z ang. *RNA-binding region*, region wiążący RNA

RBP - z ang. *RNA-binding proteins*, białka wiążące RNA

RNA-seq - z ang. *RNA-sequencing*, sekwencjonowanie RNA

Rpm - z ang. *rotations per minute*, obroty na minutę

SICAP - z ang. *ChIP with selective isolation of chromatin - associated proteins*, ChIP z selektywną izolacją białek związanych z chromatyną

ssDNA - z ang. *Single-stranded DNA*, jednoliciowy DNA, domeny topologicznie asocjujące

TAE - Tris -Acetate-EDTA

TSS - z ang. *Transcription Start Site*, miejsce startu transkrypcji

WSTĘP

1. Regulacja ekspresji genów i organizacja genomu

Tożsamość komórkowa jest kształtowana przez charakterystyczny profil ekspresji genów, który warunkuje morfologię oraz funkcjonalność każdej komórki (Davidson & Erwin, 2006). Selektywne uruchamianie i wyciszanie konkretnych genów stanowi podstawę kształtowania wyspecjalizowanych typów komórkowych, a w konsekwencji organizacji tkanek i narządów podczas rozwoju, co jest istotne do utrzymania ogólnej homeostazy organizmu.

Pierwszym poziomem regulacji ekspresji genów jest transkrypcja czyli proces przepisywania informacji genetycznej z DNA na informacyjne RNA (mRNA, ang. *messenger RNA*). Na etapie inicjacji transkrypcji integrowane są sygnały środowiskowe oraz epigenetyczne które wpływają na dostępność promotorów dla czynników transkrypcyjnych regulując poziom aktywności transkrypcyjnej genów (M. Levine & Tjian, 2003; Spitz & Furlong, 2012). Następnie powstałe cząsteczki mRNA podlegają dalszej regulacji na poziomie post-transkrypcyjnym co pozwala precyzyjnie dostosować poziom białek w komórce. Krótkie cząsteczki RNA kontrolują syntezę białek, hamując translację lub inicjując degradację mRNA (Baralle & Giudice, 2017). Dodatkową warstwę regulacji stanowią modyfikacje potranslacyjne, które dynamicznie modulują aktywność białek.

Coraz więcej dowodów wskazuje jednak, że klasyczne mechanizmy regulacji nie wyjaśniają w pełni złożoności kontroli ekspresji genów (Dekker & Mirny, 2016a; Schoenfelder & Fraser, 2019a). W tym kontekście, kluczową rolę odgrywa przestrzenne ułożenie chromatyny, które determinuje nie tylko ogólną dostępność DNA dla czynników transkrypcyjnych, ale i również definiuje które elementy genomu mogą wchodzić ze sobą w fizyczną interakcję (Bonev & Cavalli, 2016; Rowley & Corces, 2018). Szczególnie istotne są interakcje pomiędzy regionami regulatorowymi a miejscami inicjacji transkrypcji które stanowią podstawę precyzyjnej kontroli ekspresji genów (M. E. Levine et al., 2018; Schoenfelder & Fraser, 2019b).

1.1. Przestrzenna regulacja ekspresji genów: rola elementów cis-regulatorowych.

Regulacja ekspresji genów u eukariontów jest procesem wielopoziomowym obejmującym kontrolę genetyczną wynikającą z sekwencji DNA, regulację epigenetyczną opartą na modyfikacjach chromatyny oraz kontrolę strukturalną związaną z trójwymiarową organizacją genomu. Centralną rolę w tym kontekście odgrywają elementy cis-regulatorowe (CRE, z ang. *cis-regulatory elements*) takie jak: promotory, wzmacniacze (z ang. *enhancers*), sekwencje wyciszające (z ang. *silencers*) i izolatory (z ang. *insulators*), które integrują sygnały pochodzące z licznych szlaków regulacyjnych i przez to wpływają na ilość powstałego transkryptu genu, czyli cząsteczki matrycowego RNA (mRNA) (X. Liu et al., 2023). Aktywność elementów regulatorowych zależy przede wszystkim od ich sekwencji nukleotydów oraz lokalnych modyfikacji chromatyny, które determinują ich dostępność oraz potencjał regulacyjny (Shlyueva et al., 2014a; Thurman et al., 2012).

Główne cechy różnych typów CRE:

- **Promotory** to elementy zlokalizowane w pobliżu miejsca inicjacji transkrypcji. Promotory umożliwiają złożenie kompleksu transkrypcyjnego i rozpoczęcie ekspresji genu (Hampsey, 1998).
- **Wzmacniacze** (ang. *enhancers*) zwiększają poziom transkrypcji, często działając na promotory zlokalizowane w znaczących odległościach od nich samych (Banerji et al., 1981; Shlyueva et al., 2014b). Wzmacniacze tworzą kontakt przestrzenny (pętle regulacyjne) z promotorem i dzięki tej interakcji wpływają na aktywność genów.
- **Sekwencje wyciszające** (ang. *silencers*) hamują aktywność promotorów czym obniżają ekspresję genów
- **Izolatory** (ang. *insulators*) hamują interakcje między poszczególnymi CRE. Poprzez organizację chromatyny w domeny regulacyjne (omówione poniżej), izolatory ograniczają zasięg działania wzmacniaczy czyli region genomu kontrolowany przez dany CRE zapobiegając niekontrolowanej aktywacji sąsiednich genów (Bell et al., 1999a). Dwa izolatory definiujące obie granice

danej domeny regulacyjnej często wchodzi ze sobą w kontakt fizyczny tworząc pętlę architektoniczną.

Jak opisano powyżej funkcjonalne pary CRE łączą się ze sobą fizycznie w jądrze komórkowym tworząc pętle. Niemniej jednak w genomach ssaków promotor i odpowiadający mu wzmacniacz często znajdują się w dużej odległości od siebie, mierzonej w parach zasad. W rezultacie trójwymiarowa architektura chromatyny w jądrze komórkowym odgrywa kluczową rolę w umożliwianiu tych interakcji i w regulacji aktywności genów. Trójwymiarowa organizacja genomu może z jednej strony faworyzować pewne interakcje między CRE, z drugiej strony izolatory blokują alternatywne układy par promotor-wzmacniacz przez co wpływają na precyzję regulacji transkrypcyjnej. W tym kontekście struktury wyższego rzędu takie jak: pętle chromatynowe czy domeny topologiczne (TAD, z ang. *topologically associated domain*), opisane szerzej w dalszej części pracy, stanowią funkcjonalne jednostki organizacji genomu sterujące tożsamością par promotor-wzmacniacz (Bulger & Groudine, 2011; Franke et al., 2016a; Ghavi-Helm et al., 2014; Oti et al., 2016; Phillips-Cremins & Corces, 2013; S. S. P. Rao et al., 2014a; L. Zhao et al., 2019). Asocjacje pomiędzy CRE których sekwencje DNA są zlokalizowane w obrębie tej samej domeny regulacyjnej, są preferencyjnie nawiązywane dzięki organizacji chromatyny w ramach TAD. Jednocześnie elementy znajdujące się w danym TAD pozostają funkcjonalnie odizolowane od sekwencji położonych poza jego granicami.

Białko wiążące sekwencję CCCTC (CTCF) oraz kompleks kohezyn składający się z białek SMC1, SMC3 (ang. *structural maintenance of chromosome 1, 3*) i Rad21, wyznaczają granice funkcjonalnych domen, oraz stabilizują pętle zapewniając selektywność kontaktów CRE chroniąc geny przed niewłaściwym działaniem wzmacniaczy (Dixon et al., 2012a; Ing Simons et al., 2015; Nora et al., 2012a; M. Rao & Gershon, 2016; Sofueva et al., 2013; Wutz et al., 2017). Mechanizmy prowadzące do powstawania tych struktur zostaną omówione w kolejnych rozdziałach.

Aktywność CRE jest modulowana w odpowiedzi na sygnały środowiskowe co pozwala komórce elastycznie dostosować ekspresję genów do zmieniających się potrzeb np. podczas różnicowania komórki. Klasycznym przykładem dalekosiężnej pary promotor-wzmacniacz ważnej dla rozwoju ssaków jest wzmacniacz sterujący ekspresją morfogenu Sonic hedgehog (*Shh*) podczas powstawania kończyn w embriogenezie

myszy. Wzmacniacz znany w literaturze pod angielską nazwą *Zone of Polarizing Activity Regulatory Sequence* (ZRS) znajduje się w odległości genomowej ponad 1 Mb od promotora genu *Shh*. Pomimo tak znaczącej ilości par zasad jaka dzieli te elementy w liniowej cząsteczce chromosomu, ZRS nawiązuje efektywny kontakt z promotorem tworząc pętlę chromatynową (regulacyjną), co w konsekwencji umożliwia aktywację ekspresji genu (Lettice et al., 2003; Paliou et al., 2019; Williamson et al., 2016a). Funkcja ZRS zależy również od lokalnego kontekstu epigenetycznego np.: od obecności czynników modulujących dostępność chromatyny, takich jak *ETV2*, które ułatwiają dostęp czynników transkrypcyjnych do wzmacniacza poprzez remodelowanie dostępności chromatyny. Przykład działania ZRS odzwierciedla ogólną regułę funkcjonowania CRE, których aktywność jest kontekstowa i powiązana z przestrzenną organizacją genomu.

Zrozumienie zasad funkcjonowania CRE w kontekście przestrzennej organizacji chromatyny jest kluczowe dla dalszej analizy mechanizmów regulacji ekspresji genów oraz ich roli w różnicowaniu komórkowym, utrzymaniu tożsamości komórkowej i potencjalnych zaburzeniach w chorobach genetycznych czy nowotworowych. **Jednym z kluczowych aspektów wymagających głębszego poznania jest to czy każdy wzmacniacz może regulować każdy promotor i jak potencjalna kompatybilność pomiędzy CRE wiąże się ze zdolnością par CRE do tworzenia kontaktów w trójwymiarowej przestrzeni jądra komórkowego.**

1.2. Epigenetyczna kontrola ekspresji genów w trakcie różnicowania komórek

W latach 40. XX wieku Conrad H. Waddington zaproponował koncepcję „epigenetycznego pejzażu”, która stała się metaforycznym ujęciem procesów różnicowania komórek podczas rozwoju embrionalnego. W jego modelu rozwijająca się komórka przypomina kulkę toczącą się po pofałdowanej powierzchni, doliny symbolizują konkretne tożsamości a wzniesienia fakt, iż przejścia między obranymi ścieżkami rozwojowymi są niezwykle mało prawdopodobne. Zaproponowany model podkreśla, że mimo identycznego DNA komórki podlegają wielopoziomowej regulacji, gdzie sygnały wewnętrzne i zewnętrzne kierują w stronę określonych ścieżek różnicowania (Waddington C.H., 1957). Obecnie wiemy, że wybór ścieżki różnicowania np.: w kierunku

linii erytrocytarnej lub neuronalnej zależy od dynamicznych interakcji pomiędzy czynnikami genetycznymi, a środowiskowymi (Han & Yoon, 2012; Theunissen & Jaenisch, 2014). Owocuje to tkankowo-specyficznym profilem ekspresji genów.

Epigenetyczne modyfikacje chromatyny mają wkład w regulację ekspresji genów podczas różnicowania komórek, modulując dostępność elementów regulatorowych oraz kształtując lokalną strukturę genomu. Metylacja DNA odgrywa tu kluczową rolę. W komórkach ES poziom metylacji DNA jest relatywnie niski, co sprzyja otwartej oraz aktywnej strukturze chromatyny, natomiast w trakcie różnicowania komórek obserwuje się dynamiczny wzrost metylacji w rejonach promotorów oraz wzmacniaczy, prowadzący do trwałego wyciszenia genów nieistotnych dla nowo powstałej linii komórkowej (Hawkins et al., 2010; Kaaij et al., 2013; Meissner et al., 2008).

Równolegle zachodzą zmiany w modyfikacjach histonów: tri-metylacja H3K27 (H3K27me3) katalizowana przez kompleks represyjny Polycomb 2 (ang. *Polycomb repressive complex 2*, PRC2) sprzyja tworzeniu regionów chromatyny o ograniczonej dostępności, natomiast acetylacja H3K27 (H3K27ac) katalizowana przez acetylotransferazy takie jak białko wiążące czynnik CREB (CBP, z ang. *CREB-binding protein*) lub białko p300 jest charakterystyczna dla aktywnych promotorów oraz wzmacniaczy, wpływając na profil ekspresji genów specyficzny dla danego typu komórki (Mikkelsen et al., 2007; Margueron & Reinberg, 2011; Creyghton et al., 2010; Ealo et al., 2024). Modyfikacje chromatyny wraz z dostępnością chromatyny, mierzoną m.in. za pomocą techniki ATAC-seq, umożliwiają elastyczną, komórkowo-specyficzną regulację aktywności CRE (Buenrostro et al., 2015). Z kolei aktywność CRE, zapewnia i stabilizuje program ekspresji genów charakterystyczny dla określonej tożsamości komórkowej.

1.3. Historyczne i współczesne podejścia do organizacji przestrzennej genomu

W klasycznym ujęciu genomu, dominującym przez dziesięciolecia, DNA postrzegano jako liniową sekwencję nukleotydów, analizowaną głównie pod kątem identyfikacji genów kodujących oraz lokalnych elementów regulatorowych, takich jak promotory czy wzmacniacze. Jednak najnowsze badania sugerują, że przestrzenna organizacja chromatyny, w tym formowanie terytoriów chromosomowych domen regulacyjnych (TAD) i pętli chromatynowych jest kluczowe dla precyzyjnej regulacji ekspresji genów, ponieważ decyduje o tym, które promotory mogą wchodzić w interakcje z konkretnymi wzmacniaczami. W tym kontekście CTCF pełni funkcję architekta, wyznaczając granice pętli i zapewniając selektywność tych kontaktów.

Dopiero na początku XXI wieku rozwój technik analizy konformacji przestrzennej chromatyny umożliwił kompleksowe badanie kontaktów pomiędzy fragmentami DNA. Wprowadzenie technologii hybrydyzacji *in situ* z użyciem znakowanych fluorescencyjnie sond (ang. *Fluorescence in situ Hybridisation*, FISH) było przełomem w badaniach nad strukturą chromatyny umożliwiając po raz pierwszy bezpośrednią obserwację ułożenia pojedynczych chromosomów czy ich fragmentów w jądrze komórkowym podczas interfazy cyklu komórkowego. Udowadniając organizację chromosomów w terytoria, FISH wykazało również nieprzypadkową lokalizację chromosomów w jądrze komórkowym (aktywne i małe chromosomy mają tendencje do przebywania w centrum jądra, natomiast chromosomy bogate w elementy hetero-chromatynowe są często ulokowane bliżej otoczki jądrowej)(M. Cremer et al., 2001; T. Cremer et al., 1993; Eils et al., 1996; Solovei et al., 2002; Zink et al., 1998). Dalszy rozwój FISH wykazał, że sprzężone ze sobą CRE czyli pary promotor wzmacniacz sterujące aktywnością danego genu są często bliżej siebie niż niezwiązane pary CRE a najnowsze wysokorozdzielcze FISH umożliwiło monitorowanie struktury domen czy kontaktów PE podczas rozwoju (Z. Chen et al., 2024a; Ohishi et al., 2024; Williamson et al., 2016b).

Niemniej jednak, bezpośrednie obserwacje zachowania wzmacniaczy i promotorów wskazują na złożoną relację pomiędzy stopniem upakowania chromatyny oraz bliskością pomiędzy elementami regulatorowymi w rozwoju. Aby lepiej zrozumieć te zależności rozwinięto metody cało-genomowych analiz konformacji chromatyny

(Benabdallah et al., 2019). Pierwszą z tych technik była z ang. *Chromosome Conformation Capture* (3C), która pozwalała analizować interakcje między dwoma wybranymi fragmentami genomu, co po raz pierwszy umożliwiło wykrycie metodą PCR funkcjonalnych pętli między wzmacniaczami a promotorami (Dekker et al., 2002). Następnie, wprowadzono technikę w literaturze znaną głównie pod jej angielską nazwą *Circular Chromosome Conformation Capture* (4C), która rozszerzyła możliwości analizy 3D na wszystkie interakcje wybranego fragmentu z resztą genomu, umożliwiając mapowanie sieci długodystansowych kontaktów w wybranych *loci* (Simonis et al., 2006; Z. Zhao et al., 2006).

Przełomem w tej dziedzinie było wprowadzenie metody z ang. *High-throughput Chromosome Conformation Capture* (Hi-C), która dzięki wysokoprzepustowemu sekwencjonowaniu umożliwia mapowanie kontaktów w całym genomie (Lieberman-Aiden et al., 2009; van Berkum et al., 2010). Przy zastosowaniu Hi-C możliwe stało się mapowanie trójwymiarowej architektury genomu z wysoką rozdzielczością, co pozwoliło po raz pierwszy zidentyfikować domeny TAD oraz kompartmenty chromosomowe (Dixon et al., 2012a; Nora et al., 2012a; S. S. P. Rao et al., 2014a). Główną zaletą Hi-C jest to że pozwala uchwycić architekturę genomu w sposób nieobciążony. Wadą tej techniki jest wysoki koszt wynikający z potrzeby głębokiego sekwencjonowania bibliotek. Ciekawym podejściem, umożliwiającym całogenomowe mapowanie pętli tworzących przez elementy wzbogacone w określone czynniki takie jak kompleks polimerazy II czy modyfikacje histonów jest, znana pod angielską nazwą technologia Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag sequencing (ChIA-PET). ChIA-PET umożliwia wysokorozdzielcze mapowanie par promotor-wzmacniacz w całym genomie (Benabdallah et al., 2019; G. Li et al., 2010; Szalaj & Plewczynski, 2018a; Tang et al., 2015).

Odkrycia opierające się na danych 4C, Hi-C czy ChIA-PET, znacznie poszerzyły wiedzę o organizacji chromatyny i jej wpływie na regulację ekspresji genów, a także stworzyły podstawy do badań nad dynamicznymi interakcjami elementów regulatorowych w biologii rozwoju, chorobach genetycznych i nowotworach (Su et al., 2020).

1.4. Mapy kontaktów Hi-C jako narzędzie analizy organizacji przestrzennej genomu

Technika Hi-C umożliwia analizę trójwymiarowej organizacji chromatyny w skali całego genomu. Metoda polega na utrwaleniu fizycznych interakcji pomiędzy fragmentami DNA, które mogą być odległe w sekwencji liniowej, lecz znajdują się w bliskim sąsiedztwie w przestrzeni jądra komórkowego, a następnie na przecięciu DNA enzymami restrykcyjnymi i ligowaniu sąsiadujących końców. Powstałe połączenia analizuje się za pomocą wysokoprzepustowego sekwencjonowania, co pozwala odtworzyć mapy kontaktów przestrzennych w genomie.

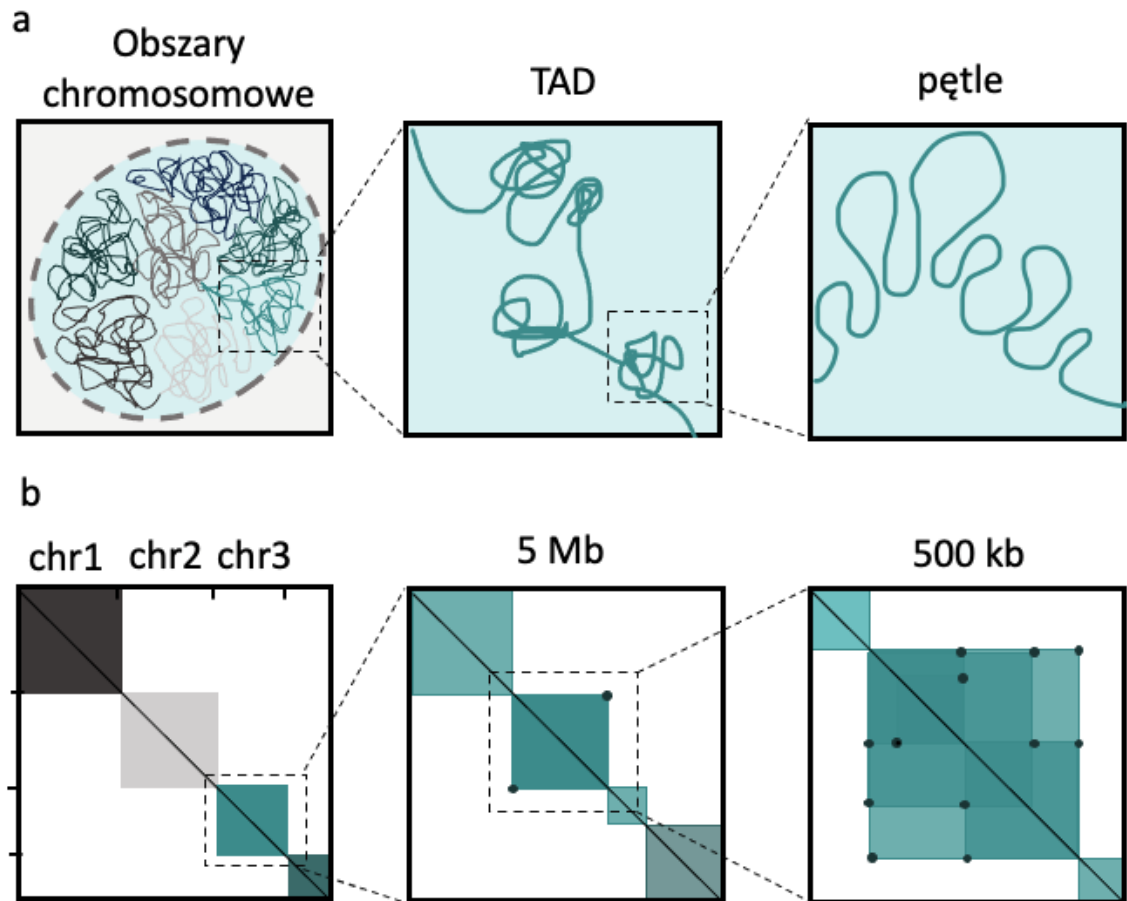
Mapy kontaktów Hi-C ujawniły podział chromatyny na dwa główne kompartmenty: kompartment A, który odpowiada regionom aktywnym transkrypcyjnie, oraz kompartment B, który odpowiada regionom nieaktywnym transkrypcyjnie (Lieberman-Aiden et al., 2009b). Co istotne, kompartmenty które odkrywamy w Hi-C odzwierciedlają znaną od dziesięcioleci a odkrytą przy użyciu mikroskopii elektronowej, segregację chromatyny w eu- i heterochomatynie (rycina 1 a, b; lewy panel).

Na wyższej rozdzielczości Hi-C pozwala identyfikować TAD, obejmujące odcinki genomu o długości kilkaset tysięcy par zasad do kilku mega par zasad. TAD to względnie autonomiczne jednostki organizacyjne genomu, w której DNA wchodzi przede wszystkim w interakcje wewnątrz-domenowe, pozostając stosunkowo izolowane od sąsiednich TAD. W obrębie swoich granic, TAD przecinają elementy regulatorowe takie jak: promotory, wzmacniacze i wyciszacze. Granice TAD działają jak izolatory, które ograniczają działanie tych elementów, sprzyjając tym precyzyjnej regulacji ekspresji genów (rycina 1 a, b; środkowy panel) (Dixon et al., 2012a; Sexton et al., 2012; Nora et al., 2012).

Tworzenie TAD i lokalnych pętli chromatynowych u ssaków zależy od aktywności kompleksu kohezyny która wytłacza pętle DNA, sprzyjając tym tworzeniu się kontaktów między sukcesywnymi fragmentami genomu. Proces wytłaczania pętli jest hamowany przez białko CTCF. Zahamowanie wytłaczania pętli w określonych miejscach, czyli miejscach wiązania czynnika CTCF definiuje granice domen (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012).

Proces wytlaczania pętli działa w szerszym kontekście, w którym dodatkowe właściwości fizykochemiczne białek, większych kompleksów białkowych i kompleksów białka-RNA wpływają na stopień upakowania chromatyny i jej strukturę. Asocjacje pomiędzy regionami wykazującymi podobną aktywność powodują segregację chromatyny do eu- oraz hetero-chromatyny. Najnowsze dane wskazują, że separacja faz ma wkład w tworzenie się tych ogólnych, wysoko rzędowych struktur upakowania DNA w jądrze komórkowym (Feric & Misteli, 2021; X. Li et al., 2023). W modelach teoretycznych wytłaczanie pętli może wpływać na dynamikę interakcji między regionami o podobnej aktywności genów (Nuebler et al., 2018). W obrębie kompartmentów powstają lokalne struktury chromatyny, takie jak TAD-y oraz pętle CTCF. Struktury te organizują genom na poziomie poszczególnych domen. Hierarchiczna organizacja chromatyny łączy globalną segregację fazową z lokalnymi interakcjami DNA w obrębie TAD (Nuebler et al., 2018).

Na mapach Hi-C, pętle widoczne są jako punktowe sygnały zwiększonej częstotliwości kontaktów (rycina 1, panel prawy a i b). Ich dynamika zależy od cyklu komórkowego, sygnalizacji oraz różnicowania komórek. Zaburzenia tej organizacji takie jak: mutacje granic TAD czy dysfunkcja CTCF, mogą prowadzić do nieprawidłowej aktywacji genów, deregulacji szlaków sygnałowych oraz chorób o podłożu genetycznym (Franke et al., 2016b; Lupiáñez et al., 2015).



Rycina 1: Hierarchiczna organizacja przestrzennej struktury chromatyny i jej prezentacja za pomocą map Hi-C.

a. Schemat przedstawia hierarchiczną organizację genomu w jądrze komórkowym. Na najwyższym poziomie chromatyna tworzy odrębne terytoria chromosomowe, gdzie kontakt między chromosomami jest ograniczony (lewy panel). W obrębie tych terytoriów występują domeny TAD (panel środkowy). Na najniższym poziomie widoczne są pętle chromatynowe łączące odległe elementy regulatorowe, jak promotory i wzmacniacze, co umożliwia precyzyjną regulację ekspresji genów (panel prawy).

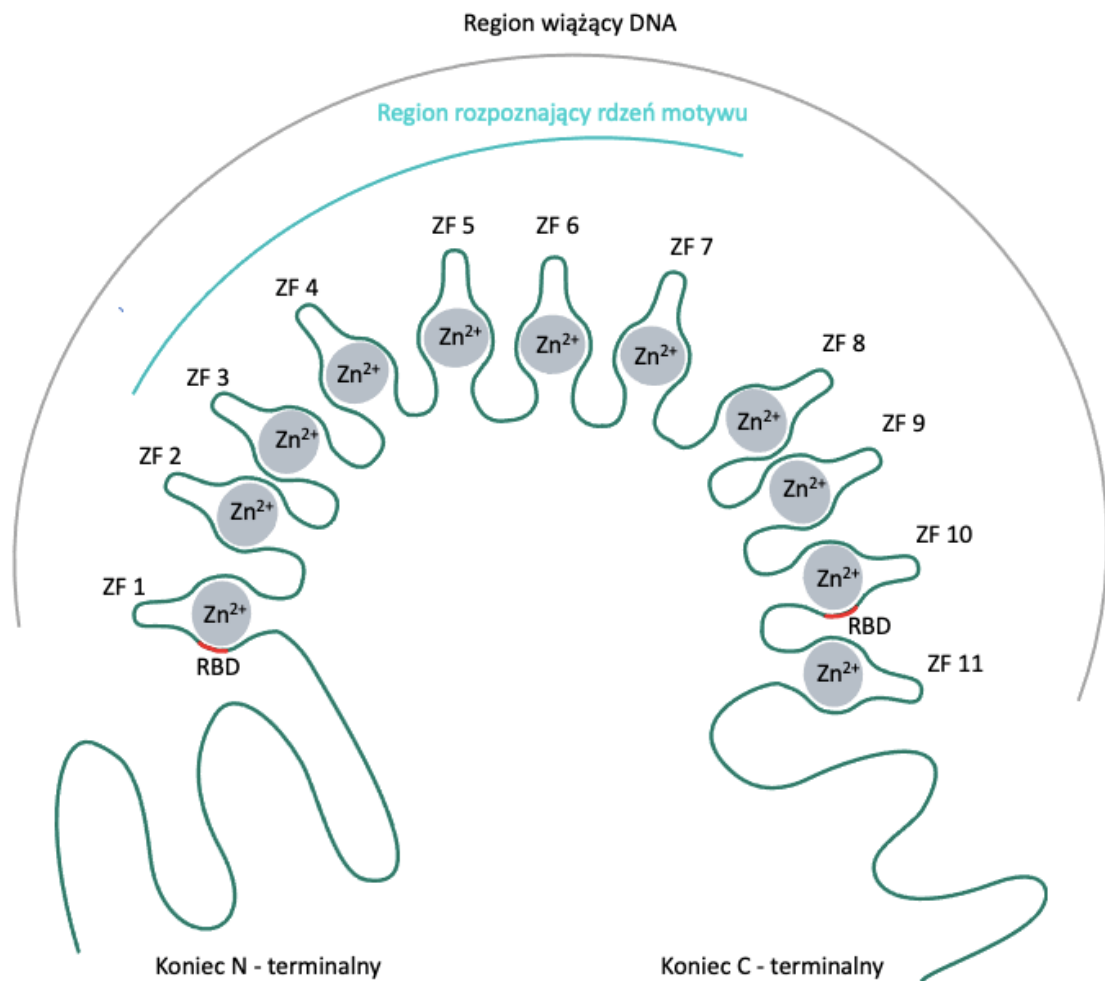
b. Schemat map kontaktów uzyskanych techniką Hi-C ilustrujący tę samą organizację względem panelu (a) w ujęciu ilościowym. Na poziomie całych chromosomów (chr1, chr2, chr3) izolowane terytoria chromosomowe widoczne są jako bloki na przekątnej macierzy (panel lewy). Powiększenie ujawnia domeny TAD jako kwadratowe regiony o podwyższonej gęstości kontaktów (panel środkowy). Największe powiększenie ukazuje lokalne pętle chromatynowe jako intensywne sygnały, odpowiadające bezpośrednim interakcjom między odległymi fragmentami genomu (panel prawy).

2. Białko CTCF: kluczowy regulator architektury genomu oraz interakcji między CRE

Czynnik wiążący CCTC (CTCF) to silnie zakonserwowane pod względem sekwencji aminokwasów białko jądrowe wiążące DNA pełniące kluczową rolę w organizacji genomu oraz regulacji ekspresji genów u ssaków (Filippova et al., 1996). Białko CTCF składa się z trzech głównych części: N-końcowej domeny regulacyjnej, centralnego regionu zawierającego jedenaście palców cynkowych typu C2H2, oraz domeny C-końcowej. Domeny N- i C-końcowa uczestniczą w regulacji ekspresji genów, izolacji domen chromatynowych oraz tworzeniu pętli (Hashimoto et al., 2017b; Y. Li et al., 2020b; Mach et al., 2022; Nakahashi et al., 2013; Nora et al., 2020; Yang et al., 2023b; Zuin et al., 2014). W centralnej części białka CTCF, jedenaście palców cynkowych typu C2H2, umożliwia specyficzne rozpoznawanie motywu DNA przez CTCF (rycina 2) (Hashimoto et al., 2017; Yang et al., 2023a). Każdy palec cynkowy to niewielka domena białkowa w której jon cynku jest koordynowany przez reszty aminokwasowe głównie cysteiny i histydyny. Ta struktura stabilizuje trójwymiarową konformację palca pozwalając na precyzyjne wiązanie DNA.

Centralne palce (ZF3 - ZF7) odpowiadają za rozpoznawanie rdzenia motywu DNA o długości około 12 - 15 par zasad, przy czym każdy z nich oddziałuje z trzema nukleotydami (Hashimoto et al., 2017; Yang et al., 2023a). Brzeżne palce (ZF1 - ZF2 oraz ZF8 - ZF11) pełnią funkcję wspierającą, rozpoznając sekwencje otaczające rdzeń. Współpraca wszystkich jedenastu palców umożliwia rozpoznawanie sekwencji o łącznej długości nawet do 50 par zasad (Yang et al., 2023b).

Modułowa budowa CTCF pozwala na selektywne wiązanie różnych sekwencji DNA oraz na interakcje z wieloma partnerami białkowymi, co zapewnia szeroką funkcję regulatorową w genomie (Ghirlando & Felsenfeld, 2016; Quitschke et al., 2000a). Dzięki temu CTCF może koordynować tworzenie struktur chromatynowych oraz stabilizować pętle CTCF-CTCF.



Rycina 2: Schematyczna budowa białka CTCF.

Schematyczne przedstawienie budowy białka CTCF zawierającego jedenaście konserwatywnych domen typu palca cynkowego, które umożliwiają specyficzne rozpoznawanie sekwencji DNA. Domeny N- i C- końcowe białka biorą udział w interakcjach z innymi białkami i strukturami chromatyny.

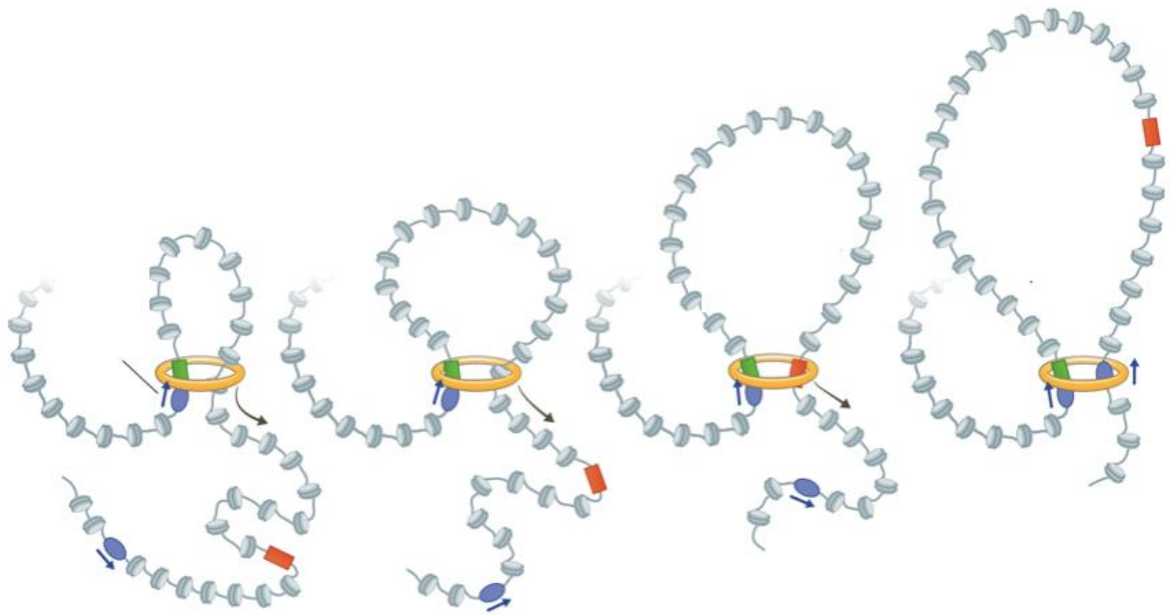
2.1. Białko CTCF jako izolator genomu, czyli czynnik umożliwiający blokowanie niepożądanych interakcji między CRE

Białko CTCF pełni kluczową rolę w utrzymaniu integralności regulacyjnej genomu, działając jako izolator który ogranicza niepożądane interakcje między odległymi od siebie CRE zapewniając precyzyjną kontrolę ekspresji (Bell & Felsenfeld, 2000a; Recillas-Targa, 2002). CTCF działa na kilku poziomach: **i)** w połączeniu z kompleksem kohezyny stabilizuje pętle chromatynowe, wyznaczając granice TAD i oddzielając sąsiadujące regiony regulatorowe (Rao et al., 2017; Nora et al., 2017), **ii)** poprzez tworzenie domen blokuje bezpośrednie kontakty między promotorami a ich wzmacniaczami w obrębie TAD, działając jako lokalny izolator (Ong & Corces, 2014a).

Lokalny kontekst epigenetyczny reguluje funkcję CTCF jako izolatora. Metylacja DNA oraz modyfikacje histonów wpływają na otwartość/dostępność chromatyny i tym samym na powinowactwo CTCF do jego miejsc wiązania (CBS, z ang. *CTCF binding sites*). Na przykład aktywna modyfikacja H3K27ac sprzyja otwartej strukturze chromatyny i zwiększa powinowactwo tych regionów. Zmiany w wiązaniu CTCF mogą w konsekwencji przesunąć granice TAD czy modulować dostępność CRE (Ong & Corces, 2014a; Rasim Barutcu et al., 2017). W eksperymentach z nagłą deplecją białka CTCF obserwuje się utratę granic TAD, co prowadzi do ektopowych kontaktów między promotorami a wzmacniaczami co w konsekwencji prowadzi do deregulacji ekspresji genów (Nora et al., 2017a). Wyniki te wskazują, że CTCF pełni centralną rolę w integracji sygnałów epigenetycznych i strukturalnych, stabilizując architekturę genomu i umożliwiając precyzyjną kontrolę ekspresji genów.

2.2. Funkcja CTCF w organizacji przestrzennej genomu.

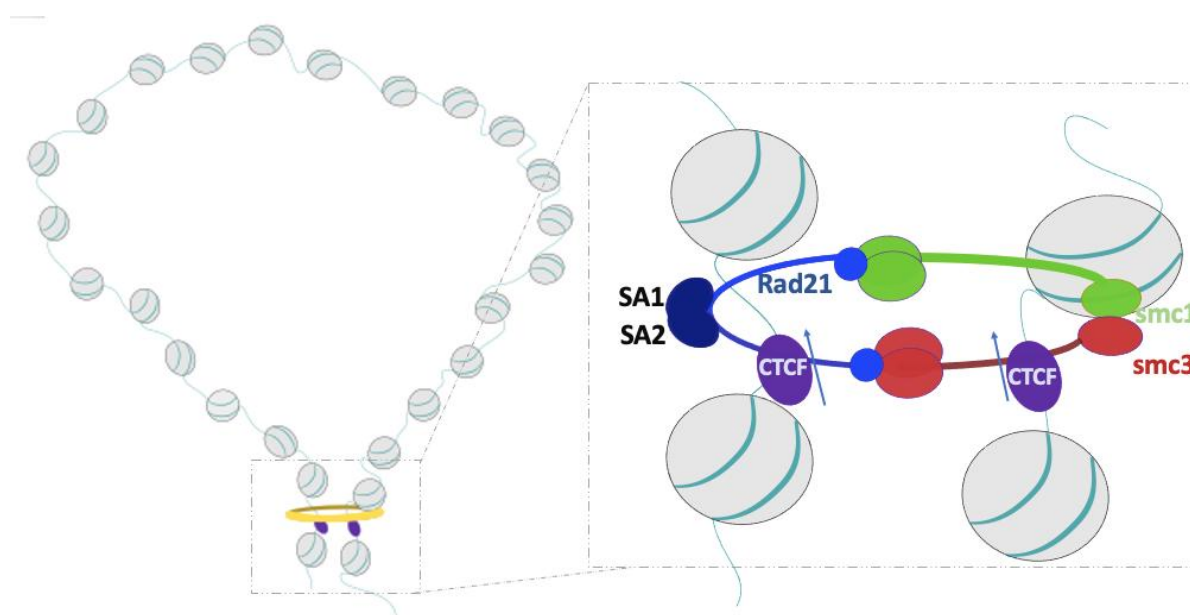
CTCF jest kluczowym elementem strukturalnej organizacji genomu. W procesie formowania pętli chromatynowych CTCF współpracuje z kompleksem kohezyny, który przesuwając się wzdłuż DNA, tworzy pętlę, aż napotka CTCF związane w określonym motywie DNA, co stabilizuje strukturę pętli i kształtuje organizację przestrzenną genomu (rycina 3) (Dekker & Mirny, 2016b).



Rycina 3: Model wytlaczania pętli zależne od kompleksu kohezyny i CTCF.

Schemat przedstawia mechanizm wytlaczania pętli chromatynowych w którym kompleks kohezyny przesuwa się wzdłuż DNA aż do napotkania cząstki białka CTCF. Ruch włókna chromatyny ustaje w wyniku interakcji pomiędzy białkiem SA1 lub 2 kompleksu kohezyn, a końcem N-białka CTCF związanego z motywem zorientowanym „na wprost” zbliżającego się pierścienia kompleksu kohezyn (CTCF zaznaczono na niebiesko, orientacja motywu CTCF jest oznaczona strzałką). W rycinie, miejsce wiązania białka CTCF znajduje się przy promotorze (zaznaczonym na zielono). Pierścień, zablokowany z jednej strony wiązaniem z białkiem CTCF (koniec 5'), wytłacza jednak pętle dalej, powoduje to przejściową interakcję między promotorem a wzmacniaczem (kolor czerwony). Proces ten jednak nie zatrzymuje się, a pętla jest Powstaje pętla CTCF-CTCF: pierścień kompleksu kohezyny zablokowany przez białko CTCF stabilizuje kontakt pomiędzy dwoma miejscami wiążącymi CTCF, gdzie oba motywy CTCF są zwrócone naprzeciw siebie. Schemat pochodzi z publikacji, której jestem współautorem (Dehingia,et al., 2022), która ukazała się drukiem w EMBO Reports, z której został zaczerpnięty fragment oryginalnej ilustracji mojego autorstwa, na potrzeby tej rozprawy doktorskiej opisy zostały przetłumaczone na język polski.

Interakcja CTCF z kompleksem kohezyny odbywa się poprzez N-końcowy region białka CTCF (Y. Li et al., 2020c; Pugacheva et al., 2020). Domena ZF umożliwia przyłączenie kompleksu kohezyny w pobliżu miejsc wiązania. Podjednostki SA2 oraz Rad21 kompleksu kohezyny uczestniczą w stabilizacji pętli (rycina 4) (Y. Li et al., 2020a). Dzięki współdziałaniu białka CTCF i kompleksu kohezyny utrzymywana jest trójwymiarowa architektura genomu, co umożliwia fizyczną koniugację odległych elementów regulatorowych takich jak: promotory i wzmacniacze stanowiącą podstawę precyzyjnej regulacji ekspresji genów.

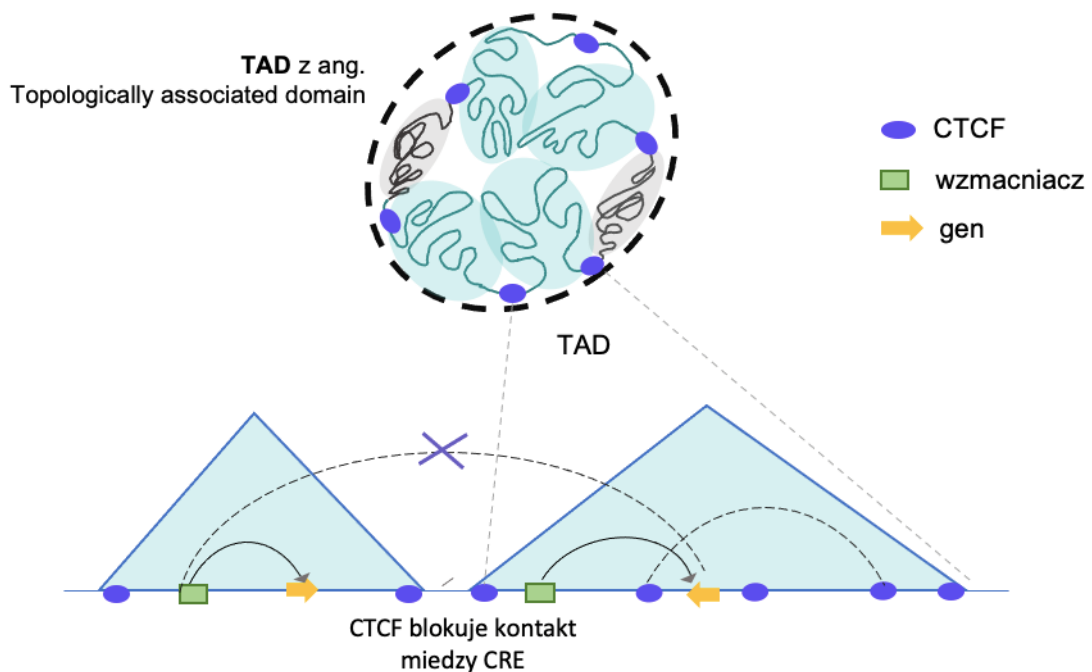


Rycina 4: Schematyczne przedstawienie procesu wytlaczania pętli CTCF-CTCF

Lewy panel przedstawia pętlę chromatynową utworzoną przez kompleks kohezyny, który umożliwia fizyczne połączenie dwóch odległych regionów DNA, wyznaczonych przez parę konwergentnie zorientowanych miejsc wiązania białka CTCF.

Prawy panel (powiększenie) przedstawia mechanizm działania tego kompleksu. Kompleks kohezyny funkcjonuje jako pierścień obejmujący dwie nici DNA, co zapewnia stabilizację i utrzymanie trójwymiarowej struktury pętli chromatynowej.

Eksperymenty ingerujące w lokalizację miejsc wiązania białko CTCF wykazały, że zaburzenia funkcji kompleksu kohezyny lub metylacja miejsc wiązania białka CTCF, które uniemożliwiają prawidłowe przyłączenie białka do DNA, prowadzą do destabilizacji TAD. Konsekwencją tego zjawiska jest powstawanie nieprawidłowych kontaktów między promotorami a wzmacniaczami co może owocować deregulacją ekspresji genów jak na przykład w przypadku aktywacji onkogenu *PDGFRA* w glejakiach (Fudenberg et al., 2016; Rao et al., 2017).



Rycina 5: Schemat organizacji domeny TAD z granicami wyznaczanymi przez czynnik CTCF oraz interakcjami funkcjonalnymi w euchromatynie.

Schemat ilustruje strukturę domen TAD, których granice wyznaczone są przez motywy wiązania białka CTCF. Wewnątrz domen widoczne są pętle chromatynowe stabilizowane przez kompleks kohezyny. W powiększeniu zaprezentowano fragment euchromatyny z zaznaczonymi interakcjami typu między promotorem a wzmacniaczem oraz obecnością elementów regulatorowych wspierających ekspresję genów. Przerywane linie wskazują interakcje między poszczególnymi CRE. Wzmacniacz, który funkcjonuje wyłącznie w obrębie tej samej domeny TAD, aktywując gen znajdujący się w tej domenie, natomiast brak połączenia ze strzałką do promotora w sąsiedniej domenie ilustruje ograniczenie działania wzmacniacza do własnej TAD.

Reorganizacja przestrzennej struktury chromatyny podczas różnicowania komórek obejmuje m.in. tworzenie lub usunięcie pętli CTCF-CTCF, oraz przesunięcia genów względem jądrowych kondensatów, takich jak: między innymi plamki jądrowe, z ang. *nuclear speckles*. Na przykład w różnicowaniu mioblastów do miotub obserwuje się przekształcenia TAD prowadzące do aktywacji genów mięśniowych, a geny wcześniej związane z otoczką jądrową przemieszczają się do bardziej euchromatynowych aktywnych regionów jądra (Peric-Hupkes et al., 2010). Różnicowanie progenitorów neuronalnych wiąże się z reorganizacją pętli CTCF-CTCF (Pękowska et al., 2018a) oraz relokacją genów związanych z funkcjami synaptycznymi w kierunku plamek jądrowych co koreluje zarówno ze zwiększoną ich ekspresją, jak poprawnym przebiegiem procesu składania RNA (splicingu) (Bonev et al., 2017a; Takei et al., 2025), jednak obecne dane nie pozwalają określić dokładnej przyczyny tego zjawiska. Takie zmiany pokazują, że trójwymiarowa architektura genomu może korelować ze zmianami w ekspresji genów, jednak obecne dane nie pozwalają na określenie dokładnej przyczyny tego zjawiska.

Podobne mechanizmy reorganizacji chromatyny obserwuje się w systemie różnicowania komórek ES do NS, który stanowi dobrze scharakteryzowany model do badania takich zmian. Pozwala on analizować dynamikę organizacji chromatyny oraz funkcjonalne konsekwencje przejścia od stanu pluripotentnego do bardziej wyspecjalizowanego. Reorganizacja chromatyny nie tylko reguluje transkrypcję w krótkim czasie, ale również stabilizuje charakterystyczne wzorce ekspresji genów i profile epigenetyczne, utrzymując tożsamość komórkową.

Mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie i stabilizację struktur topologicznych, takich jak: domeny TAD czy pętle chromatynowe w trakcie rozwoju organizmu wciąż nie są w pełni poznane i pozostają przedmiotem intensywnych badań. Zrozumienie tych procesów jest zatem niezwykle istotne dla pełnego ujęcia mechanizmów regulujących funkcjonowanie komórek (Bai et al., 2025; Ea et al., 2015; Kentepozidou et al., 2020).

2.3. Białko CTCF jako architekt genomu

Czynnik CTCF pełni kluczową rolę w organizacji przestrzennej chromatyny działając jako „architekt genomu”. Jego miejsca wiązania są w dużej mierze konserwowane pomiędzy różnymi typami komórek, w tym między macierzystymi komórkami embrionalnymi (ES), a ich zróżnicowanymi pochodnymi takimi jak komórki pnia nerwowego (NS) (Arzate-Mejía et al., 2018a; Pękowska et al., 2018b).

Jedną z najczęściej stosowanych metod identyfikacji CBS jest immunoprecypitacja chromatyny połączona z sekwencjonowaniem o wysokiej przepustowości (ChIP-seq) (Barski et al., 2007; Rao et al., 2014b; Reynolds & Berridge, 2008).

W trakcie różnicowania komórek dochodzi do tworzenia i modulowania interakcji pomiędzy promotorami a wzmacniaczami umożliwiając precyzyjną regulację ekspresji genów specyficznych dla danego typu komórki. Wzmocnienie takich kontaktów w obrębie TAD i pętli CTCF-CTCF koreluje często ze zwiększoną aktywnością genów, z kolei osłabienie czy zanik tych interakcji może prowadzić do wyciszenia ekspresji (Islam et al., 2023; H. Liu et al., 2023; Matthews & Waxman, 2018). Przestrzenna architektura genomu nie tylko stabilizuje domeny i pętle, ale także integruje sygnały regulacyjne, co umożliwia dynamiczną kontrolę ekspresji genów w trakcie rozwój (L. Chen et al., 2021; Z. Chen et al., 2024b; B. Yang et al., 2023).

Analizy w komórkach ES i NS oraz we wczesnym rozwoju myszy wykazały wzrost liczby pętli CTCF-CTCF dalekiego zasięgu i wzmocnienie granic TAD w komórkach zróżnicowanych (Bonev, et al., 2017a; Pękowska, et al., 2018b). Choć położenie CBS i granic TAD w genomie pozostaje w dużej mierze niezmiennie a utrata pluripotentności wiąże się ze stopniowym wzrostem stabilności granic TAD oraz liczby pętli zależnych od CTCF (Pękowska et al., 2018). W niektórych przypadkach zwiększenie liczby pętli koreluje z aktywacją transkrypcji genów zlokalizowanych w obrębie tych domen, choć mechanizmy tej zależności nie są jeszcze w pełni poznane (Nora et al., 2017a; Pękowska et al., 2018).

Zmiany te odzwierciedlają dynamiczną reorganizację genomu w komórkach różnicujących się sugerując znaczenie CTCF w utrwalaniu tożsamości komórkowej oraz w precyzyjnej regulacji ekspresji genów w trakcie wczesnego rozwoju.

2.4. Zaburzenie funkcji czynnika CTCF przyczynia się zmian fenotypowych

Nieprawidłowe funkcjonowanie białka CTCF lub utrata jego miejsc wiązania prowadzi do zaburzeń organizacji chromatyny i regulacji ekspresji genów, co w konsekwencji skutkuje defektami w różnicowaniu komórek oraz ich funkcjonowaniu. Liczne badania na modelach zwierzęcych potwierdzają kluczową rolę białka CTCF w rozwoju organizmu. Na wczesnych etapach rozwoju homozygotyczne myszy z inaktywowanym genem *CTCF* wykazują letalność zarodkową (Heath et al., 2008, Splinter et al., 2006a) a usunięcie białka CTCF w oocytach przed zapłodnieniem zakłóca prawidłowy rozwój embrionalny do stadium blastocysty (Fedoriw et al., 2004).

Na późniejszych etapach rozwoju zaburzenia funkcjonowania czynnika CTCF prowadzą do złożonych defektów morfogenetycznych, związanych z deregulacją genów rozwojowych. Przykładowo delecja CBS w regionach *HoxA* i *HoxC* powoduje deregulację genów *Hox* prowadząc do transformacji homeotycznych, czyli zmiany tożsamości segmentów ciała (Narendra et al., 2016b). Podobnie inwersja motywu CBS w *locus Sox9/Kcfn2* zaburza interakcje między promotorem a wzmacniaczem skutkując zmianami ekspresji genów i defektami rozwojowymi takimi jak: rozszczepienie podniebienia, czy opóźnione kostnienie (de Wit, 2019; Despang et al., 2019).

Tabela 2 Związek między defektami w funkcji czynnika CTCF, a fenotypami chorobowymi

Miejsce wiązania	Efekt	Jednostka chorobowa	Referencje
Promotor genu <i>TP53</i>	Czynnik CTCF w interakcji z lncRNA - <i>Wrap53</i> , reguluje ekspresję genu <i>TP53</i> w odpowiedzi na stres komórkowy	Prawidłowa funkcja <i>TP53</i> utrzymuje integralność genomu i zapobiega nowotworom.	(Saldaña-Meyer et al., 2014)
Kotwice TAD w obrębie locus <i>HoxA</i>	Delecja miejsc wiązania białka CTCF w granicach TAD prowadzi do deregulacji ekspresji genów <i>Hox</i>	Transformacje homeotyczne - zamiana tożsamości segmentów ciała.	(Narendra et al., 2016b)
Kotwice TAD w obrębie locus <i>Sox9</i>	Wiązanie białka CTCF na granicy TAD przy promotorze <i>Sox9</i> reguluje interakcje promotora z jego wzmacniaczami w konsekwencji wpływając na ekspresję <i>Sox9</i> .	Rozszczep podniebienia, opóźnione kostnienie kości długich	(de Wit, 2019)
Region ICR w locus <i>Igf2</i>	Czynnik CTCF blokuje ekspresję ojcowskiego allelu <i>Igf2</i> , umożliwiając aktywność tylko allelu matczynego jako izolator.	Zespół Beckwitha-Wiedemanna - przerost ciała, ryzyko nowotworów, makroglosja i wady narządów.	(Prawitt et al., 2005)
Regiony regulacyjne w locus <i>Myc</i>	CTCF tworzy pętle chromatynowe w obrębie locus <i>Myc</i> , łącząc promotor ze wzmacniaczami i regulując ekspresję genu	Zwiększa ryzyko powstawania oraz niekontrolowanego rozwoju komórek nowotworowych	(Splinter et al., 2006b)
Granice TAD w obrębie locus <i>β-globiny</i>	Czynnik CTCF izoluje regiony aktywne od nieaktywnych, umożliwiając prawidłową regulację genów globinowych w odpowiedzi na sygnały transkrypcyjne.	Talasemia - niedokrwistość spowodowana zaburzoną produkcją hemoglobiny.	(Dixon et al., 2012c)

Jak pokazuje m.in. inwersja motywu CBS w *locus Sox9/Kcfn2* zarówno mutacje w genie CTCF, zaburzenia jego funkcji, jak i same zmiany poziomu białka mogą istotnie wpływać na regulację ekspresji genów i w konsekwencji rozwój organizmu (Despang et al., 2019b).

Zarówno nadmierna ekspresja jak i obniżenie poziomu białka CTCF z zastosowaniem interferencyjnego RNA (RNAi) prowadzą do zmian w wielu kluczowych procesach biologicznych takich jak: wzrost, różnicowanie czy apoptoza komórkowa. Efekty te zostały wykazane m.in. w liniach komórkowych pochodzenia nowotworowego takich jak: HeLa, K562 oraz w mysich komórkach ES, co wskazuje, że czynnik CTCF pełni fundamentalną rolę w utrzymaniu homeostazy transkrypcyjnej niezależnie od typu komórki (Arzate-Mejía et al., 2018; Hernández-Hernández et al., 2012; Hou et al., 2010).

Białko CTCF odgrywa istotną rolę nie tylko w komórkach somatycznych ale jako jeden z główny regulatorów architektury chromatyny. Mutacje w genie *CTCF* w tym warianty powodujące przedwczesne zakończenie translacji lub substytucje aminokwasów (np. 1699C > T; p. Arg567Trp) są powiązane z opóźnieniem rozwoju i niepełnosprawnością intelektualną (Gregor et al., 2013). Oprócz mutacji w sekwencji samego genu, istotne znaczenie mają również zaburzenia dotyczące jego funkcjonalnych regionów wiązania. Warianty genetyczne w miejscach wiązania białka CTCF mogą prowadzić do dezorganizacji struktury chromatyny oraz zakłócenia ekspresji genów. Przykładem jest polimorfizm rs1990620 w locus *TMEM106B* związany ze zwyrodnieniem płata czołowo-skroniowego, który jest jedną z najczęstszych przyczyn demencji u osób poniżej 65 roku życia (Gallagher et al., 2017). Mutacje zaburzające strukturę TAD prowadzą do zmian w architekturze chromatyny, co skutkuje nieprawidłową ekspresją genów istotnych dla rozwoju układu nerwowego. Zmiany te zaobserwowano m.in. w neuronach pochodzących z ludzkich indukowanych komórek pluripotentnych (hiPSC) oraz w post-mortem analizach kory przedczołowej osób ze schizofrenią (Girdhar et al., 2022; Rahman et al., 2023). Co więcej, nieprawidłowa aktywność białka CTCF jest powiązana z chorobami neurodegeneracyjnymi takimi jak: choroba Alzheimera, Parkinsona czy stwardnienie zanikowe boczne, gdzie jego dysfunkcja może upośledzać odpowiedź komórkową na stres oksydacyjny oraz zaburzać prawidłową organizację chromatyny, co sprzyja procesom neurodegeneracyjnym (Islam et al., 2023). Ponadto zmiany w aktywności czynnika CTCF wiążą się również z zaburzeniami w spektrum

autyzmu prawdopodobnie na skutek deregulacji genów odpowiedzialnych za tworzenie synaps oraz rozwój neuronalny (Konrad et al., 2019).

2.4.1. RNA jako regulator architektury jądra i aktywności transkrypcyjnej

Coraz liczniejsze dane eksperymentalne wskazują, że RNA odgrywa istotną rolę w regulacji architektury jądrowej wykraczając daleko poza klasyczną funkcję informacyjną przypisywaną mRNA. W tradycyjnym ujęciu zgodnym z koncepcją Francis Cricka, RNA postrzegano przede wszystkim jako nośnik informacji genetycznej pośredniczący między DNA a białkami (Crick, 1958; Crick, 1970). Obecnie wiadomo, że komórki produkują także liczne rodzaje RNA które nie kodują białek, w tym długie niekodujące RNA (ang. *long non-coding RNA*, lncRNA), pełniące istotne funkcje w regulacji i organizacji genomu (Guttman & Rinn, 2012; Quinn & Chang, 2015; Statello et al., 2020).

RNA wpływa na przestrzenną strukturę chromatyny na kilku poziomach: po pierwsze lokalne transkrypty RNA powstające w pobliżu sekwencji regulatorowych mogą modulować dostępność chromatyny oraz rekrutację białek regulatorowych. Po drugie lncRNA uczestniczą w tworzeniu i stabilizacji kondensatów biomolekularnych takich jak: plamki jądrowe, paraplamki jądrowe z ang. *paraspeckles* czy nukleole np. *Neat1* (Hirose et al., 2019; Yamazaki et al., 2018). W takich strukturach RNA działa jako czynnik organizujący, umożliwiając lokalne zagęszczenie białek regulatorowych i elementów maszynery transkrypcyjnej, co wpływa na poziom aktywności genów w ich pobliżu (Takei et al., 2025). Równolegle RNA moduluje globalną architekturę chromatyny poprzez wpływ na pętle oraz domeny TAD. Przykładowo lncRNA *Xist* odgrywa kluczową rolę w reorganizacji struktury nieaktywnego chromosomu X: moduluje tworzenie pętli i granic TAD oraz rekrutuje kompleksy epigenetyczne odpowiedzialne za inaktywację genów (Cerase et al., 2015; Engreitz et al., 2013). *Firre* wspiera interakcje międzychromosomalne, współdziała z CTCF i utrzymuje pętle chromatynowe koordynując transkrypcję genów położonych w odległych regionach genomu (Hacisuleyman et al., 2014a). Z kolei *PVT1* reguluje lokalną aktywność CTCF w obrębie *locus MYC*, modulując pętle promotor-wzmacniacz i precyzyjnie dostrajając ekspresję tego onkogenu (Adriaens et al., 2018; Tseng et al., 2014).

W ten sposób RNA zarówno poprzez obecność w kondensatach jądrowych jak i interakcje z maszyną organizującą chromatynę działa jako dynamiczny regulator architektury genomu, integrując lokalne i globalne mechanizmy przestrzennego uporządkowania z kontrolą ekspresji genów.

2.4.2. Interakcje pomiędzy RNA a białkiem CTCF i ich znaczenie funkcjonalne

Interakcje pomiędzy RNA a białkiem CTCF stanowią istotny element regulacji pętli chromatynowych. Badania wykorzystujące techniki takie jak: PAR-CLIP czy fRIP wykazały, że CTCF może być powiązany z różnymi transkryptami RNA zarówno kodującymi jak i niekodującymi w tym z intronami, eksonami oraz regionami 3'UTR (Saldaña-Meyer et al., 2014b). Ponadto, wykazano, że lokalna synteza RNA w pobliżu miejsc wiązania CTCF może modulować jego interakcje z DNA oraz klastrowanie czynnika w nukleoplaźmie co wpływa na stabilność pętli CTCF-CTCF oraz ekspresję genów.

Różne lncRNA mogą działać w sposób lokalny lub obejmujący większe regiony genomu. Na przykład lncRNA *Jpx* osłabia wiązania CTCF do DNA, konkurując z DNA o wiązanie do CTCF, co ma znaczenie w rejonach o niskim powinowactwie CTCF do DNA (Oh et al., 2021). Z kolei *Firre* wspomaga utrzymanie interakcji między regionami genomu kluczowych dla organizacji jąderka i inaktywacji chromosomu X (Hacisuleyman et al., 2014b). *Xist* współdziała z CTCF podczas wyciszania chromosomu X, wpływając na lokalną strukturę chromatyny czy dostępność promotorów (Minajigi et al., 2015).

Nowsze badania sugerują jednak, że CTCF prawdopodobnie nie wiąże RNA bezpośrednio (J. K. Guo et al., 2024). Nie wyklucza to jednak znaczenia interakcji pośrednich między RNA a CTCF w stabilizacji pętli i organizacji przestrzennej genomu.

3. Metody analizy funkcji białka CTCF i organizacji genomu

Analiza funkcji białka CTCF oraz organizacji przestrzennej genomu wymaga zastosowania szerokiego spektrum metod badawczych, które pozwalają zarówno na identyfikację miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych, jak i na ocenę interakcji między odległymi regionami DNA. Techniki takie jak ChIP-seq umożliwiają identyfikację miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych, a metody oparte na konformacji chromatyny np. Hi-C pozwalają analizować częstość kontaktów między regionami DNA (Lan et al., 2012; Wang

et al., 2012). Obie strategie opierają się na uśrednionych danych z populacji komórek. W konsekwencji nadal pozostaje ograniczona możliwość uchwycenia pełnej dynamiki interakcji oraz heterogeniczności między pojedynczymi komórkami, co stanowi istotną barierę w dogłębnym zrozumieniu mechanizmów regulacji ekspresji genów. W tym kontekście obrazowanie przyżyciowe stanowi obiecujące rozwiązanie umożliwiające bezpośrednią, czasowo-przestrzenną obserwację kinetyki poszczególnych *loci* w ich naturalnym fizjologicznym środowisku. Dzięki zastosowaniu mikroskopii w czasie rzeczywistym możliwe jest uchwycenie przejściowych interakcji czy dynamicznych zmian organizacji przestrzennej genomu.

Jedną z najczęściej aktualnie stosowanych metod wizualizacji struktur chromatyny są podejścia oparte na technologii CRISPR/dCas9, w którym enzym Cas9 pozbawiony aktywności nukleazowej (dCas9) skorelowany z białkiem fluorescencyjnym, np. GFP kierowany jest do specyficznych sekwencji DNA za pomocą single guide RNA (sgRNA) (Anton et al., 2014; T. Ma et al., 2018). Znaczną przewagą tych metod jest możliwość lokalizowania elementów regulatorowych w czasie rzeczywistym bez konieczności modyfikacji sekwencji genomu (T. W. Chen et al., 2013a). Dalszym usprawnieniem tej technologii jest system SunTag, w którym dCas9 jest połączony z powtarzalnym motywem rozpoznawanym przez przeciwciało, do którego wiąże się wiele kopii fluorochromu, zwiększając znacznie sygnał fluorescencji poprawiając rozdzielczość przestrzenną (Tanenbaum et al., 2014). Innym podejściem wykorzystywanym do wizualizacji jest system ANCHOR (m.in. ANCH3), polegający na specyficznym rozpoznawaniu bakteryjnych sekwencji wiążących ParS przez białko ParB. Kompleks ParB gdzie fluorochrom tworzy trwałe skupiska w miejscu docelowym co umożliwia śledzenie *loci* DNA w czasie rzeczywistym z wysoką precyzją (Germier et al., 2017). Ta metoda podobnie jak wizualizacja oparta na technologii CRISPR jest stosunkowo nietoksyczna oraz kompatybilna z długotrwałą obserwacją żywych komórek.

Dla śledzenia nie tylko położenia, ale i funkcjonalnej aktywności sekwencji regulatorowych stosuje się metody oparte na rezonansie FRET (z ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) (Ma et al., 2018). FRET może być używany do badania zmian konformacyjnych lub bezpośrednich interakcji między białkami regulatorowymi i DNA, ujawniając aktywność wzmacniaczy lub zmiany w strukturze chromatyny podczas

aktywacji genów. W celu uporządkowania i ułatwienia interpretacji danych przedstawionych w literaturze dotyczącej technik umożliwiających obserwację dynamiki genomu, zestawiono je w tabeli nr 2. Zestawienie to pozwala w sposób zwięzły syntetyczny porównać dostępne metody wizualizacji oraz podkreśla potrzebę dalszego rozwoju technologii umożliwiających śledzenie zachowania wybranych fragmentów genomu w czasie rzeczywistym

Tabela 2: Technologie umożliwiające wizualizację w czasie rzeczywistym zachowania się wybranych fragmentów genomu.

metoda	Ograniczenia metody	Potrzeba ulepszenia
Metody oparte na technologii CRISPR-Cas9 • SunTag • CRSIPRRainbow • CRISPR-Sirius	Duże tło fluorescencyjne i słaby sygnał pojedynczego kompleksu dCas9 - mogą utrudniać odróżnienie od autofluorescencji (Thuma et al., 2023). Niespecyficzne wiązania sgRNA - mogą powodować fałszywe sygnały lokalizacji (B. Chen et al., 2013a; L. Z. Yang et al., 2024).	• Udoskonalenie konstrukcji sgRNA i zwiększenie specyficzności. • Wprowadzenie czasowo kontrolowanych systemów (np. światłoczułych).
system ANCHOR	Wymaga modyfikacji genomu - wymaga edycji genomu (wprowadzenie miejsc rozpoznawanych przez parS) co może zaburzać lokalną regulację (He et al., 2024; Meschichi et al., 2021). Agregacja białek ParB - tworzenie sztucznych skupisk sygnału fluorescencyjnego (Martin-Gonzalez et al., 2024). Niska uniwersalność - wymaga dostosowania do konkretnego locus (Lakadamyali, 2024).	• Minimalizacja efektów ubocznych związanych z integracją parS • Udoskonalenie kontrolowanej ekspresji ParB-fluorochrom
FRET	Ograniczona analiza - Działa tylko na bardzo małych odległościach (1-10 nm), brak wizualizacji dużych struktur takich jak TAD, pętle CTCF-CTCF (Llères et al., 2009). Fotoblekniecie i wysoka toksyczność - prowadzi do fotoblekniecia fluoroforów oraz uszkodzenia komórek podczas dłuższych eksperymentach (Fang et al., 2023; Verveer et al., 2006). Wymaga znakowania donor-akceptor - może zaburzać dynamikę interakcji białek (Llères et al., 2009).	• Potrzebne nowe pary donor-akceptor o lepszej wydajności, fotostabilności i odporności na zakłócenia. • Dokładniejsze oprogramowanie FRET umożliwi analizę sygnału z bardziej optymalnym uwzględnieniem tła i orientacji fluoroforów.
Superrozdzielcza mikroskopia (STORM, PALM)	Trudności w zastosowaniu do żywych komórek - z powodu potrzeby długiego naświetlania preparatu (Barsanti et al., 2023). Szybka fotodegradacja fluoroforów - znacznie ogranicza długość obserwacji (Kamiyama & Huang, 2012). Wysokie wymagania sprzętowe - kosztowne i trudne w obsłudze.	• Rozwój bardziej trwałych i jasnych fluoroforów. • Miniaturyzacja systemów optycznych do zastosowania in vivo

Zintegrowane podejście łączące metody takie jak: CRISPR/dCas9, system ParB/ParS, obrazowanie superrozdzielcze takie jak: STORM, PALM, oraz analizy molekularne otwiera nowe perspektywy w badaniach nad przestrzenno-czasową organizacją chromatyny i regulacją transkrypcji w kontekście specyfiki komórkowej i różnicowania (Kim et al., 2023; Mehra et al., 2022; van Staalduinen et al., 2023; Xu et al., 2018). Mimo znacznego rozwoju technik wizualizacji, przyżyciowe obrazowanie chromatyny ciągle wiąże się z szeregiem istotnych wyzwań technicznych oraz biologicznych. Jednym z wciąż głównych trudności jest dynamiczna reorganizacja chromatyny w jądrze komórkowym, co znacząco utrudnia długoterminowe śledzenie konkretnych sekwencji DNA lub stabilnych struktur przestrzennych. Dodatkowo, długotrwałe stosowanie fluoroforów czy znaczników białkowych niezbędnych do wizualizacji może wywoływać fotouszkodzenia lub zakłócenia w funkcjonowaniu oznakowanych białek. Intensywne obrazowanie zwłaszcza w czasie rzeczywistym może prowadzić do stresu komórkowego wpływając na fizjologię jądra i zaburzając naturalne procesy wewnątrzkomórkowe (Douthwright & Sluder, 2017; Icha et al., 2017). Z tego względu konieczne jest nieustanne doskonalenie metod obrazowania, tak aby były one jak najmniej inwazyjne a jednocześnie pozwalały na uchwycenie dynamicznych aspektów organizacji chromatyny w żywych komórkach.

CEL PRACY

Geny są regulowane przez dedykowane sekwencje DNA, czyli elementy cis-regulatorowe takie jak: promotory, wzmacniacze, sekwencje wyciszające oraz izolatory. Dialog pomiędzy promotorem a wzmacniaczem odgrywa podstawową rolę w określeniu czasowo-przestrzennych wzorców ekspresji genów podczas różnicowania komórek. Izolatory związane z CTCF regulują swoistość interakcji między promotorem a wzmacniaczem a tworzenie pętli między miejscami wiążącymi CTCF koreluje z ich funkcją izolacyjną. Poprzednie dane wykazały, że siła pętli CTCF-CTCF wzrasta, gdy komórki ES tracą pluripotencję i różnicują się do komórek NS (Bonev et al., 2017b; Pękowska et al., 2018a). Mimo licznych badań nad rolą CTCF w organizacji genomu wciąż pozostaje wiele otwartych zagadnień, które wymagają wyjaśnienia w kontekście jego funkcji podczas różnicowania komórek pluripotencjalnych w komórki nerwowe.

1. Po pierwsze, nadal nie wiadomo jaki jest wpływ białka CTCF na ekspresję genów podczas różnicowania. Nie jest także jasne jak kształtuje się profil ekspresji genów zależnych od CTCF we wczesnych fazach rozwoju układu nerwowego i czy zmiany w jego poziomie białka mogą odzwierciedlać modulację funkcji izolacyjnej
2. Ponieważ zmiany w ekspresji CTCF mogą wpływać na jego funkcję izolacyjną kolejnym istotnym zagadnieniem jest ustalenie, jakie czynniki regulacyjne modulują aktywność CTCF w trakcie różnicowania. Szczególną uwagę chciałabym zwrócić na lncRNA, które w ostatnich latach zostały opisane jako ważne modulatory organizacji chromatyny i jako cząsteczki mogące oddziaływać z białkiem CTCF zarówno bezpośrednio jak i pośrednio. W związku z tym pojawia się pytanie, czy lncRNA uczestniczą w regulacji funkcji CTCF w rozwijającym się układzie nerwowym i czy mogą łączyć zmiany w architekturze pętli z modulacją ekspresji genów.
3. Równie istotnym nierozwiązanym zagadnieniem, jest zrozumienie jak dynamicznie zmieniają się interakcje pomiędzy kotwicami pętli CTCF-CTCF w czasie rzeczywistym oraz jak te zmiany wpływają na funkcję izolacyjną i ekspresję genów w żywych komórkach podczas przejścia ze stanu pluripotencji.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie roli białka CTCF w regulacji ekspresji genów podczas różnicowania pluripotencjalnych komórek macierzystych (komórek ES) do komórek pnia nerwowego (komórek NS) oraz oszacowanie wkładu czynnika transkrypcyjnego CTCF w dynamikę organizacji trójwymiarowej struktury chromatyny w komórkach ES i NS.

W celu realizacji tego nadrzędnego założenia praca została oparta się na realizacji następujących celów szczegółowych:

1. Określenie roli CTCF w regulacji ekspresji genów podczas wczesnego rozwoju układu nerwowego a w szczególności:
 - A) Identyfikacja genów regulowanych przez CTCF w komórkach ES i NS
 - B) Zbadanie profilu ekspresji genów zależnych od białka CTCF we wczesnych etapach rozwoju układu nerwowego (komórki ES i NS).
2. Identyfikacja lncRNA kluczowych dla regulacji aktywności CTCF we wczesnym rozwoju nerwowym ssaków.
3. Konstrukcja narzędzia wizualizacji umożliwiającej badanie dynamiki interakcji pomiędzy kotwicami pętli CTCF-CTCF w czasie rzeczywistym.

MATERIAŁY

1. Materiały laboratoryjne jednorazowego użytku

W trakcie przeprowadzanych eksperymentów wykorzystano różnorodne materiały jednorazowego użytku oraz plastikowe naczynia laboratoryjne. W tabeli nr. 3 zestawiono wyłącznie te elementy, których typ, producent oraz numer katalogowy mogą mieć znaczenie dla prawidłowej interpretacji wyników oraz zapewnienia odtwarzalności przeprowadzonych badań.

Tabela 3: materiały jednorazowego użytku wykorzystane podczas doświadczeń.

Nazwa	Producent, Nr. katalogowy
Płytki 6-dołkowa	Falcon, 353046
Płytki 12-dołkowa	Falcon, 353043
Płytki 24-dołkowa	Falcon, 353047
Płytki 96-dołkowa	Vwr, 734-2327
4 sektorowe naczynie do wizualizacji	IBL, 220.120.022
Szalki Petriego	Sartstedt, 82.1473.001
Probówka typu CRYOpure 2,0ml	Sarstedt, 72 379
Płytki 96 do PCR	Thermo Fisher, 4346907
Folia uszczelniająca do PCR	Thermo Fisher, AB0558

2. Sprzęt laboratoryjny

W trakcie przeprowadzanych eksperymentów wykorzystano szereg urządzeń i elementów wyposażenia laboratoryjnego, jednak w tabeli nr. 4 zestawiono wyłącznie wybrane sprzęty, których producent oraz model mogą mieć istotny wpływ na interpretację wyników oraz odtwarzalność badań.

Tabela 4: Sprzęt laboratoryjny wykorzystywany w eksperymentach.

Nazwa urządzenia	Producent, model
Termocykler	Biorad, T100 Thermal Cycler
Nanodrop	Thermo scientific, NanoDrop one
Automatyczny system analizy jakości DNA/RNA	Agilent, TapeStation 4200
Wysokoprzepustowy_sekwenator nowej generacji	Illumina, NovaSeq6000
Transiluminator	SynGene Bio Imaging, InGenius

3. Linie komórkowe jako modele badawcze

3.1. Linie ES i NS

Do eksperymentów przeprowadzonych w ramach tego projektu wykorzystano mysie Linie komórkowe: ES oraz NS. Linie ES stanowią doskonały model do analizy epigenetycznych mechanizmów regulacyjnych takich jak dostępność chromatyny ze względu na wysoką zdolność do różnicowania i dynamiczne zmiany w strukturze chromatyny. Z kolei Linie NS odzwierciedlają stan komórek w trakcie różnicowania neuronalnego i umożliwiają badanie reorganizacji chromatyny w kontekście specyficznym dla linii neuronalnych.

W celu lepszego zrozumienia roli białka CTCF podczas procesu różnicowania w badaniach zastosowano zarówno Linie komórkowe z systemem degronowym jak i reporterowym.

Linie degronowe umożliwiają kontrolowaną degradację białka CTCF w odpowiedzi na dodanie określonego ligandu co pozwala na ocenę wpływu czasowej utraty tego białka na architekturę chromatyny i ekspresję genów na różnych etapach różnicowania.

3.1.1. Linia degronowa CTCF^{EGFP-AID}

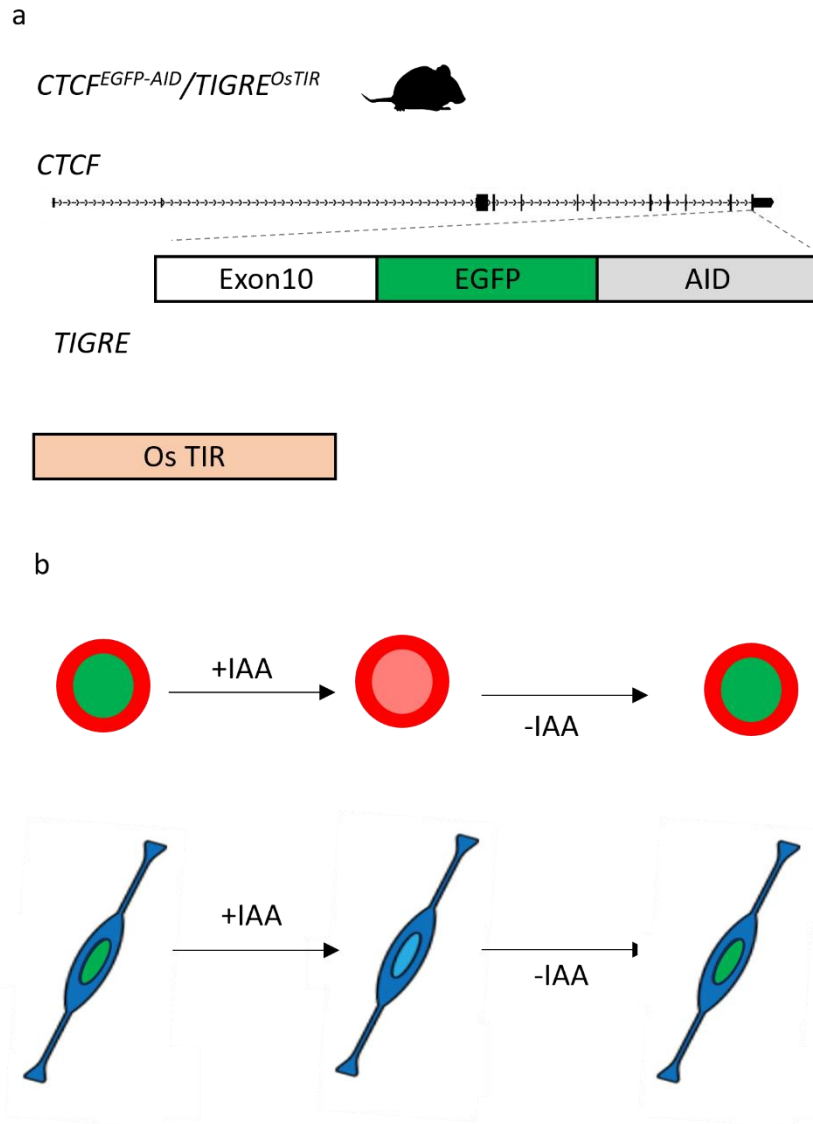
W celu uzyskania czasowej kontroli nad poziomem białka CTCF w komórkach ES i NS zastosowano linię degronową ES CTCF^{EGFP-AID} otrzymaną dzięki uprzejmości Elphège’a Nory oraz Benoita Bruneau (Instytut Gladstone, USA) (Nora E., 2017).

Linia ta została wygenerowana poprzez modyfikację genetyczną mysich komórek embrionalnych, w której gen *CTCF* został połączony z degronem AID (z ang. *Auxin-Inducible Degron*) oraz znacznikiem EGFP na końcu C genu *CTCF* (rycina 6a).

Połączenie białka CTCF z degronem AID umożliwia jego szybką i odwracalną degradację zależną od auksyny, czyli naturalnej roślinnej cząsteczki sygnałowej (np. kwasu indolilo-3-octowego, IAA) (rycina 6b).

W celu zapewnienia funkcjonalności systemu AID do genomu komórek wprowadzono również transgen *OsTIR1*. Jest to komponent pochodzenia roślinnego który w obecności auksyny rozpoznaje sekwencję AID i kieruje oznaczone białko do degradacji w proteasomie. Aby zagwarantować stabilną, jednorodną i bezpieczną ekspresję genu *OsTIR1* w komórkach, konstrukcję transgenu wprowadzono do *locus* stabilnej integracji *Tigre*.

System ten pozwala również na śledzenie obecności białka dzięki metce EGFP co ułatwia ocenę poziomu CTCF m.in. przy użyciu cytometrii przepływowej lub mikroskopii.



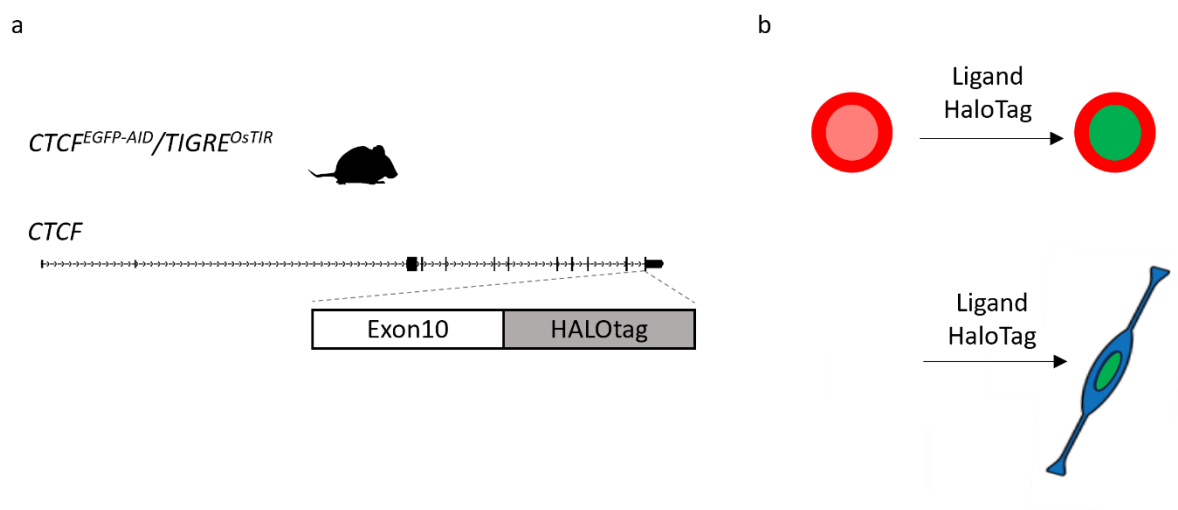
Rycina 6: Schemat linii $CTCF^{EGFP-AID}$ i mechanizmu degradacji zależnej od auksyny.

a) Schemat przedstawia konstrukcję mysiej linii komórkowej ES w której białko CTCF zostało połączone z degenem AID oraz fluorescencyjnym znacznikiem EGFP. W celu umożliwienia auksyno-zależnej degradacji białka CTCF do komórek wprowadzono również kompleks OsTIR1, który rozpoznaje sekwencję AID i kieruje białko do proteasomalnej degradacji w obecności auksyny.

b) Po dodaniu auksyny wprowadzony do komórek kompleks SCF-TIR1 rozpoznaje domenę AID związaną z białkiem CTCF i kieruje kompleks do degradacji w proteasomie. Pokazane są komórki ES (górny panel) oraz wyprowadzone z nich komórki NS (panel dolny).

3.1.2. Linia reporterowa CTCF^{HALO}

Wykorzystana w tej pracy linia komórkowa z białkiem CTCF połączonym ze znacznikiem kowalencyjnym HaloTag (rycina 7a) została pozyskana dzięki uprzejmości Prof. Rafaela Casellasa (NIH, USA). Domena HALO umożliwia wizualizację lokalizacji CTCF z użyciem ligandów fluorescencyjnych (rycina 7b). W niniejszej pracy zastosowano dwa barwniki: zielony HaloTag Alexa Fluor 488 oraz czerwony: HaloTag TMR. System ten znajduje zastosowanie zarówno w obrazowaniu przestrzennym jak i w analizach ilościowych w żywych komórkach.



Rycina 7: Schemat konstrukcji i wizualizacja linii ES z CTCF-HaloTag

a) Schemat budowy mysiej linii ES w której endogenne białko CTCF zostało genetycznie połączony z HaloTag na końcu C-terminalnym.

b) Reprezentatywny obraz fluorescencji po dodaniu ligandu HaloTag wizualizujący rozmieszczenie białka CTCF w jądrze komórkowym. Zmiana koloru wskazuje na skuteczne znakowanie i obecność białka CTCF. Fluorescencja obserwowana jest tylko po przyłączeniu ligandu, co potwierdza specyficzność i niskie tło systemu. Obserwacje białka CTCF można prowadzić w komórkach ES (panel górny) jak i NS (panel dolny).

3.1.3. Linia reporterowa: 46C^{Sox1-GFP-puro}

Do delecji miejsca wiązania białka CTCF w *locus Aldh1a3* wykorzystano linię mysich embrionalnych komórek macierzystych Sox1-GFP-puro (46C^{Sox1-GFP-puro}), udostępnioną przez Prof. Austina Smitha (Uniwersytet Cambridge) (Ying et al., 2003). Do *locus* genu Sox1 wprowadzono konstrukt zawierający gen zielonego białka fluorescencyjnego (GFP) oraz gen oporności na puromycynę rozdzielone sekwencją IRES (z ang. *Internal Ribosome Entry Site*). Taka konfiguracja umożliwia równoległą ekspresję GFP i oporności na puromycynę wraz z ekspresją Sox1 co pozwala na jednocześnie monitorowanie oraz selekcję komórek wyrażających ten wczesny marker neuroektodermy.

3.2. Linie nowotworowe

Do produkcji wektorów wirusowych wykorzystanych w trzeciej części pracy zastosowano ludzką linię komórkową 293T pochodzącą z embrionalnych komórek nerki (HEK293), zmodyfikowaną o ekspresję dużego antygeny T wirusa SV40. Komórki 293T cechują się wysoką wydajnością transfekcji oraz intensywną ekspresją białek co czyni je standardowym narzędziem do produkcji wirusów zwłaszcza lentiwirusów.

W ramach eksperymentów linia 293T posłużyła do generowania wirusów wykorzystywanych do transfekcji komórek ES i NS w celu wprowadzenia określonych konstrukcji genetycznych m.in. reporterów, elementów systemów degronowych oraz narzędzi regulujących ekspresję genów. Wysoka efektywność produkcji wirusów w 293T była kluczowa dla skutecznego i powtarzalnego dostarczania materiału genetycznego do komórek docelowych.

4. Odczynniki stosowane do hodowli komórkowej

4.1. Hodowla linii ES w warunkach standardowych (FBS/LIF)

Tabela 5: Skład medium do hodowli komórek ES.

Odczynnik	Producent, Nr. katalogowy
Glasgow Minimum Essential Medium	Invitrogen, 11710035
FBS EmbryoMax ES cell Qualified	Sigma-Merck, ES-009-b
LIF (Leukemia Inhibitory Factor)	EMBL Protein Expression Facility
β -merkaptetanol	Sigma-Merck, 615226
NEAA (aminokwasy nieesencjalne)	Thermo Fisher, 11140035
L-glutamina	Thermo Fisher, A2916801
Pirogronian sodu	Thermo Fisher, 11360070

4.2. Hodowla komórek ES w warunkach (2i/LIF)

Tabela6: Odczynniki wykorzystywane do hodowli komórek mysich ES w warunkach 2i.

Odczynnik	Producent, Nr. katalogowy
DMEM/F12	Thermo Fisher, 31331028
N2 suplement	Thermo Fisher, 17502048
B27 suplement	Thermo Fisher, 17504044
BSA (Albumina surowicy bydlęcej)	Thermo Fisher, 15460037
NEAA (aminokwasy nieesencjalne)	Thermo Fisher, 11140035
D-(+)-glukoza	Sigma-Merck, G8270-1KG
HEPES	Thermo Fisher, 15630056
β -merkaptetanol	Sigma-Merck, 615226
CHIR99021 (inhibitor GSK3)	Reagent Direct, 27-H76
PD0325901 (inhibitor MEK)	Reagent Direct, 39-C68
LIF (czynnik hamujący białaczkę)	EMBL, ośrodek badań ekspresji i oczyszczania białek

4.3. Hodowla komórek NS

Tabela 7: Skład medium stosowanego w indukcji neuronalnej komórek.

Odczynnik	Producent, Nr katalogowy
DMEM/F12	Thermo Fisher, 31331028
N2 (50x)	Thermo Fisher, 17502048
B27 (50x)	Thermo Fisher, 17504044
BSA (Albumina surowicy bydlęcej)	Thermo Fisher, 15460037
NEAA (Niezbędne aminokwasy)	Thermo Fisher, 11140035
D-(+)-glukoza	Sigma-Aldrich, G8270-1KG
HEPES	Thermo Fisher, 15630056
β-merkapttoetanol	Sigma-Aldrich, 615226

Po indukcji komórek, w celu utrzymania ich w stadium neuronalnym do hodowli dodano odpowiednie suplementy, wyszczególnione w tabeli nr. 8.

Tabela 8: Suplementacja pożywki hodowlanej stosowanej w hodowli komórek NS

Odczynnik	Producent
EGF (Epidermal Growth Factor)	EMBL, ośrodek badań ekspresji i oczyszczania białek
bFGF (Fibroblast Growth Factor)	EMBL, ośrodek badań ekspresji i oczyszczania białek

4.4. Hodowla komórek HEK293

W tabeli nr. 9 przedstawiono podstawowy skład medium, używanego do hodowli komórek HEK293.

Tabela 9: Skład medium do hodowli HEK293.

Odczynnik	Producent, Nr. katalogowy
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco 11965084
Surowica płodowa cielęca (FBS)	Thermo Fisher, 10500064
Penicylina - streptomycyna	Thermo Fisher, 15140122

4.5. Inne odczynniki stosowane przy hodowli komórkowej

Dodatkowo, w procedurach związanych z hodowlą komórkową wykorzystywano również inne odczynniki takie jak akutaza (Sigma-Merck, A6964) enzymatyczny środek do odłączania komórek adherentnych, oraz DMSO (dimetylosulfotlenek) wykorzystywany między innymi jako rozpuszczalnik do substancji biologicznie czynnych lub krioprotektant w procedurach mrożenia komórek.

4.6. Antybiotyki selekcyjne

W eksperymentach wymagających selekcji komórek zawierających konstrukt z genem oporności stosowano odpowiednie antybiotyki selekcyjne których zestawienie przedstawiono w tabeli nr. 10. Dobór konkretnego antybiotyku zależał od zastosowanego markera selekcyjnego (np.: oporności na puromycynę, blastycydynę, neomycynę lub hygromycynę). Dla każdej linii komórkowej optymalne stężenie antybiotyku zostało wcześniej określone doświadczalnie na podstawie wyznaczenia tzw. krzywej wrażliwości na antybiotyk (ang. *kill curve*).

Tabela 10: Antybiotyki selekcyjne stosowane w hodowlach komórkowych.

Nazwa	Producent, Nr. katalogowy
Puromycyna	ThermoFisher, A1113803
Blastycydyna S	InvivoGen: ant-bl-05

4.7. Znacznik HaloTag wykorzystane do detekcji metki Halo

W tabeli nr. 11 przedstawiono wybrane fluorofory używane do znakowania białek z metką HaloTag różniące się kolorem emisji i właściwościami fluorescencyjnymi.

Tabela 11: Znaczniki fluorescencyjne stosowane do znakowania metki HaloTag.

Nazwa znacznika	Kolor fluorescencji
HaloTag-TMR	Pomarańczowo-czerwony
HaloTag Alexa Fluor 488	Zielony

5. Odczynniki stosowane w eksperymentach biologii molekularnej

5.1. Enzymy restrykcyjne

Tabela nr. 12 przedstawia zestawienie enzymów restrykcyjnych zastosowanych w procedurach trawienia DNA podczas klonowania konstrukcji genetycznych. Wybrane enzymy umożliwiały precyzyjne cięcie wektorów i insertów w miejscach specyficznych dla odpowiednich sekwencji rozpoznawanych przez dany enzym.

Tabela 12: Zestawienie użytych enzymów restrykcyjnych.

Enzym	Producent, Nr. katalogowy
PvuII	New England Biolabs (Lab-Jot), R3151
XbaI	New England Biolabs (Lab-Jot), R0145S
BamHI	New England Biolabs (Lab-Jot), R0580S
BbsI	New England Biolabs (Lab-Jot), R3539S
BsmBI	New England Biolabs (Lab-Jot), R0739S

5.2. Odczynniki do klonowania molekularnego

Do składania fragmentów DNA metodą opartą na homologii zastosowano Ligazę T4 (New England Biolabs, M0202S).

5.3. Oczyszczanie i izolacja fragmentów DNA

W celu izolacji fragmentów DNA po rozdiale elektroforetycznym zastosowano odpowiednie zestawy do oczyszczania DNA które zapewniają wysoką jakość i czystość materiału do dalszych reakcji molekularnych. Szczegółowe informacje o użytych odczynnikach i producentach znajdują się w tabeli nr. 13.

Tabela 13: Odczynniki stosowane do izolacji i oczyszczania DNA.

Odczynnik	Producent, Nr. katalogowy
Plasmid Miniprep DNA Purification Kit	EURx, E-35001
GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit	EURx, E-3540

5.4. Antybiotyki stosowane w hodowli bakterii

Do transformacji wykorzystano bakterie *Escherichia coli* szczepu NEB Stable (New England Biolabs), a w celu selekcji transformowanych komórek stosowano odpowiednie antybiotyki dodawane do podłoża hodowlanego: L-agar (A&A Biotechnology, 2021-1000) lub LB w postaci płynnej (A&A Biotechnology; 2020-1000).

Dobór zastosowanego antybiotyku zależał od rodzaju markera oporności obecnego w użytym plazmidzie. Antybiotyki przygotowywano w postaci roztworów magazynowych w odpowiednim rozpuszczalniku (np. wodzie lub etanolu) a następnie dodawano do podłoża hodowlanego po jego wystudzeniu.

Tabela 14: Antybiotyki stosowane do selekcji bakterii.

Odczynnik	Producent, Nr. katalogowy
Amplicylina	VWR, ICNA0219014680
Kanamycyna	VWR, E713-20ML

5.5. Odczynniki do transfekcji komórek ssaczych.

Do transfekcji komórek ssaczych zastosowano komercyjny zestaw do lipofekcji: Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, 11668019) z zastosowanie zmodyfikowanego podłoża Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, 31985070) które minimalizuje toksyczność i zapewnia optymalne warunki dla efektywnego wprowadzenia materiału genetycznego do komórek.

5.6. Odczynniki do genotypowania

Do przeprowadzenia reakcji PCR bezpośrednio z osadu komórkowego zastosowano zestaw Mouse Direct PCR Kit (Bimake, B40015), umożliwiający amplifikację DNA bez konieczności wcześniejszej izolacji genomowego DNA. Reakcje prowadzono z wykorzystaniem buforu reakcyjnego M-PCR OPTI Mix zoptymalizowanego pod kątem wysokiej wydajności i specyficzności amplifikacji w warunkach bezpośredniego PCR.

5.7. Odczynniki do rozdziału elektroforetycznego

Do rozdziału elektroforetycznego DNA wykorzystano odczynniki zestawione w tabeli nr. 15. Agaroza pełniła funkcję matrycy żelowej a bufor TAE zapewniał odpowiednie przewodnictwo jonowe podczas migracji cząsteczek DNA. Próbkę mieszaniny DNA przed naniesieniem na żel połączono z barwnikiem załadunkowym z ang. *loading dye* który umożliwia kontrolę przebiegu elektroforezy. Do wizualizacji kwasów nukleinowych zastosowano barwnik interkalujący GelGreen, aktywowany światłem UV.

Tabela 15: Odczynniki użyte do elektroforezy DNA.

Odczynnik	Producent, Nr. katalogowy
Agaroza	Thermo Fisher, J66501 - 30
Tris-Acetate-EDTA (TAE) Buffer 50X. pH 8.3	ABO, MB20901
Barwnik załadunkowy DNA Gel Loading Dye, 6×	Thermo Scientific, R0611
Barwnik interkalujący DNA GelGreen	Biotium, 41005

6. Odczynniki do analizy aktywności genomu

6.1. RNA-seq

Do izolacji RNA oraz przygotowania bibliotek RNA-seq zastosowano dedykowane zestawy przedstawione w tabeli nr. 16, które umożliwiają uzyskanie wysokiej jakości materiału genetycznego oraz precyzyjną kontrolę wielkości fragmentów DNA przed sekwencjonowaniem.

Tabela 16: Zestawy wykorzystane do izolacji RNA i przygotowania bibliotek RNA-seq.

Odczynnik	Producent, Nr. katalogowy
<i>Direct-zol RNA MiniPrep</i>	Zymo Research, R2050
<i>RNA 6000 Nano Kit</i>	Agilent, 5067-1511
<i>KAPA mRNA HyperPrep Kit</i>	Roche, 8098115702
<i>xGen™ UDI-UMI Adapters</i>	IDT, 10005903
<i>DNA ScreenTape</i>	Agilent, 5067-5585
<i>DNA Reagents</i>	Agilent, 5067-5584

6.2 ATAC-seq

Biblioteki ATAC-seq przygotowywano przy użyciu dedykowanego zestawu *ATAC-SEQ Kit* (Active Motif, 5315). Do sekwencjonowania wykorzystano aparat NovaSeq6000 (Illumina).

6.3. ChIP-seq

Do przeprowadzenia immunoprecypitacji (IP, ang. *immunoprecipitation*) zastosowano specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko charakterystycznym modyfikacjom histonów oraz białkom regulatorowym. Użyte przeciwciała zestawiono w tabeli nr. 17. Następnie uzyskany materiał wykorzystano do przygotowania bibliotek DNA przy użyciu zestawu *Ovation Ultralow V2 DNA-Seq Library Prep Kit* (Tecan, nr kat. 0344NB-32) umożliwiający wydajną ligację adapterów i amplifikację bibliotek DNA z materiału o bardzo małej ilości (poniżej 1 ng).

Jakość RNA oraz długość fragmentów bibliotek sprawdzono przy użyciu systemu TapeStation 4200 (Agilent Technologies) natomiast sekwencjonowanie przeprowadzono na platformie NovaSeq 6000 (Illumina).

Tabela 17: Zestawienie przeciwciał użytych do przeprowadzenia analizy IP.

Przeciwciało	Producent, Nr. katalogowy
H3K27ac	Cell Signaling, 8173S
H3K4Me3	Abcam, ab213224
CTCF	Sigma-Merck, 07-729

7. Odczynniki wykorzystane do konstrukcji systemu wizualizacji

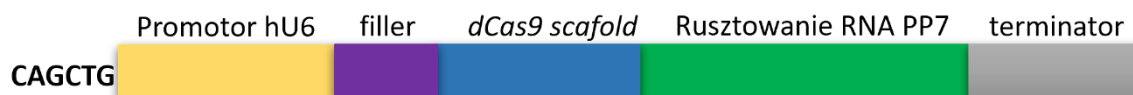
7.1. Projektowanie zmodyfikowanych jednostek CARGO

Na podstawie publikacji Gu et al. (2018) zaprojektowano dwie wersje rusztowań RNA przeznaczonych do integracji z jednostkami CARGO. Obie konstrukcje zostały zsyntetyzowane i wklonowane do wektora pUC19 (kan) przez firmę Genewiz. W efekcie uzyskano dwa wektory: pUC19-pp7 i pUC19-ms2. Każdy z wektorów zawierał stabilny region jednostki CARGO składający się z:

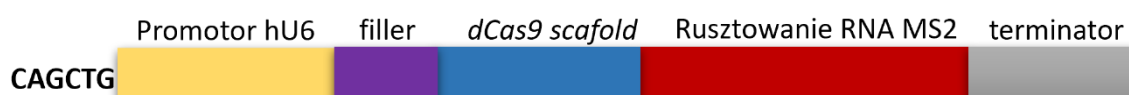
- promotora hU6,
- sekwencji wypełniającej (filler),
- scaffold'u dCas9,
- oraz jednego z dwóch motywów rusztowania RNA: PP7 (rycina 8a) lub MS2 (rycina 8b)
- terminatora transkrypcji.

Na obu końcach jednostki CARGO wprowadzono sekwencje rozpoznawane przez enzym restrykcyjny PvuII co umożliwia łatwą izolację konstruktów z wektora pUC19.

a



b



Rycina 8: Konstrukcja jednostek CARGO z różnymi motywami rusztowania, kompatybilnych z systemem CRISPR-Sirius.

Schemat konstrukcji dwóch wariantów RNA rusztowań dla jednostek CARGO zaprojektowanych

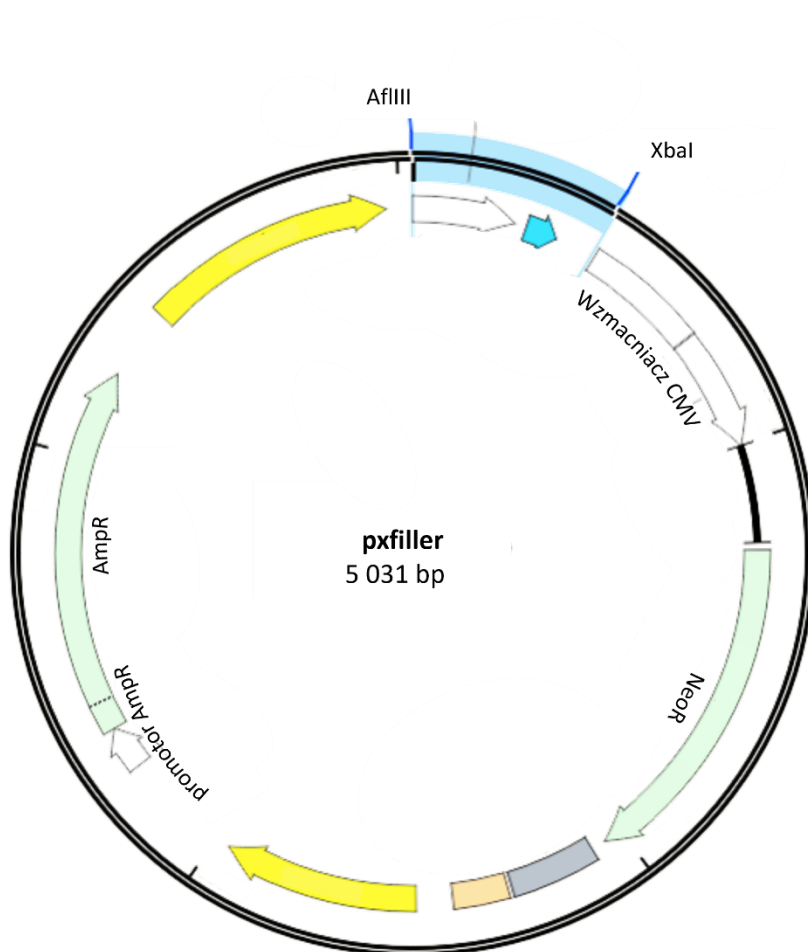
a) Wariant zawierający motyw rusztowania RNA PP7.

b) Wariant zawierający motyw rusztowania RNA MS2.

Oba konstrukty składają się z promotora: hU6 (żółty), sekwencji wypełniającej (fioletowy), scaffoldu dCas9 (niebieski), rusztowania RNA (zielony dla PP7, czerwony dla MS2), oraz sekwencji terminatora (szary). Flankujące sekwencje CAGCTG służą jako elementy rozpoznawcze dla dalszych etapów konstrukcji molekularnej lub integracji.

7.2. Plazmid użyty jako wektor w konstrukcji wektora CARGO

W końcowym etapie konstrukcji wektora wieloelementowe jednostki CARGO zawierające syntetyzowane sgRNA zostały wklonowane do odpowiednio przygotowanego wektora nośnikowego. W tym celu konieczne było zastosowanie niewielkiego wektora zawierającego marker selekcyjny takie jak gen odporności na antybiotyk umożliwiający selekcję pozytywnych klonów po transformacji. Wykorzystano plazmid roboczo nazwany px-filler udostępniony przez promotora pracy. Mapę plazmidu przedstawiona na rycinie nr. 9.



Rycina 9. Mapa plazmidu px-filler użytego jako wektor w klonowaniu wielu jednostek CARGO.

Rycina przedstawia mapę plazmidu px-filler wygenerowaną w programie SnapGene. Zaznaczono miejsca cięcia enzymami restrykcyjnymi AflIII i XbaI, które posłużyły do przygotowania wektora do dalszego etapu klonowania. Plazmid ten zawiera marker selekcyjny w postaci genu oporności na antybiotyk co umożliwia selekcję pozytywnych klonów po transformacji. Konstrukcja została udostępniona przez promotora pracy.

7.3. Sekwencje ukierunkowujące na powtórzenia telomerowe

Powtórzenia telomerowe zawierające motyw GTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA są powszechnie obecne na końcach chromosomów ssaków i stanowią charakterystyczny element ich struktury.

Ze względu na wysoką liczbę powtórzeń, regiony te umożliwiają wiele potencjalnych miejsc wiązania z sgRNA wykorzystywanych w technologii CRISPR-dCas9, co czyni je również idealnym celem do zastosowań w eksperymentach wizualizacji. W związku z tym zaprojektowano startery (tabela nr. 18) umożliwiające precyzyjne ukierunkowanie dCas9 na sekwencje telomerowe które pełniły funkcję kontroli pozytywnej w eksperymentach obrazowania lokalizacji kompleksów dCas9-RNA.

Tabela 18: Startery wykorzystane do uzyskania powtórzeń telomerowych.

Nazwa	Sekwencja
TR_sg1_F	ggacCATGAGGTCTTCGAGAAGACCTAACCTAACCTAAC
TR_sg1_R	aaacGTTAGGGTTAGGGTTAGGTCTTCTCGAAGACCTCATG
TR_sg2_F	ggacTAACCCTAACCTAGGTCTTCGAGAAGACCTCTAG
TR_sg2_R	aaacCTAGAGGTCTTCTCGAAGACCTGGTTAGGGTTA

7.4. Sekwencje starterów sgRNA ukierunkowanych na kotwice pętli w *locus Celf4*

Oligonukleotydy zaprojektowano w celu ukierunkowania kompleksu dCas9 na określone sekwencje w regionie kotwicy pętli CTCF-CTCF: 5' (tabela nr. 19) i 3' (tabela nr. 20). Sekwencje te reprezentują zarówno nici sensowne jak i komplementarne w zależności od orientacji docelowego fragmentu genomowego.

Tabela 19: Sekwencje ukierunkowane na kotwicę 5' CTCF-CTCF w *locus Celf4*.

Lp.	Sekwencja
1	GGAGAGAATTTCTAAGTCTGGGG
2	AGTTATTTCTGTTATCACCGTGG
3	CTTCCTAGCATTATCTGCACAGG
4	AGTAGCTAGGCAAAGAACGACGG
5	TCACACGCATAATGATCACGTGG
6	TTTAACTTCTGTCAATGCTGAGG
7	CCAAGAGCTGACAGAGTACTAGG
9	TACAATCTAATACTAGGGTCTGG
10	GATACTGCCATGTGCATGGCTGG

Tabela 20: Sekwencje ukierunkowane na kotwicę 3' CTCF-CTCF w *locus Celf4*.

Lp.	Sekwencja
1	TGCTCATCCAAGGTTTCATCCAGG
2	CAAGGAGGCTGACTGAGACCGGG
3	GGACTTCACTGACGTCACCCTGG
4	TCCACTAGACTGAAGCCGCAAGG
5	GAGCAAACAGCTAGGGAGACAGG
6	CCCTGATGGAGCCTTTCTGTCGG
7	AGCTGTTATTGTCTCCATGCAGG
8	TTGACTCTTTGGACCTTGTGGGG
10	TGCTTTCTCAAAGATTGCATAGG

Do utworzenia oligonukleotydów ukierunkowanych na określone sekwencje w regionie kotwicy pętli CTCF-CTCF wykorzystano specjalnie zaprojektowane startery których sekwencje zostały przedstawione w tabeli nr. 21 dla kotwicy 5' oraz tabeli nr. 22 dla kotwicy 3'.

Tabela 21: Startery wykorzystane do amplifikacji sekwencji rozpoznających region 5' kotwicy CTCF-CTCF w *locus Celf4*.

Nazwa	Sekwencja
sg1_Celf4_5'_F	ggacCATGAGGTCTTCGAGAAGACCTTAG AAATTCTCTCC
sg1_Celf4_5'_R	aaacGGAGAGAATTTCTAAGGTCTTCTCGAAGACCTCATG
sg2_Celf4_5'_F	ggacCCCCAGACTTAGAAGGTCTTCGAGAAGACCTTAACAGAAATAACT
sg2_Celf4_5'_R	aaacAGTTATTTCTGTAAAGGTCTTCTCGAAGACCTTCTAAGTCTGGGG
sg3_Celf4_5'_F	ggacCCACGGTGATAACAGGTCTTCGAGAAGACCTATAATGCTAGGAAG
sg3_Celf4_5'_R	aaacCTTCCTAGCATTATAGGTCTTCTCGAAGACCTGTTATCACCGTGG
sg4_Celf4_5'_F	ggacCCTGTGCAGATAAAGGTCTTCGAGAAGACCTTTTGCCTAGCTACT
sg4_Celf4_5'_R	aaacAGTAGCTAGGCAAAAGGTCTTCTCGAAGACCTTTATCTGCACAGG
sg5_Celf4_5'_F	ggacCCGTCGTTCTTTGAGGTCTTCGAGAAGACCTCATTATGCGTGTGA
sg5_Celf4_5'_R	aaacTCACACGCATAATGAGGTCTTCTCGAAGACCTCAAAGAACGACGG
sg6_Celf4_5'_F	ggacCCACGTGATCATTAGGTCTTCGAGAAGACCTTGACAGAAAGTTAAA
sg6_Celf4_5'_R	aaacTTTAACTTCTGTCAAGGTCTTCTCGAAGACCTAATGATCACGTGG
sg7_Celf4_5'_F	ggacCCTCAGCATTGACAGGTCTTCGAGAAGACCTCTGTCAGCTCTTGG
sg7_Celf4_5'_R	aaacCCAAGAGCTGACAGAGGTCTTCTCGAAGACCTGTCAATGCTGAGG
sg8_Celf4_5'_F	aaacGGTAGGTGAGTCTGAGGTCTTCTCGAAGACCTTGTGCATGGCTGG
sg8_Celf4_5'_R	aaacTACAATCTAATACTAGGTCTTCTCGAAGACCTACAGAGTACTAGG
sg9_Celf4_5'_F	aaacGGTGTGTCTCAAACAGGTCTTCTCGAAGACCTTCTGAGGCTCTGG
sg9_Celf4_5'_R	aaacGATACTGCCATGTGAGGTCTTCTCGAAGACCTTACTAGGGTCTGG
sg10_Celf4_5'_F	ggacCCAGAGCCTCAGAAGGTCTTCGAGAAGACCTCTAG
sg10_Celf4_5'_R	aaacCTAGAGGTCTTCTCGAAGACCTTCTGAGGCTCTGG

Tabela 22: Startery wykorzystane do amplifikacji sekwencji rozpoznających region 3' kotwicy CTCF-CTCF w *locus Celf4*.

Nazwa	Sekwencja
sg1_Celf4_3'_F	ggacCATGAGGTCTTCGAGAAGACCTACCTTGGATGAGCA
sg1_Celf4_3'_R	aaacTGCTCATCCAAGGTAGGTCTTCTCGAAGACCTCATG
sg2_Celf4_3'_F	ggacCCTGGATGAACCTAGGTCTTCGAGAAGACCTAGTCAGCCTCCTTG
sg2_Celf4_3'_R	aaacCAAGGAGGCTGACTAGGTCTTCTCGAAGACCTAGGTTTCATCCAGG
sg3_Celf4_3'_F	ggacCCCGGTCTCAGTCAGGTCTTCGAGAAGACCTCGTCAGTGAAGTCC
sg3_Celf4_3'_R	aaacGGACTTCACTGACGAGGTCTTCTCGAAGACCTGACTGAGACCGGG
sg4_Celf4_3'_F	ggacCCAGGGTGACGTCAGGTCTTCGAGAAGACCTTTCAGTCTAGTGGA
sg4_Celf4_3'_R	aaacTCCACTAGACTGAAAGGTCTTCTCGAAGACCTGACGTCACCCTGG
sg5_Celf4_3'_F	ggacCCTTGCGGCTTCAAGGTCTTCGAGAAGACCTCTAGCTGTTTGCTC
sg5_Celf4_3'_R	aaacGAGCAAACAGCTAGAGGTCTTCTCGAAGACCTTGAAGCCGCAAGG
sg6_Celf4_3'_F	ggacCCTGTCTCCCTAGAGGTCTTCGAGAAGACCTAGGCTCATCAGGG
sg6_Celf4_3'_R	aaacCCCTGATGGAGCCTAGGTCTTCTCGAAGACCTCTAGGGAGACAGG
sg7_Celf4_3'_F	ggacCCGACAGAAAGGCAGGTCTTCGAGAAGACCTAGACAATAACAGCT
sg7_Celf4_3'_R	aaacAGCTGTTATTGTCTAGGTCTTCTCGAAGACCTGCCTTTCTGTCGG
sg8_Celf4_3'_F	ggacCCTGCATGGAGACAGGTCTTCGAGAAGACCTGTCCAAAGAGTCAA
sg8_Celf4_3'_R	aaacTTGACTCTTTGGACAGGTCTTCTCGAAGACCTGTCTCCATGCAGG
sg9_Celf4_3'_F	ggacCCCCACAAGGTCCAGGTCTTCGAGAAGACCTTCTTTGAGAAAGCA
sg9_Celf4_3'_R	aaacTGCTTTCTCAAAGAAGGTCTTCTCGAAGACCTGGACCTTGTGGGG
sg10_Celf4_3'_F	ggacCCTTTTCCATCTCAGGTCTTCGAGAAGACCTCTAG
sg10_Celf4_3'_R	aaacCTAGAGGTCTTCTCGAAGACCTACAGAACAATGGG

7.5. Zestawy i materiały wykorzystane do konstrukcji wektorów metodą CARGO.

Do konstrukcji wektorów metodą CARGO użyto następujących zestawów i odczynników:

- Kulki magnetyczne do oczyszczania kwasów nukleinowych Mag-bind (VWR, M1378-01P)
- Exonuclease III (NEB, M0206)
- Zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego: *Agarose-out DNA purification Kit* (eurx, E3540-02)

7.6. Plazmidy wykorzystane do konstrukcji wektorów ekspresyjnych

Do konstrukcji systemu wizualizacji *loci* w jądrze komórkowym wykorzystano między innymi plazmidy komercyjnie oferowane przez firmę Addgene (tabela nr. 23). Zastosowano plazmid kodujący białko dCas9 oraz plazmidy zawierające geny białek fluorescencyjnych połączonych z sekwencjami rozpoznającymi struktury obecne w zaprojektowanym wcześniej rusztowaniu molekularnym (tabela nr. 23). Takie podejście umożliwiało precyzyjne odwzorowanie lokalizacji wybranych regionów genomowych.

Tabela 23: Wykaz użytych plazmidów do systemu wizualizacji wraz z numerami katalogowymi.

Nazwa plazmidu	Addgene ID
pHAGE-EFS-PCP-3xGFPnls	#75385
pHAGE-EFS-MCP-3xBFPnls	#75384
pHAGE-EFS-N22P-3xRFPNLS	#75387
pGH125-dCas9-Blast	#85417

7.7. Plazmidy lentiwirusowe wykorzystane do produkcji cząsteczek wirusa

Plazmidy pakujące i otoczkowe umożliwiały produkcję rekombinowanych cząsteczek lentiwirusowych na podstawie konstrukcji ekspresyjnych wprowadzonych do komórek produkujących wirusa.

Tabela 24: Plazmidy lentiwirusowe wykorzystane do produkcji cząsteczek wirusa.

Nazwa plazmidu	Funkcja	Addgene ID
psPAX2	Plazmid pakujący	#12260
pMD2.G (VsVg)	Plazmid kodujący otoczkę	#12259

Do zwiększenia wydajności produkcji wirusa oraz zwiększania efektywności transdukcji komórek docelowych użyto odczynników przedstawionych w tabeli nr. 25.

Tabela 25: Odczynniki do produkcji i transfekcji lentiwirusowej.

Odczynnik	Firma, nr. katalogowy
Viral Boost reagent	Alstem, VB100
Lenti-X Concentrator	Biokom, 631232
polybrene	Merck, TR-1003-G

METODYKA

Część I i II Analiza funkcji CTCF i ncRNA regulującego jego aktywność w komórkach ES i NS

1. Warunki hodowli komórkowej

Hodowle komórkową przeprowadzono w trzech warunkach hodowlanych. Linie ES były hodowane w i) standardowych warunkach FBS/LIF, ii) warunkach (2i/LIF) w celu uzyskania jak najwyższego poziomu pluripotencji w hodowli komórkowej. Linie NS były hodowane w warunkach standardowych dla tego typu linii (EGF/FGF).

1.1. Hodowla linii ES w warunkach standardowych (FBS/LIF)

Komórki hodowano w plastiku hodowlanym powlekany 0,2% żelatyną. Do hodowli kultury komórkowej używano medium hodowlanego do komórek ES w składzie:

Tabela 26: Skład medium hodowlanego do komórek ES.

Odczynnik	Stężenie
<i>Glasgow Minimum Essential Medium</i>	-
FBS EmbryoMax ES cell Qualified	10%
LIF (Leukemia Inhibitory Factor)	2 ng/ml
β-merkaptotoetanol	1 mM
NEAA (Non-Essential Amino Acids)	1×
L-glutamina	1×
Pirogronian sodu	1×

Komórki utrzymywano w temperaturze 37°C w 5% CO₂. W gęstości 30 000 komórek/cm². Przy zmianie medium hodowlanego co 24 godziny. Komórki pasażowano co 48 godziny przy użyciu akutazy.

1.2. Hodowla linii ES w warunkach (2i/LIF)

Komórki ES (2i/LIF) hodowano w podłożu hodowlanym DMEM/F12 + inhibitory + LIF. Szczegółowy skład medium przedstawiono w tabeli nr. 27.

Tabela 27: Odczynniki wykorzystywane do hodowli komórek mysich ES w warunkach 2i.

Odczynnik	Stężenie
DMEM/F12	-
N2 suplement	0,5× (2,5 ml / 500 ml)
B27 suplement	0,5× (5 ml / 500 ml)
Albumina surowicy bydlęcej (BSA), frakcja V	0,012%
NEAA (aminokwasy nieesencjalne)	1%
D-(+)-glukoza	0,03 M
HEPES	4,5 mM
β-merkaptoetanol	0,1 mM
CHIR99021 (inhibitor GSK3)	3 μM
PD0325901 (inhibitor MEK)	1 μM
LIF (czynnik hamujący białaczkę)	2 ng/ml

1.3. Hodowla komórek NS

Komórki ES indukowano z zastosowaniem podłoża hodowlanego DMEM/F12. Szczegółowy skład medium przedstawiono w tabeli nr.28.

Tabela 28: Skład medium stosowanego w indukcji neuronalnej komórek.

Odczynnik	Stężenie
DMEM/F12	-
N2 (50x)	0,5x
B27 (50x)	1x (czyli 10x z 50x)
BSA (Albumina surowicy bydlęcej)	0,012%
NEAA (aminokwasy nieesencjalne)	1x
D-(+)-glukoza	0,03 M
HEPES	4,5 mM
β-merkaptobetanol	0,1 mM

Aby utrzymać komórki w stadium neuronalnych progenitorów, do medium indukującego neurogenezę dodawano dwa czynniki wzrostu: myszy EGF (mEGF) oraz myszy FGF (mFGF), w stężeniach podanych w tabeli 29. Obecność tych czynników podtrzymywała niedojrzały stan komórek.

Tabela 29: Suplementacja pożywki hodowlanej stosowanej w hodowli komórek NS

Odczynnik	Stężenie
mEGF (z ang. <i>Epidermal Growth Factor</i>)	10 ng/ml
mbFGF (z ang. <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>)	10 ng/ml

1.4. Warunki hodowli linii HEK293K

Komórki HEK293 hodowano w warunkach standardowych: w temperaturze 37 °C, z 5% CO₂. Hodowlę prowadzono w szalkach Petriego o średnicy 10 cm². Medium wymieniano co 2 - 3 dni. Komórki pasażowano po osiągnięciu około 80 - 90% konfluencji przy użyciu 0,05% roztworu trypsyny-EDTA zgodnie z zaleceniami producenta.

Tabela 30: Skład medium do hodowli HEK293.

Odczynnik	Stężenie
DMEM	-
FBS	10%
Penicylina i streptomycyna	1%

1.5. Procedura wyznaczania krzywej śmierci komórek

Do określenia optymalnego stężenia antybiotyku selekcyjnego dla danej linii komórkowej wyznaczono krzywą wrażliwości komórek na antybiotyki.

Komórki wysiewano do płytek hodowlanych w gęstości odpowiedniej dla badanej linii komórkowej a następnie poddawano je działaniu serii rosnących stężeń wybranego antybiotyku. Każde stężenie testowano w osobnym dołku pamiętając o replikatach technicznych pozostawiając również kontrolę bez antybiotyku. Komórki monitorowano codziennie pod kątem żywotności i morfologii.

Na podstawie uzyskanych wyników określono najniższe stężenie antybiotyku które powodowało pełną eliminację nieopornych komórek (nie zawierających kasety odporności) w ustalonym czasie (2 - 3 dni). Takie stężenie przyjęto jako optymalne do dalszych eksperymentów selekcyjnych.

1.6. Selekcja prekursorów neuronalnych z użyciem markera CD44

Komórki oddzielono od plastiku hodowlanego za pomocą akutazy. Następnie osad komórkowy przepłukano dwukrotnie *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (dPBS). Komórki inkubowano z buforem blokującym (0,5% BSA-PBS) w temperaturze 4°C. Po 30 minutach dodano przeciwciało CD44 w rozcieńczeniu 1:200 i inkubowano przez kolejne 40 minut w temperaturze 4°C bez dostępu światła. Po inkubacji komórki ponownie przemyto dwukrotnie dPBS. Komórki sortowano za pomocą sortera Cell BD FACSAriaII.

1.7. Mrożenie komórek

Aby umożliwić długoterminowe przechowywanie, po osiągnięciu odpowiedniej konfluencji (około 80 - 90%) komórki zostały poddane procedurze mrożenia która przebiegała następująco:

Komórki oddzielono od podłoża przy pomocy akutazy, a następnie przeniesiono do probówek i odwirowano (ok. 5 minut, 300 x g, temperatura pokojowa). Po odwirowaniu, supernatant odrzucono a komórki zawieszono w niewielkiej objętości medium do mrożenia o składzie podstawowego medium komórkowego z dodatkiem DMSO (końcowe stężenie 10%). Komórki zawieszono w objętości 1 ml (od 0,5 do 1 miliona komórek) i rozdysponowano do krioprobówek.

Probówki umieszczano w specjalnym pojemniku z izopropanolem co zapewniało stopniowe obniżanie temperatury ($\sim 1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Najpierw komórki przechowywano przez 24 godziny w -80°C a następnie komórki przeniesiono do ciekłego azotu ($\text{temp} = -179^{\circ}\text{C}$) w celu długoterminowego przechowywania.

1.8. Degradacja CTCF wywołana auksyną

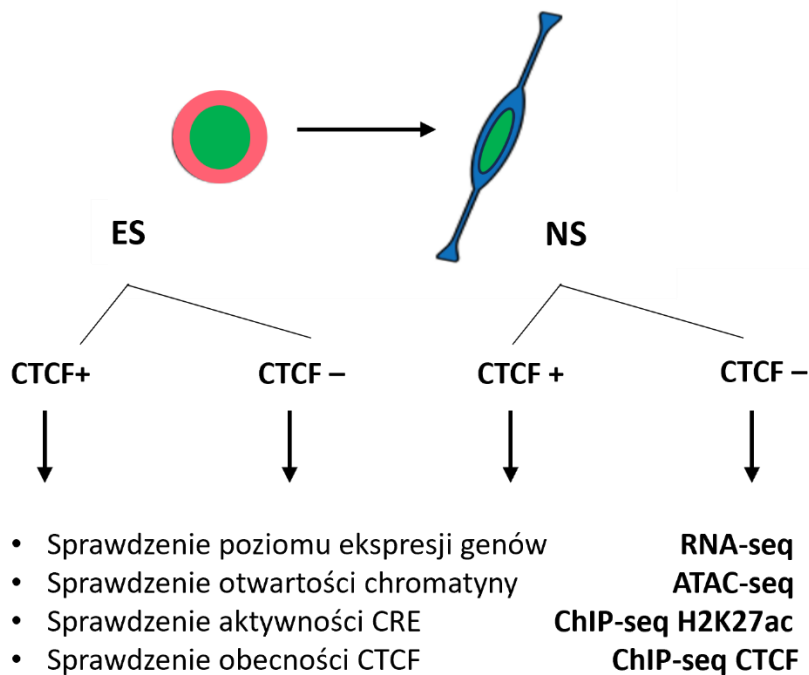
W celu zbadania funkcjonalnej roli białka CTCF podczas różnicowania zastosowano komórki ES i NS linii CTCF^{EGFP-AID} (materiały 3.1.1.). Komórki posiano w odpowiednich gęstościach i po 24 godzinach traktowano kwasem IAA w stężeniu 500 μM (Nora et al., 2017) rozcieńczonym w odpowiednich podłożach hodowlanych.

Komórki inkubowano z IAA przez 24 godziny w temperaturze 37°C . Po zakończeniu inkubacji komórki oddzielano od plastiku przy użyciu akutazy następnie komórki przepłukano roztworem PBS i wykorzystano do dalszych analiz. Część populacji (10 000 komórek) została wykorzystana do sprawdzenia efektywności degradacji za pomocą cytometrii przepływowej.

2. Analiza dostępności chromatyny

W przypadku dalszych analiz, komórki kierowano do izolacji materiału do bibliotek ATAC-seq, ChIP-seq lub RNA-seq aby zbadać konsekwencje utraty CTCF na poziomie epigenetycznym jak i transkrypcyjnym.

CTCF^{EGFP-AID} / TIGRE^{OsTIR}



Rycina 10: Uproszczony schemat metodologii dotyczącej analizy struktury chromatyny po deplecji CTCF w komórkach ES i NS.

Na schemacie przedstawiono zastosowane techniki umożliwiające ocenę zmian w strukturze chromatyny i dostępności elementów regulatorowych w odpowiedzi na utratę CTCF.

2.1. RNA-seq

RNA wyizolowano z komórek przy użyciu zestawu *Direct-zol RNA MiniPre* zgodnie z instrukcją producenta. Jakość RNA oceniono za pomocą zestawu *Agilent RNA 6000 Nano Kit*.

Biblioteki RNA-seq przygotowano przy użyciu zestawu *KAPA mRNA HyperPrep*, zgodnie z protokołem producenta wykorzystując 1 µg RNA jako materiał wyjściowy. Do konstrukcji bibliotek zastosowano adaptory *xGen™ UDI-UMI* zawierające unikalne znaczniki molekularne.

Wielkość fragmentów DNA oceniono z wykorzystaniem urządzenia *TapeStation 4200* oraz zestawu *TapeStation DNA ScreenTape & Reagents*. Natomiast sekwencjonowanie przeprowadzono na platformie *Illumina NovaSeq 6000* w trybie paired-end (2 × 100 bp).

2.2. ATAC-seq

Biblioteki ATAC-seq wykonano przy użyciu zestawu *ATAC-seq kit* zgodnie z zaleceniami producenta. Do przeprowadzenia eksperymentu użyto 100 000 komórek oddzielonych od plastiku hodowlanego. Biblioteki sekwencjonowano (2x100 pz, sparowany koniec) przy użyciu *NovaSeq6000*.

2.3. ChIP-seq

Eksperymenty ChIP-seq przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisaną metodologią (Pekowska et al., 2018). W celu analizy modyfikacji histonowych zastosowano przeciwciała rozpoznające markery charakterystyczne dla aktywnych regionów chromatyny tj. aktywnych promotorów i wzmacniaczy: H3K27ac oraz H3K4me3. Do każdego immunoprecypitatu użyto ilości chromatyny odpowiadającej 3 milionom komórek. Natomiast w przypadku analizy ChIP-seq białek CTCF zastosowano ilość chromatyny odpowiadającą 10 milionom komórek.

Biblioteki do sekwencjonowania przygotowano przy użyciu zestawu *Ovation Ultralow V2 DNA-Seq Library Preparation Kit* zgodnie z instrukcją producenta. Sekwencjonowanie przeprowadzono na platformie *Illumina NovaSeq 6000* w trybie paired-end (2 × 100 pz).

2.4. Analiza bioinformatyczna

Wszystkie obliczenia oraz analizy bioinformatyczne zostały przeprowadzone przez członków zespołu specjalizujących się w bioinformatyce. Szczegóły metod analizy bioinformatycznej zostały opisane w publikacji Dehingia B i Milewska-Puchała M. 2025 opublikowanej w *Nature Cell Biology*.

3. Techniki biologii molekularnej

3.1. Hodowla bakterii *Escherichia coli*

Bakterie *Escherichia coli* szczepu NebStable hodowano 12 - 18 godzin w płynnej pożywce LB (ang. *Lysogeny Broth*) bez lub z dodatkiem ampicyliny w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 180 rpm.

Selekcję bakterii po transformacji prowadzono przez 12 - 16 godzin z użyciem pożywki stałej LB-agar na szalkach Petriego z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku. Użycie antybiotyku było zależne od rodzaju wektora, użytego do transfekcji bakterii: ampicyliny 100 µg/ml, kanamycyny 50 µg/ml.

3.1.1. Przygotowanie bakterii kompetentnych

Komórki kompetentne bakterii przygotowano przy użyciu bakterii *Escherichia coli* szczepu NebStable. Pierwszego dnia procedury przygotowano całonocną hodowlę bakteryjną hodowano przez noc w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 180 rpm. Następnego dnia z płynnej całonocnej hodowli bakterii przeszczepiono do świeżego ciepłego medium LB bez antybiotyków w rozcieńczeniu 1/100. Wykonywano posiew redukcyjny na stałym podłożu LB-agar bez czynnika selekcyjnego i hodowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem do uzyskania OD w przedziale 0,4 - 0,6. Wynik OD mierzono za pomocą spektrofotometru.

Hodowlę bakteryjną schłodzono na lodzie przez godzinę a następnie wirowaniu 5 500 rpm przez 10 min w temperaturze 4°C.

Osad bakteryjny został zawieszony w 15 ml 100mM CaCl₂. Taką zawiesinę inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia zwirowano ponownie w 5 500 rpm przez 10 min w 4°C a osad zawieszono sterylnym chłodnym w roztworze 10mM CaCl₂ z 10% glicerolem przeniesiono do probówek po 40µl zawiesiny na probówkę. Tak przygotowane bakterie kompetentne przechowywano w temperaturze - 80°C.

3.2. Edycja genomu CRISPR-Cas9 w komórkach ES

3.2.1. Projektowanie sgRNA

Do zaprojektowania sekwencji sgRNA wykorzystałam narzędzie online CRISPOR (<http://crispor.tefor.net>; (Concordet & Haeussler, 2018)). Dla każdej strategii delecji zaprojektowano zestaw czterech sgRNA po dwa skierowane na region od strony 5' i dwa na region od strony 3' miejsca docelowego.

Zaprojektowane pary sgRNA zgodnie z sekwencjami referencyjnego genomu mysiego mm10 wykorzystano do delecji poniższych regionów:

- a) trzy miejsca wiązania CTCF w *locus Aldh1a3* w następujących lokalizacjach:
 - i) KO#1 (chr7: 66 389 290 - 66 389 666),
 - ii) KO#2 (chr7: 66 409 322 - 66 410 004),
 - iii) KO#3 (chr7:66,434,748 - 66,435,124).
- b) *locus Neat1* (chr19:5,703,000 - 5,715,000)
- c) Region *locus Pantr1* (chr1: 42 694 916 - 42 692 353)

Miejsca wiązania CTCF w *Aldh1a3* usunięto w linii ES 46C (materiały 3.1.3.) natomiast delecji *Pantr1*, *Neat1* dokonano w komórkach ES CTCF^{HALO} (materiały 3.1.2.). Komórki ES w których przeprowadzono delecję hodowano w standardowych warunkach (ES FBS/LIF).

3.2.2. Klonowanie sgRNA do wektora zawierającego wektor Cas9

Otrzymane inserty zawierające zaprojektowane sekwencje sgRNA zostały wklonowane do plazmidu 2A-GFP (px458) w miejscu rozpoznawanym przez enzym restrykcyjny BbsI. Proces klonowania przeprowadzono zgodnie z ogólnodostępnym protokołem opracowanym przez laboratorium Prof. F. Zhang'a (<https://www.addgene.org/crispr/zhang/>).

Plazmid px458 zawiera sekwencję kodującą dCas9 sprzężoną z markerem fluorescencyjnym GFP co umożliwia jednoczesną ekspresję ukierunkowanego systemu CRISPR-dCas9 oraz identyfikację transfekowanych komórek za pomocą detekcji sygnału GFP. Wektory zweryfikowano pod kątem prawidłowej insercji za pomocą sekwencjonowania (Genomed, Polska).

3.2.3. Transformacja bakterii metodą szoku cieplnego (Heat shock)

Plazmidowe DNA wprowadzano do komórek bakterii kompetentnych *E.coli* stosując metodę szoku cieplnego. Do 50 μ l zawiesiny bakteryjnej dodawano 3 μ l mieszaniny ligacyjnej i mieszano przez kilkukrotne ostrożne pipetowanie a następnie próbki inkubowano na lodzie przez 30 minut. Szok cieplny został wprowadzony przez natychmiastowe podwyższenie temperatury do 42°C przez 45 sekund (poprzez umieszczenie w bloku grzewczym) od razu po wprowadzeniu szoku termicznego komórki odłożono na lód na 5 minut, kolejno zawieszono komórki w 200 μ l płynnego LB bez zawartości antybiotyków i inkubowano przez godzinę w temperaturze 30°C z powolnym wytrząsaniem 200 rpm. Po upływie czasu inkubacji komórki zawieszone w 100 μ l LB wysiano na szlakach Petriego ze stałym podłożem LB-agar zawierającym czynnik selekcyjny w postaci antybiotyku ampicyliny o stężeniu 100 μ g/ml.

3.2.4. Sprawdzenie poprawności konstruktu

W celu weryfikacji poprawności konstruktu, czyli obecności zaprojektowanych sekwencji sgRNA, ręcznie wybrano około 10 pojedynczych kolonii bakteryjnych, które uprzednio wyrosły na podłożu LB-agar z ampicyliną. Każdą kolonię przeniesiono do hodowli płynnej LB, zawierającej ampicylinę (100 μ g/ml) w celu zachowania selekcji. Hodowle inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (180 rpm).

Następnego dnia zawiesinę bakteryjną zwirowano w 16 000 rpm. Z uzyskanego osadu bakteryjnego wyizolowano DNA za pomocą zestawu *Plasmid Miniprep DNA Purification Kit* zgodnie z instrukcją producenta. Wyizolowane DNA oddano do sekwencjonowania metoda Sangera (Genomed, Polska) w celu potwierdzenia obecności sgRNA w plazmidzie bakteryjnym.

3.2.5. Transformacja komórek ES plazmidami zawierającymi sgRNA kierujące do miejsca delekcji

Komórki ES wysiano w gęstości 370 000 komórek na dołek 9,5 cm², 24 godziny przed planowanym doświadczeniem. Transfekcję przeprowadzono z użyciem dwóch plazmidów typu px458 (px458-GFP), zawierających sekwencje sgRNA. Do każdego dołka dodano po 3 μ g każdego z plazmidów. Transfekcji dokonano przy użyciu *odczynnika Lipofectamine™ Stem Transfection Reagent* zgodnie z zaleceniami producenta.

24 godziny po transfekcji komórki ekspresujące białko fluorescencyjne GFP zostały wyselekcjonowane przy użyciu cytometrii przepływowej (FACS Aria BD II). Następnie komórki wysiano na szlakę Petriego pokrytą 0,2% żelatyną (150 komórek/cm²). Po 5 dniach pojedyncze kolonie zostały ręcznie wybrane i przeniesione do płytek 96-dołkowych w celu otrzymania linii monoklonalnych.

Po uzyskaniu 90% konfluencji, z każdego dołka pobrano 60% komórek, z których wyizolowano DNA przy użyciu zestawu Mouse Direct PCR Kit. Pozostałe 40% kultury komórkowej przesiano do pojedynczego dołka płytki 12-dołkowej w celu dalszej hodowli komórkowej.

Do sprawdzenia poprawności delecji w poszczególnych klonach komórkowych przeprowadzono reakcję PCR z użyciem gotowej mieszaniny *M-PCR OPTI Mix* zgodnie z zaleceniami producenta. Warunki reakcji PCR były dobrane indywidualnie dla każdego *locus* oddzielnie. Reakcja była przeprowadzona w sposób opisany poniżej

3.2.6. Warunki reakcji PCR w celu sprawdzenia delecji miejsc wiązania CTCF w *locus*

***Aldh1a3*:**

#1 Miejsce wiązania Ctf w *Aldh1a3*: początkowa denaturacja 95°C, 3 min, a następnie 35 cykli denaturacji 95°C, 20 s; hybrydyzacja 60°C, 20 s; wydłużenie 72°C 30s. Ostateczne wydłużenie przeprowadzono w temperaturze 72°C przez 5 min.

#2 Miejsce wiązania Ctf w *Aldh1a3*: początkowa denaturacja 95°C, 3 min, a następnie 35 cykli denaturacji 95°C, 20s; hybrydyzacja 60°C, 20s; wydłużenie 72oC 30s. Ostateczne wydłużenie przeprowadzono w temperaturze 72°C przez 5 min.

#3 Miejsce wiązania Ctf w *Aldh1a3*: początkowa denaturacja 95°C, 3 min, a następnie 35 cykli denaturacji 95°C, 20s; hybrydyzacja 52°C, 20s; wydłużenie 72°C 30s. Ostateczne wydłużenie przeprowadzono w temperaturze 72°C przez 5 min.

3.2.7. Warunki reakcji PCR w celu sprawdzenia delecji regionu w *locus Pantr1*:

Reakcja PCR przy użyciu starterów znajdujących się poza miejscem delecji:

początkowa denaturacja 95°C, 3 min, a następnie 35 cykli denaturacji 95°C, 30 s; hybrydyzacja 58°C, 30 s; wydłużanie 68°C 1,40 min. Ostateczne wydłużenie przeprowadzono w 68°C przez 5 min.

Reakcja PCR przy użyciu starterów znajdujących się w miejscu delecji:

początkowa denaturacja 95°C, 3 min, a następnie 35 cykli denaturacji 95°C, 20 s; hybrydyzacja 52°C, 20 s; wydłużanie 72°C 25 s. Ostateczne wydłużenie przeprowadzono w 72°C przez 5 min.

3.2.8. Warunki reakcji PCR w celu sprawdzenia delecji *locus Neat1*:

początkowa denaturacja 95°C, 3 min, a następnie 35 cykli denaturacji 95°C, 30 s; hybrydyzacja 56°C, 30 s; wydłużanie 68°C 2,30 min. Ostateczne wydłużenie przeprowadzono w 68°C przez 5 min.

3.2.9. Rozdział elektroforetyczny w celu weryfikacji wielkości uzyskanych konstruktów

Każdą próbkę genotypowano, a produkty reakcji analizowano za pomocą rozdziału elektroforetycznego 1% żelu agarozowym zawierającym znacznik *Midori Green* w celu wizualizacji namnażanych fragmentów DNA. Elektroforezę prowadzono w aparacie do elektroforezy poziomej (BioRad, CA, USA) w buforze TAE_x1 przy stałym napięciu 80 V przez 60 minut. Do próbek przed nałożeniem na żel dodawano bufor obciążający w rozcieńczeniu 1:6. Wyniki elektroforezy wizualizowano w świetle UV w transiluminatorze InGenius.

Do każdej reakcji zawsze stosowano kontrolę negatywną, czyli inie komórkową bez delecji w genomie oraz próbę pozytywną, czyli mieszaninę komórek poddanych delecji metodą *CRISPR-Cas9*.

3.3. Generowanie prób kontrolnych

W procesie generowania linii komórkowych z delecją należy uwzględnić możliwość powstania efektów ubocznych wynikających z wprowadzenia stresu komórkowego, związanego z samą procedurą edycji genomu. Aby zwiększyć specyficzność i wiarygodność późniejszych analiz, wygenerowano również monoklonalne linie kontrolne (A1, A2, A3) które nie zawierają delecji żadnego genu, jednak przeszły identyczny proces modyfikacji jak linie eksperymentalne. Dzięki temu możliwa jest selektywna ocena efektów wynikających wyłącznie z usunięcia danego genu z wykluczeniem zmian będących konsekwencją samej procedury edytowania genomu.

Komórki ES linii CTCF^{HALO} zostały wysiane dzień wcześniej w gęstości 370 000 komórek na dołek, płytki 6-dołkowej. Następnie komórki zostały transfekowane dwoma plazmidami px458 nie zawierającymi żadnego sgRNA (użyto 3 µg każdego plazmidu) przy użyciu odczynnika *LipofectamineTM Stem Transfection Reagent* zgodnie z instrukcją producenta.

24 godziny po transfekcji komórki ekspresujące białko fluorescencyjne GFP pochodzące z plazmidu px458, zostały wyizolowane metodą cytometrii przepływowej. Następnie posiano je na szalki Petriego pokryte 0,2% żelatyną, w gęstości 150 komórek/cm², co odpowiada 10 000 komórekom na jedną szalkę. Po 5 dniach pojedyncze kolonie zostały ręcznie wybrane i przeniesione do płytek 96-dołkowych, w celu otrzymania linii monoklonalnych. Komórki zostały wyselekcjonowane na obecności antygenu CD442 przy użyciu cytometrii przepływowej.

3.4. Analiza ekspresji genów: izolacja RNA i analiza ilościowa

3.4.1. Ekstrakcja RNA

Do ekstrakcji RNA przygotowano palety z 250 000 komórek, które poddawano lizie w odczynniku TRI. RNA zostało wyizolowane za pomocą zestawu *Direct-zol RNA MiniPrep* zgodnie z instrukcją producenta. Jakość RNA oceniono przy użyciu sprzętu Nanodrop.

3.4.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Do otrzymania cDNA użyto zestawu *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*. Materiałem wyjściowym było z 600 ng RNA w objętości reakcji 20 µl. Jakość cDNA została zmierzona na urządzeniu Nanodrop. Reakcja uwzględniała przygotowanie również kontroli negatywnych w postaci próbek bez enzymów odwrotnej transkryptazy.

3.4.3. Reakcja ilościowa PCR w czasie rzeczywistym

Reakcje qPCR przeprowadzono przy użyciu systemów *CFX Opus Real-Time PCR Systems* (BIO-RAD). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło: 4 µl odczynnika *Fast SYBRTMGreen Master Mix* (Thermo Fisher, 4385616), startery o stężeniu 10 pmol/µl każdy (zawieszone w objętości 0,5 µl wody), 4,5 µl roztworu cDNA (cDNA zostało każdorazowo

przygotowane w stężeniu 1:80 - 20 ng). Wszystkie reakcję qPCR opisane w pracy zostały przeprowadzone w następujących warunkach: denaturacja wstępna: 95 °C przez 3 minuty a następnie 40 cykli w 95 °C przez 10 sekund i 60 °C przez 30 sekund.

Część III Konstrukcja systemu do pomiaru kinetyki interakcji pomiędzy kotwicami pętli w czasie rzeczywistym

4. Projektowanie i konstrukcja narzędzia do wizualizacji *loci*

Aby umożliwić śledzenie kinetyki pętli chromatynowych, zaprojektowałam dwukanałowy system wizualizacji oparty na technologii CRISPR-Sirius umożliwiający równoczesne monitorowanie dwóch odrębnych miejsc wiązania dCas9 w obrębie tego samego *locus* genetycznego.

W pierwszym etapie eksperymentu wykorzystano wcześniej opisaną linię komórkową CTCF^{EGFP-AID} umożliwiającą indukowaną degradację białka CTCF. Jednak w toku dalszych analiz okazało się, że linia ta nie jest optymalna dla zaplanowanych eksperymentów. W związku z tym na kolejnych etapach pracy, zdecydowano się na zastosowanie linii CTCF^{HALO}.

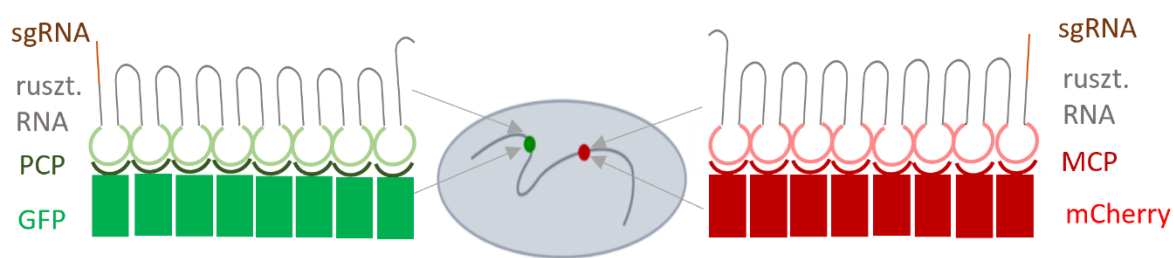
W pierwszym etapie komórki ES i NS zostały poddane transdukcji wektorami lentiwirusowymi kodującymi białka fuzyjne:

- 1) w przypadku linii CTCF^{EGFP-AID}:
 - i) PCP sprzężone z fluorescencją (PCP-BFP)
 - ii) MCP sprzężone z czerwoną fluorescencją (MCP-mCherry).
- 2) w przypadku linii CTCF^{HALO}:
 - i) PCP sprzężone z zieloną fluorescencją (PCP-GFP)
 - ii) MCP sprzężone z czerwoną fluorescencją (MCP-mCherry).

Zarówno białko PCP jak o MCP mają zdolność specyficznego wiązania odpowiednich motywów, odpowiednio: PCP i MS2 (rycina 11) które zostały wbudowane w konstrukty sgRNA jako element rusztowań RNA (materiały 7.1.). Zastosowanie wielokrotnie powtórzonych sekwencji tzw. „hairpinów” w obrębie każdego rusztowania umożliwia wielokrotną rekrutację znaczników fluorescencyjnych do pojedynczego miejsca docelowego znacząco poprawia czułość detekcji i zwiększa stosunek sygnału do szumu.

W kolejnym etapie komórki zostały poddane dodatkowej transdukcji wektorem kodującym katalitycznie nieaktywną formę dCas9 umożliwiającą lokalizację wybranych

sekwencji genomowych poprzez wiązanie z odpowiednio zaprojektowanymi cząsteczkami sgRNA. Dzięki zastosowaniu dwóch odrębnych rusztowań RNA z których każda zawiera inny zestaw struktur hairpin (rozpoznawanych odpowiednio przez PCP lub MCP) możliwa jest równoczesna wizualizacja dwóch różnych punktów docelowych które odpowiadają np. dwóm kotwicom pętli chromatynowej w obrębie badanego *locus*. Taka konfiguracja umożliwia bezpośrednią obserwację zmienności odległości przestrzennej między kotwicami pętli w czasie rzeczywistym oraz analizę wpływu obecności lub braku CTCF na dynamikę ich oddziaływań (rycina 11).



Rycina 11: Schematyczne przedstawienie działania systemu CRISPR-Sirius.

Każde z zaprojektowanych sgRNA zostało dobrane w taki sposób, aby specyficznie rozpoznawać określoną sekwencję docelową w genomie. W przedstawionym układzie jeden z zestawów sgRNA zawartym w specjalnie zaprojektowanym rusztowaniu RNA kieruje do sekwencji kotwicy 5' pętli CTCF-CTCF natomiast drugi do kotwicy pętli 3'. Oba rusztowania zawierają oktametr specjalnie zaprojektowanych struktur typu hairpin. Po związaniu sgRNA z docelową sekwencją genomową kompleksy są stabilizowane przez dCas9. W tym czasie struktury hairpin pozostają odsłonięte co umożliwia ich rozpoznanie przez odpowiednie białka wirusowe sprzężone z fluoroforami: i) PCP sprzężone z GFP oraz ii) MCP sprzężone z mCherry.

4.1. Projektowanie i konstrukcja narzędzia do wizualizacji kotwic pętli w czasie rzeczywistym

System wizualizacji zaprojektowano w taki sposób aby umożliwić jednoczesne znakowanie dwóch kotwic pętli CTCF-CTCF w obrębie *locus Celf4*. Sekwencję odpowiadającą kotwicy 5' (chr18:26,014,299 - 26,015,177) ukierunkowałam za pomocą zestawu sgRNA sprzężonych z rusztowaniem rozpoznawanym przez białko fuzyjne MCP-mCherry, natomiast kotwicę 3' (chr18:28,078,028 - 28,079,060) przy użyciu sgRNA rozpoznawanego przez PCP-GFP.

Aby uzyskać wystarczająco silny sygnał fluorescencyjny, zaprojektowałam po 10 sgRNA dla każdej z kotwic co umożliwiło rekrutację wielu kompleksów zawierających białko fluorescencyjne do wybranych regionów genomu. Każdy zestaw sgRNA został połączony z odpowiednim rusztowaniem RNA umożliwiającym specyficzne wiązanie się z odpowiadającym mu białkiem znacznikowym.

4.2. Projektowanie i konstrukcja wirusów eksprymujących wybrane białka

Klonowanie sekwencji kodującej białko fluorescencyjne RFP do wektora pHage-MCP. Na podstawie przeglądu literatury oraz przeprowadzonych testów na komórkach HEK zdecydowano się na klonowanie sekwencji mCherry do wektora zawierającego MCP wykorzystując dostępne konstrukty z bazy Addgene. Celem tej modyfikacji było uzyskanie bardziej specyficznego i jednoznacznego sygnału fluorescencyjnego w dalszych analizach.

4.2.1. Trawienie restrykcyjne plazmidu pHage-N22-RFPnls

Pierwszym krokiem było trawienie restrykcyjne komercyjnego wektora pHage-N22-RFP. Po przeprowadzeniu cięcia uzyskano fragment zawierający potrójną kopię insertu RFP (x3). Dokładny skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli nr. 31.

Tabela 31: Skład mieszaniny reakcyjnej w celu pozyskania insertu:

Odczynnik	Objętość
XbaI	5 U
BamHI	5 U
Bufor CutSmart	2,0 µl
pHage - N22-RFP	3 000 ng
Woda	40 µl

4.2.2. Trawienie restrykcyjne plazmidu pHAGE-EFS-MCP-3xBFPnls

Pierwszym etapem było przeprowadzenie trawienia restrykcyjnego komercyjnego wektora pHage-MCP-BFP. Proces ten pozwolił na wycięcie całego fragmentu

odpowiadającego „szkieletowi plazmidu” zwanego w dalszej części jako wektor, czyli plazmidu pozbawionego sekwencji kodującej BFP. Uzyskany w ten sposób wektor został przygotowany do dalszych etapów klonowania. Dokładny skład mieszaniny ligacyjnej przedstawiono w tabeli nr. 32.

Tabela 32: Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do uzyskania docelowego wektora.

Odczynnik	Objętość
XbaI	10 U
BamHI	10U
Bufor CutSmart	4,0 µl
pHage-MCP-BFP	3 000 ng
Woda	Do 40 µl

4.2.3. Elektroforeza i izolacja fragmentów z żelu agarozowego

Tabela 33: Wycięte fragmenty DNA.

Fragment	Długość [pz]
RFP (wstawka)	2202
pHage-MCP (wektor)	6500

Fragmenty DNA wyizolowane z żelu oczyściłam za pomocą kulek magnetycznych

4.2.4. Oczyszczanie DNA

Po rozdiale elektroforetycznym w żelu agarozowym fragmenty DNA zostały wyizolowane przy użyciu zestawu *GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit* zgodnie z instrukcją producenta.

W celu zwiększenia wydajności ligacji uzyskane fragmenty poddano dodatkowemu oczyszczaniu wykorzystując zestaw *Mag-Bind® TotalPure NGS* zgodnie z zaleceniami producenta (ratio przy elucji 1,8).

4.2.5. Ligacja wektoru pHage-MCP z wstawką RFPx3

Reakcję przeprowadzono w temperaturze pokojowej w czasie 15 minut. Szczegóły mieszaniny ligacyjnej przedstawiono w tabeli nr. 34.

Tabela 34: Skład mieszaniny ligacyjnej.

Odczynnik	Objętość
T4 ligaza DNA	0,5 µl
Bufor do ligazy T4	1,0 µl
Wstawka: RFPx3	50,80 ng
wektor: pHage - MCP	50 ng
Woda	Do 10 µl

4.2.6. Transformacja komórek bakteryjnych mieszaniną ligacyjną

Po zakończeniu reakcji ligacji, powstałe konstrukty plazmidowe zostały wykorzystane do transformacji wcześniej przygotowanych bakterii kompetentnych szczepu NebStable. Proces ten umożliwił namnażanie zrekombinowanego DNA oraz selekcję pozytywnych klonów zawierających pożądany insert. Szczegółowy przebieg procedury transformacji oraz selekcji antybiotykowej, został opisany wcześniejszej części pracy.

4.2.7. Weryfikacja poprawności klonowania przez trawienie restrykcyjne

Reakcję przeprowadzono na bloku grzewczym w 37°C przez 1,5 godziny. Szczegółowy skład mieszaniny ligacyjnej przedstawiono w tabeli nr. 35. Analizę długości otrzymanych fragmentów wykonano za pomocą podziału elektroforetycznego w żelu agarozowym. Załadowano po 5 µl próbki na dołek.

Tabela 35: Skład mieszaniny do kontrolnego trawienia trawienia enzymem PvuII

Odczynnik	Objętość
Enzym PvuII	0,4 µl
DNA	400ng
Bufor CutSmart	1,0 µl
Woda	Do 10 µl

5. Nadekspresja wybranych białek w komórkach ES i NS.

5.1. Produkcja wektora lentiwirusowego umożliwiającego ekspresję białek.

Produkcja wektora ekprymującego docelowe białka i) dCas9-blast ii) PCP-GFP iii) MCP-mCherry została przeprowadzona zgodnie ze standardowym protokołem, z zastosowaniem odczynnika Viral Boost reagent , w celu zwiększenia efektywności produkcji wirusa.

Dzień przed transfekcją komórki HEK293T wysiano na szalki Petriego o średnicy 10 cm. w gęstości pozwalającej na osiągnięcie około 70 - 80% konfluencji następnego dnia co stanowi optymalne warunki do przeprowadzenia transfekcji.

W dniu transfekcji przygotowano 3 mieszaniny reakcyjne mieszaninę plazmidów w medium Opti-Mem w którym każda zawierała:

- jeden wektor lentiwirusowy kodujące białko docelowe:
 - i) pHage-dCas9-Blast
 - ii) pHage-PCP-mBFPx3nls
 - iii) pHage-MCP-mCherryx3nls, w ilości końcowej 10 µg
- plazmid pakujący psPAX2 w ilości końcowej 5 µg
- plazmid kodujący białko osłonowe VSVG (pMD2.G), w ilości końcowej 5 µg

Następnie do każdej mieszaniny zawierającej *Lipofectamine 2000* w buforze *Opti-MEM* dodano *Viral Boost* reagent w rozcieńczeniu 1:1000 względem końcowego stężenia w medium. Kompleksy DNA z odczynnikami inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, a następnie dodano do komórek.

Komórki inkubowano w warunkach standardowych (37°C, 5% CO₂) przez 72 godziny. Supernatant zawierający wirusa zbierano dwukrotnie: pierwszy raz po 48 godzinach, a następnie po upływie 72 godzin od momentu transfekcji. W celu zwiększenia efektywności transdukcji wirus został skoncentrowany z użyciem *Lenti-X Concentrator* zgodnie z zaleceniami producenta, a następnie przechowywany w -80°C. Zastosowanie odczynnika *Viral Boost* umożliwiło zwiększenie wydajności transfekcji, bez wywoływania toksyczności charakterystycznej dla polikationów, takich jak Polybrene.

5.2. Transdukcja lentiwirusowa komórek ES i NS

Transdukcję komórek ES i NS przeprowadzano z wykorzystaniem tak zwanej metody spinfekcji. Komórki wysiewano na płytki hodowlane 6-dołkowe pokryte 0,2% żelatyną w gęstości 125 000 komórek na 9,5 cm², dla komórek ES oraz 500 000 komórek na 9,5 cm², dla komórek NS.

W celu optymalizacji warunków transdukcji dla komórek NS zastosowano dwa warianty eksperymentalne:

- **pierwszy** obejmował komórki przyczepione do podłoża (500 000 komórek wysianych dzień wcześniej),
- **drugi** to komórki zawieszone, nieprzyczepione do podłoża (również w liczbie 500 000 komórek na dołek).

Następnego dnia medium hodowlane wymieniano na świeże odpowiednie dla danego typu komórek a następnie dodawano Polybrene w końcowym stężeniu 10 µg/ml.

Po inkubacji z *Polybrene* do hodowli dodawano zawiesinę lentiwirusową w różnych stężeniach:

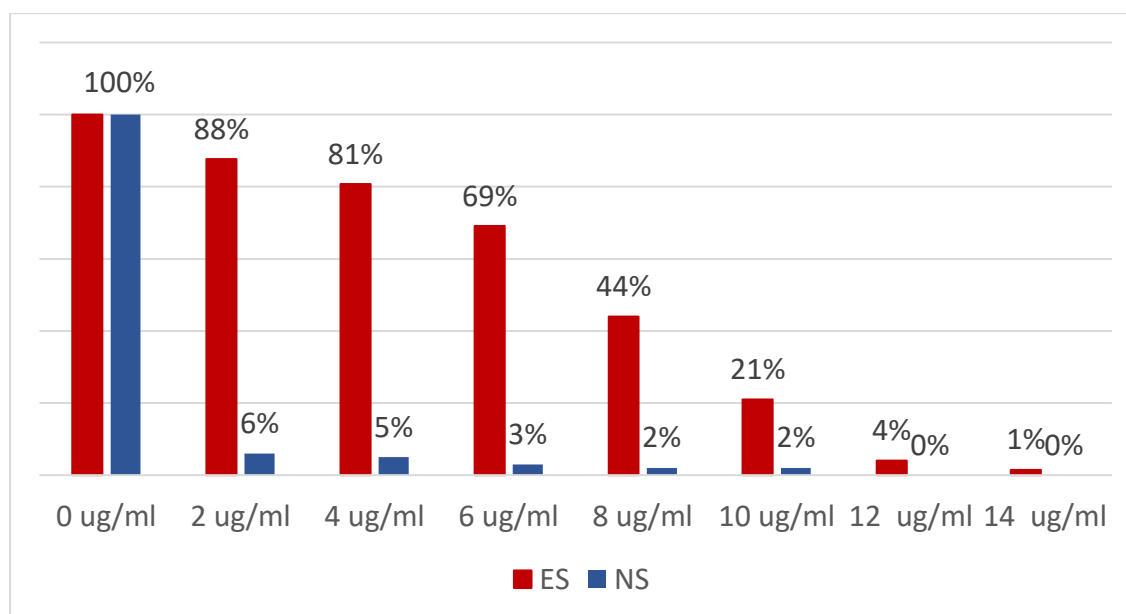
- dla komórek ES stosowano standardową dawkę wirusa 20 µl zawiesiny odpowiadającej 1/10 objętości końcowej pozyskanej z jednej szalki Petriego,
- dla komórek NS testowano trzy różne stężenia wirusa:
 - wysokie: odpowiadające 1/6 objętości wirusa z jednej szalki,
 - standardowe: 1/10 objętości z jednej szalki,
 - niskie: 1/40 objętości z jednej szalki Petriego.

Płytkę hodowlano szczelnie owinięto parafilmem, by medium nie wyparowało podczas wirowania (spinfekcji), a następnie wirowano przez 1 godzinę 30 minut w temperaturze 30°C przy obrotach . Po wirowaniu do hodowli dodano 1 ml świeżego medium hodowlanego i hodowano w inkubatorze przeznaczonym do GMO klasy 2. Po 48 godzinach zmienione medium hodowlane na świeże. Gdy populacja komórek osiągnęła konfluencję 90% wysortowano komórki o odpowiedni znacznik selekcyjny (mCherry lub BFP) za pomocą cytometrii przepływowej lub traktowania antybiotykiem.

5.3. Oznaczenie toksycznego poziomu blastycydyny

W celu określenia minimalnego stężenia blastycydyny niezbędnego do skutecznej selekcji komórek ES i NS linii CTCF^{HALO} po transfekcji wektorem lentiwirusowym produkującym białko dCas9-Blast, przeprowadzono test cytotoksyczności. Do hodowli komórek ES oraz hodowli komórek NS dodano blastycydynę w stężeniach: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 14 µg/ml. Pierwszego dnia po rozpoczęcia selekcji wymieniono pożywkę utrzymując obecność antybiotyku. Drugiego dnia od zaczęcia selekcji antybiotykiem, komórki zostały zebrane i policzone w celu monitorowania przeżywalności. Zaobserwowano znaczną śmierć komórek przy stężeniu: 14 µg/ml dla komórek ES i 2 µg/ml dla komórek NS co pozwoliło określić tę wartość jako wystarczającą do dalszej selekcji NS.

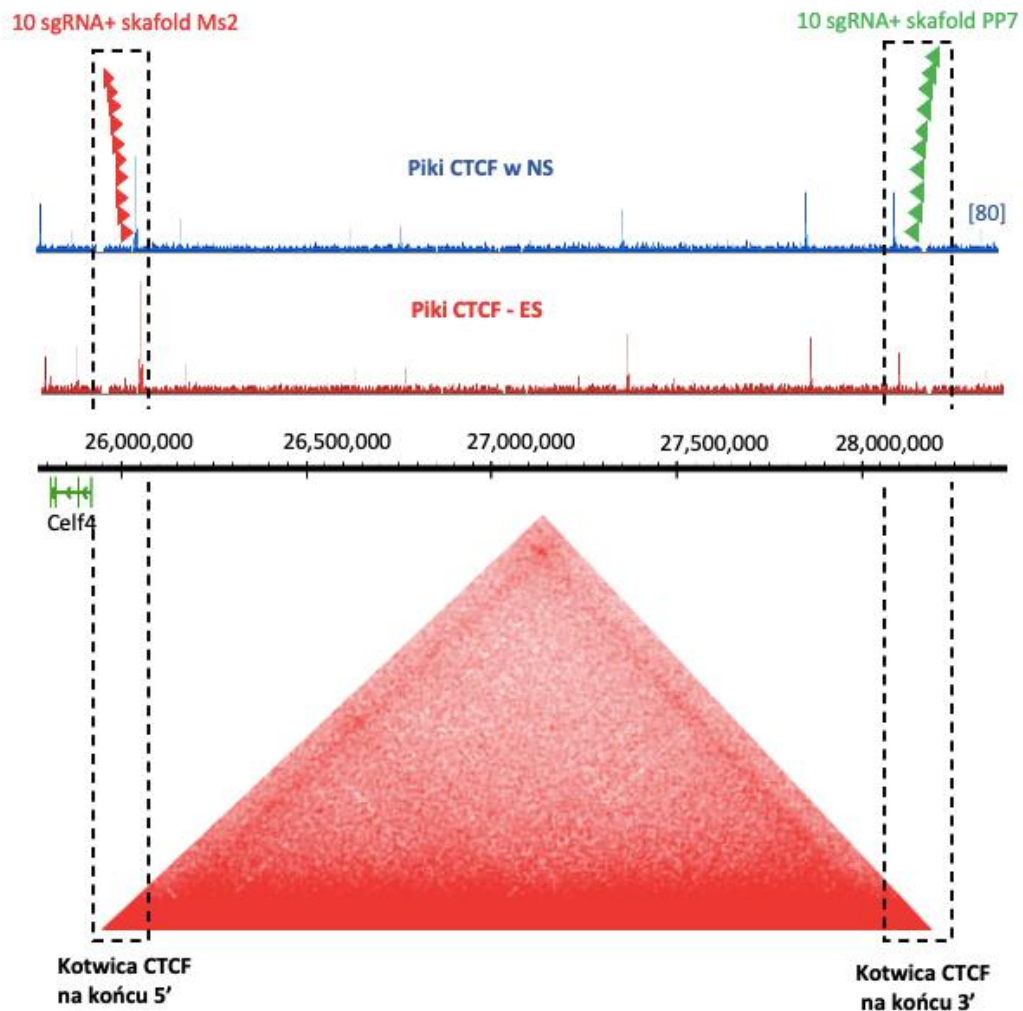
Wykres 1: Wykres przeżywalności komórek w zależności od stężenia blastycydyny.



6. Projektowanie i konstrukcja wektorów zawierających sgRNA

Do konstrukcji wektorów wykorzystałam strategię CARGO (z ang. *Chimeric Array of gRNA Oligonucleotides*) (Gu et al., 2018) co pozwoliło mi na złożenie wszystkich sgRNA w ramach pojedynczego wektora ekspresyjnego w jednym etapie klonowania. W efekcie uzyskałam dwa niezależne wektory zawierające zestaw sgRNA skierowany do jednej

z kotwic pętli przy *locus Celf4* co umożliwiło ich równoczesną wizualizację w komórkach żywych (rycina 12).



Rycina12: System wizualizacji kinetyki pętli CTCF-CTCF w locus *Celf4* oparty na specyficznym znakowaniu sgRNA.

Wycinek mapy Hi-C przedstawiający interakcje w locus *Celf4* (trójkątna struktura) z zaznaczonymi miejscami docelowymi dla 10 sgRNA skierowanych na kotwice pętli CTCF-CTCF.

W celu umożliwienia jednoczesnego znakowania wielu miejsc w określonym regionie genomu zastosowano system CARGO z ang. *Chimeric Array of gRNA Oligonucleotides* (Gu et al., 2018). Technologia ta pozwala na szybkie i efektywne klonowanie wielu sgRNA do jednego wektora. Takie podejście znacząco zwiększa skuteczność rekrutacji

kompleksów dCas9-RNA w komórkach wzmacniając tym samym sygnał fluorescencyjny niezbędny do wizualizacji struktur chromatynowych.

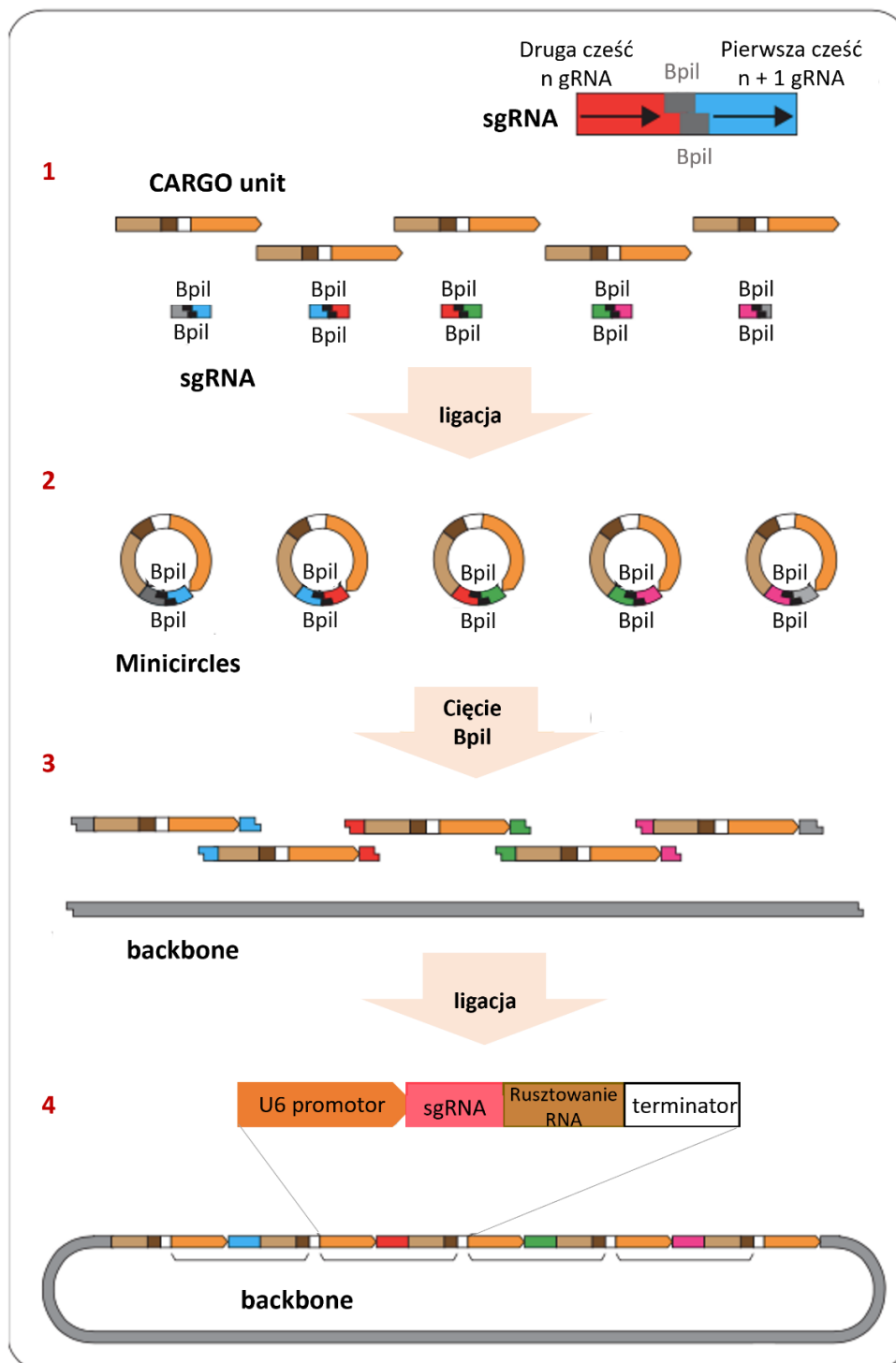
System CARGO wykorzystuje syntetyczne oligonukleotydy złożone z kolejnych jednostek sgRNA które można złożyć w trakcie jednej procedury klonowania. Kluczowym elementem tej metody jest zastosowanie struktur zwanych *minicircle* (rycina 13, pkt 2), czyli krótkich fragmentów DNA zawierających sgRNA połączone z odpowiednimi rusztowaniami RNA rozpoznawane przez białka fuzyjne: MCP-mCherry czy PCP-GFP.

Dzięki zastosowaniu enzymów restrykcyjnych, np. Bpil, oraz ligazy DNA, możliwe jest seryjne i kierunkowe składanie tych fragmentów w jedną wstawkę zawierającą nawet kilkanaście unikalnych sgRNA (rycina 13).

Kluczowe etapy metody CARGO obejmują:

1. Hybrydyzację oraz fosforylację zaprojektowanych oligonukleotydów sgRNA
2. Tworzenie tzw. struktur minicycles, czyli ligację zhybrydizowanych sgRNA z jednostkami CARGO oraz oczyszczanie produktu z form liniowych,
3. Złożenie plazmidu końcowego z użyciem enzymu Bpil i ligazy DNA, umożliwiającą integrację modułu serii sgRNA z wektorem px-filler.

Dzięki tej strategii możliwe jest precyzyjne i jednoczesne znakowanie wielu miejsc w genomie, zachowanie wysokiej specyficzności i skuteczności wiązania dCas9 do DNA, istotne zwiększenie stosunku sygnału do szumu, a także zmniejszenie liczby koniecznych transfekcji, co przekłada się na mniejsze obciążenie komórkowe i większą powtarzalność eksperymentów.



Rycina 13: Schemat składania wektora zawierającego wiele powtarzających sekwencji z zastosowaniem metody CARGO.

Schemat ilustruje etapy składania wektora z wykorzystaniem metody CARGO. Końcowym produktem procedury jest plazmid zawierający sekwencję specjalnie zaprojektowanych rusztowań (scaffoldów), z których każde wiąże unikalne, kierunkujące sgRNA. Schemat został opracowany na podstawie publikacji Gu et al, 2018. Podpisy graficzne przetłumaczono na język polski, przy zachowaniu kluczowej terminologii technicznej w języku angielskim.

W niniejszej pracy metoda CARGO została wykorzystana do skonstruowania wektorów zawierających serię rusztowań RNA z unikalnymi cząsteczkami sgRNA. Wektory te stanowiły element systemu wizualizacji, umożliwiające jednocześnie znakowanie dwóch kotwic pętli CTCF-CTCF w *locus Celf4* poprzez zaprojektowanie oddzielnych zestawów po 10 sgRNA dla każdej z nich. Zestawy te zostały połączone z odpowiednimi rusztowaniami RNA i zintegrowane z wektorami kompatybilnymi z systemem CRISPR-Sirius.

Chociaż pierwotnym celem było jednoczesne oznaczenie obu kotwic (5' i 3'), jedynie kotwica 5' wykazała wystarczającą intensywność i stabilność sygnału fluorescencyjnego, pozwalającą na wiarygodną analizę obrazów mikroskopowych. Pomimo tego ograniczenia opracowany system pozwolił na uzyskanie specyficznego i powtarzalnego sygnału w czasie rzeczywistym w żywych komórkach, umożliwiając wizualizację zachowania wybranego regionu chromatyny.

6.1. Projektowanie oligonukleotydów umożliwiającą wizualizację kotwic pętli w czasie rzeczywistym

Na podstawie sekwencji genomowej *locus Celf4* zaprojektowano po 10 sgRNA dla każdej z dwóch kotwic pętli CTCF-CTCF: **i)** Kotwica 5': chr18:26,014,299-26,015,177, **ii)** Kotwica 3': chr18:28,078,028-28,079,060.

Każde sgRNA zostało zaprojektowane z uwzględnieniem wysokiej specyficzności wobec docelowego regionu oraz minimalizacji potencjalnych niespecyficzných miejsc wiązania. Oligonukleotydy do każdej z kotwic zaprojektowano tak aby zawierały zarówno sekwencję kierującą ok 20 nukleotydów (nt), jak i stałe elementy niezbędne do ligacji w systemie CARGO: **i)** miejsca restrykcyjne dla Bpil oraz **ii)** kompatybilne końce integracji z rusztowaniem RNA-MCP lub PCP).

6.2. Fosforylacja i hybrydyzacja wybranych oligonukleotydów

Zaprojektowane startery zsyntetyzowano jako jednoniciowe ssDNA (Eurofins, 100 μ M). Następnie każdą parę oligonukleotydów poddano hybrydyzacji i fosforylacji. W tym celu przygotowano mieszaninę reakcyjną zgodnie z poniższą tabelą nr.36.

Tabela 36: Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji fosforylacji i hybrydyzacji oligonukleotydów.

Odczynnik	Objętość
Sense oligo (100 μ M)	1 μ l
Antisense oligo (100 μ M)	1 μ l
T4 DNA ligase buffer (10x)	1 μ l
Polynucleotide kinase (PNK)	0,5 μ l
H ₂ O	6,5 μ l

Reakcję przeprowadziłam w termocyklerze według następującego programu:

- 37°C przez 30 minut (fosforylacja),
- 98°C przez 5 minut,
- ramp - 0,1°C/s do 16°C (hybrydyzacja),
- następnie inkubacja w 16°C.

6.3. Przygotowanie zmodyfikowanych jednostek CARGO

Przygotowanie wstawek zawierających jednostki CARGO polegało na enzymatycznym trawieniu plazmidów pUC19-PP7 oraz pUC19-MS2 (GeneWiz). Celem tego etapu było wyizolowanie samej wstawki (zmodyfikowanej jednostki CARGO do dalszych etapów konstrukcji plazmidu docelowego wykorzystywanego do przyżyciowej wizualizacji *loci*.

Tabela 37: Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia plazmidów pUC19 enzymem BsmBI.

Odczynnik	Ilość
plazmid	3 000 ng
BsmBI -HF	10 U
NEBuffer rCutSmart (10x)	2 µl
woda	do 20 µl

Reakcja była przeprowadzona w 37°C przez godzinę. Wycięty fragment został oczyszczony z żelu agarozowego przy użyciu zestawu do ekstrakcji DNA.

6.4. przygotowanie wektora docelowego.

W celu przygotowania wektora do dalszego klonowania, przeprowadzono trawienie plazmidu px-filler z użyciem enzymów restrykcyjnych AflIII-HF i XbaI-HF. Reakcję trawienia wykonano w objętości 20 µl. Reakcję prowadzono w 37°C przez 1 godzinę.

Tabela38: Skład reakcji trawienia plazmidu px-filler enzymami AflIII i XbaI.

Odczynnik	Ilość
Plazmid px-filler	3 000 µg
AflIII-HF	10 U
XbaI-HF	10 U
NEBuffer rCutSmart (10x)	2 µl
H ₂ O	do 20 µl

Strawiony fragment plazmidu (wektor) został wyizolowany z żelu agarozowego przy użyciu zestawu *Agarose-Out DNA Purification kit* zgodnie z instrukcją producenta.

6.5. Tworzenie struktur minicircle sgRNA

Każdy z fosforylowanych i zhybrydowanych oligonukleotydów został połączony z fragmentem jednostki CARGO w reakcji ligacji.

Tabela 39: Skład mieszaniny ligacyjnej do tworzenia struktur minicircle sgRNA

Odczynnik	Ilość
Rozcieńczony sgRNA 1:50	2 µl
Jednostka CARGO	100-250 ng
Bufor do Ligazy DNA T4 (10x)	1 µl
Ligaza DNA T4	0,5 µl
H ₂ O	do 10 µl

Mieszaniny reakcyjne inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej a następnie oczyszczono je z liniowego DNA, stosując zestaw *Plasmid Safe Exonuclease*. Reakcje prowadzono w temperaturze 37°C przez 1 godzinę.

6.6. Ligacja wektora px-filler z jednostkami CARGO zawierającymi sgRNA

W końcowym etapie konstrukcji wektora, złożone struktury minicircle zawierające sgRNA zostały połączone z przygotowanym wektorem w reakcji ligacji z udziałem enzymu restrykcyjnego Bpil oraz ligazy DNA.

Podczas tej procedury ligacji następuje seryjne, kierunkowe składanie wieloelementowych jednostek CARGO w pojedynczym wektorze końcowym px-filler. Powstały produkt stanowi kompletny plazmid zawierającą zestaw wielu funkcjonalnych jednostek CARGO przeznaczonych do jednoczesnej ekspresji w komórkach.

Tabela 40: Skład Mieszaniny ligacyjnej do końcowej ligacji minicircle zawierających sgRNA z wektorem px-filler.

Odczynnik	Ilość
Mieszanina Minicircle	10 fmol każdy
Wektor: px-filler	5 fmol
ATP	25mM
DTT	0,1 M
Tango buffer (10x)	1 µl
T7 DNA ligase	5 U
Bpil	10 U
H ₂ O	do 20 µl

Reakcję przeprowadzono w termocyklerze według poniższego programu:

- 37°C przez 5 minut,
 - 20°C przez 5 minut,
- przez 50 cykli
- Zatrzymanie reakcji w temp. 4°C.

Mieszaninę poreakcyjną oczyszczono z niezligowanych fragmentów za pomocą zestawu *Plasmid Safe* zgodnie z zaleceniami producenta.

6.7. Transformacja i walidacja

Transformowałam 4 µl oczyszczonej mieszaniny do kompetentnych bakterii *E.coli* szczepu NebStable, a następnie posiałam je na selektywne podłoże z antybiotykiem. Po inkubacji przez noc wyselekcjonowałam 10 kolonii, które przesiałam do hodowli płynnej.

Z hodowli bakteryjnych wyizolowałam plazmidowe DNA za pomocą zestawu *MiniPrep*, a jego stężenie oraz czystość oznaczyłam spektrofotometrycznie. W celu weryfikacji poprawności konstruktu wybrane kolonie poddałam analizie restrykcyjnej z użyciem enzymów restrykcyjnych.

7. Wizualizacja

7.1. Przygotowanie komórek do wizualizacji

Pierwszym etapem przygotowania komórek do eksperymentu wizualizacji było wysianie ich w gęstości 200 000 komórek na sektor o powierzchni 3,14 cm², w naczyniu przeznaczonym do wizualizacji o szklanym dnie. Po 24 godzinach od wysiania, transfekcję przeprowadzano zgodnie z protokołem Lipofectamine2000. Mieszaninę przygotowywano w objętości 20 µl medium Opti-MEM, dodając 1,2 µg plazmidowego DNA oraz 1,5 µl odczynnika Lipofectamine. Po inkubacji kompleksów DNA z odczynnikiem, mieszaninę nanoszono na komórki i inkubowano w warunkach standardowych (37°C, 5% CO₂).

7.2. Obrazowanie

Obrazowanie komórek przeprowadzono 24 godziny po transfekcji, przy użyciu mikroskopu konfokalnego *Zeiss Cell Discoverer 7* z modułem LSM. Nagrania potwierdzające ruch *loci* przeprowadzono w trybie confocal z wykorzystaniem obiektu PLAN-APO 50x.1,2 *WATER Auto-immersion*. Komórki ES były utrzymywane w warunkach 37 °C i atmosferze 5 % CO₂. Nagrania typu time-lapse prowadzono przez 5 minut wykonując serię zdjęć co 500 ms (2 klatki na sekundę). Każdy punkt czasowy obejmował stack osi-Z, aby uchwycić całkowitą objętość komórki. Obrazy rejestrowano w kanałach dla mCherry (ex.561 nm) i GFP (ex. 488 nm), przy rozdzielczości 512 x 512 px z ustawieniem uśredniania linii (*line averaging*) x2 dla poprawy stosunku sygnału do szumu. W trakcie eksperymentu włączono opcję autofocusu, aby zminimalizować dryf w osi Z oraz przesunięcia obrazu wynikające z niestabilności położenia próbki.

7.3. Obróbka obrazów mikroskopowych

Wszystkie obrazy zostały obrobione w programie Fiji z zachowaniem zasady nienaruszalności danych surowych zastosowano jedynie opcje globalne takie jak: ustawienia Z-Stack (max intensity, brightness/contrast) i każdorazowo wykonywano je jednakowo dla całej serii zdjęć. Surowe dane zostały zachowane a ustawienia jasności i kontrastu zostały dostosowane jedynie do poprawy widoczności sygnału, bez utraty informacji. Nie stosowano lokalnych zmian.

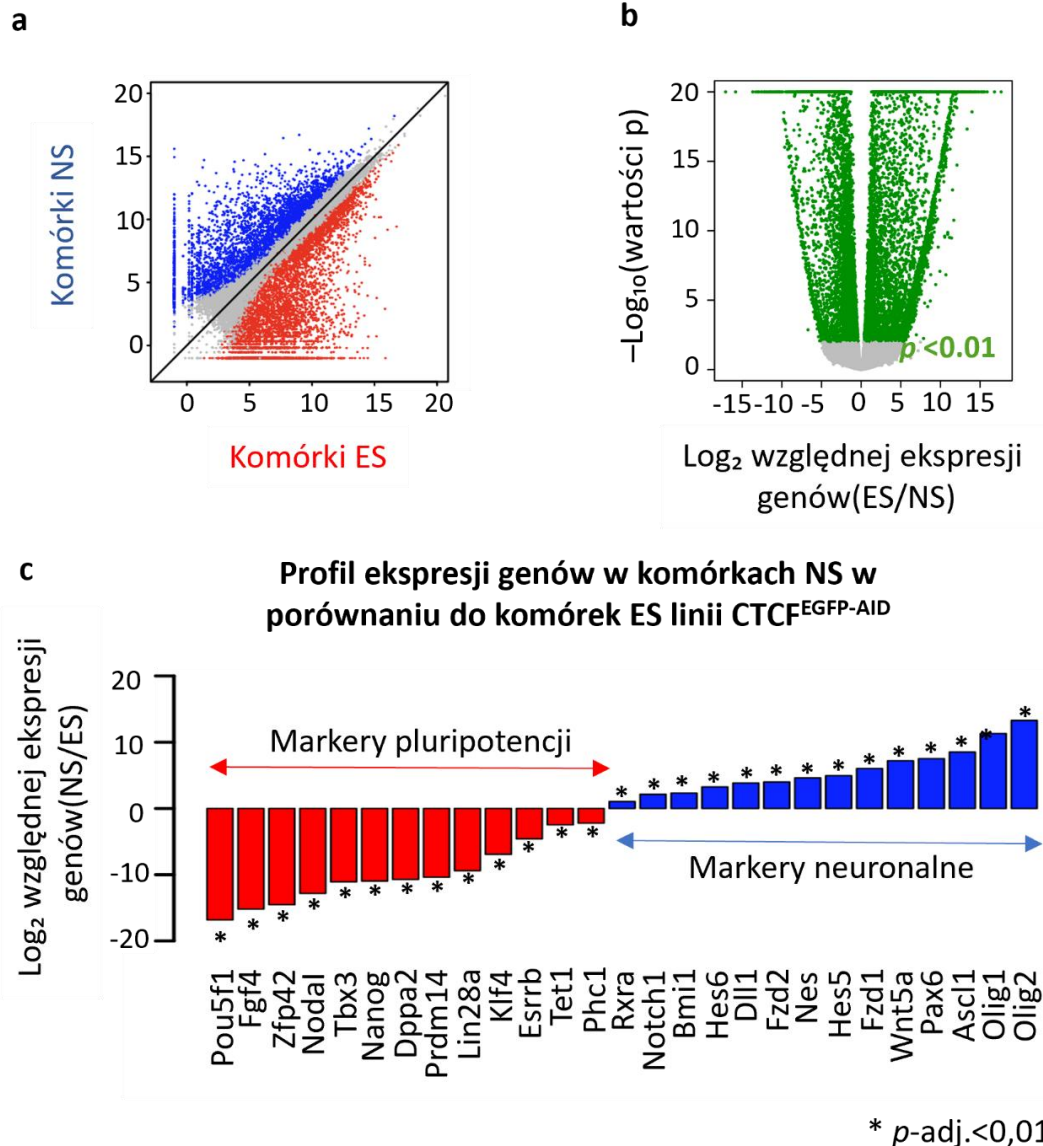
WYNIKI

Część I Analiza wpływu CTCF w regulacji ekspresji genów różnicowania

1. Rola CTCF w regulacji ekspresji genów

W celu zrozumienia komórkowo-specyficznej roli CTCF w regulacji ekspresji genów wykorzystano linię komórkową CTCF^{EGFP-AID}. Różnicowanie komórek ES do komórek NS pozwoliło uzyskać wysoce jednorodną populację co umożliwia dokładną analizę dynamicznych zmian transkryptomu i architektury genomu zachodzących w trakcie przejścia od stanu pluripotentnego do neuronalnego. Podejście to pozwala na ocenę wpływu CTCF zarówno na globalną organizację chromatyny, jak i na komórkowo-specyficzną ekspresję genów dostarczając wglądu w mechanizmy dzięki którym izolatory chromatyny uczestniczą w regulacji tożsamości komórkowej.

Tożsamość obu populacji komórek potwierdziły analizy porównawcze RNA-seq (rycina 14 a,b). Komórki ES wykazywały się zwiększoną aktywnością *loci* kodujących czynniki ważne dla utrzymania pluripotencjalnego charakteru tych komórek, takich jak *Pou5f1* (czyli *Oct4*) czy *Nanog*. Natomiast, komórki NS cechowały się znacząco podwyższoną ekspresją markerów neuronalnych komórek macierzystych, takich jak *Pax6* czy *Hes5*, przy jednoczesnym znaczącym obniżeniu ekspresji markerów pluripotencji (rycina 14c).

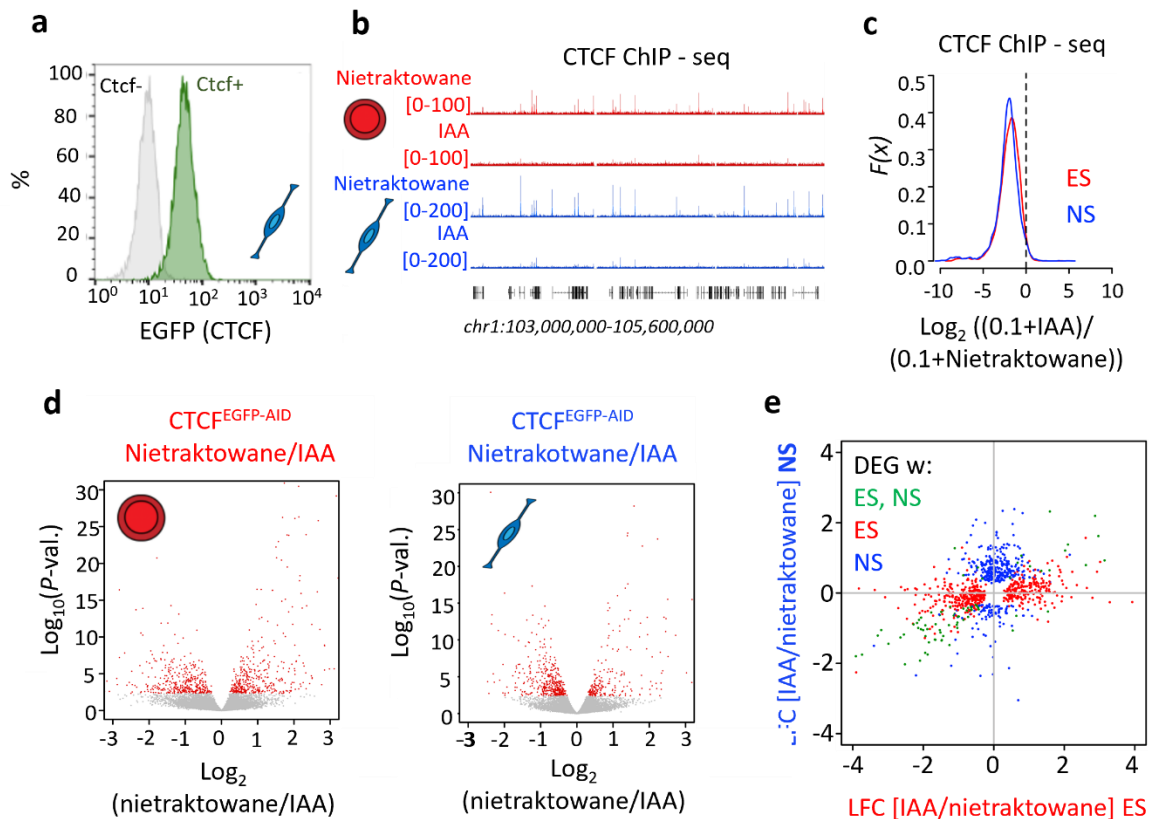


Rycina 14: Walidacja poprawności różnicowania komórek ES do NS linii CTCF^{EGFP-AID}

- Wykres rozrzutu przedstawiający porównanie poziomów ekspresji genów między komórkami ES i NS na podstawie danych RNA-seq z linii CTCF^{AID-EGFP}. Każdy punkt reprezentuje pojedynczy gen. Dane zostały znormalizowane przy użyciu pakietu DESeq2. Geny silniej ekspresjonowane w komórkach ES zaznaczono kolorem czerwonym, natomiast geny o wyższej ekspresji w komórkach NS kolorem niebieskim.
- Wykres wulkaniczny do analizy DESeq2, w celu identyfikacji genów o różnej ekspresji po indukcji komórek ES do NS linii CTCF^{EGFP-AID}. Na zielono zaznaczono geny o istotnie zmienionej ekspresji ($p < 0,1$), natomiast na szaro geny dla których zmiany ekspresji nie były istotne statystycznie ($p \geq 0,1$).
- Panel przedstawia lncRNA wskazane przez (Saldaña-Meyer et al. 2019) jako wchodzące w interakcję z CTCF dla których oceniono zmiany ekspresji podczas różnicowania komórek ES do NS. Analiza została przeprowadzona na transkryptomach, czyli kompletnych zbiorach RNA obecnych w komórkach w danym

momencie. Analiz wykonano na komórkach ES i NS linii z zastosowaniem metody DESeq2 (* $p < 0,1$).

W obu typach komórek linii CTCF^{EGFP-AID} usunęłam białko CTCF uzyskując efektywność deplecji rzędu 96% w komórkach ES i 80% w komórkach NS (rycina. 15 a-c). Za pomocą analizy RNA-seq przeprowadzonej w komórkach ES i NS w warunkach kontrolnych oraz po traktowaniu IAA bioinformatycy z laboratorium zidentyfikowali 1 250 genów różnicowo-ekspymowanych (DEG; $p\text{-adj.} < 0,1$, metoda *DESeq2*), których ekspresja została zmieniona w wyniku utraty CTCF. Zmienioną ekspresją charakteryzowało się: 775 **(54,8% z 1250)** genów w komórkach ES, oraz 556 **(39,38% z 1250)** genów w komórkach NS. Zdecydowanie mniejszą część stanowiły geny dotknięte utratą CTCF w obu typach komórek w liczbie 81 genów **(5,73% z 1250)**. ID genów są zawarte w „tabeli rozszerzonej nr 2” w publikacji: „RNA binding proteins mediate the maturation of chromatin topology during differentiation” której jestem współ-pierwszym autorem (Dehingia B, Milewska-Puchała M, et al., 2025), opublikowanej w *Nature Cell Biology*.



Rycina 15: CTCF moduluje ekspresję genów w sposób specyficzny dla typu komórki.

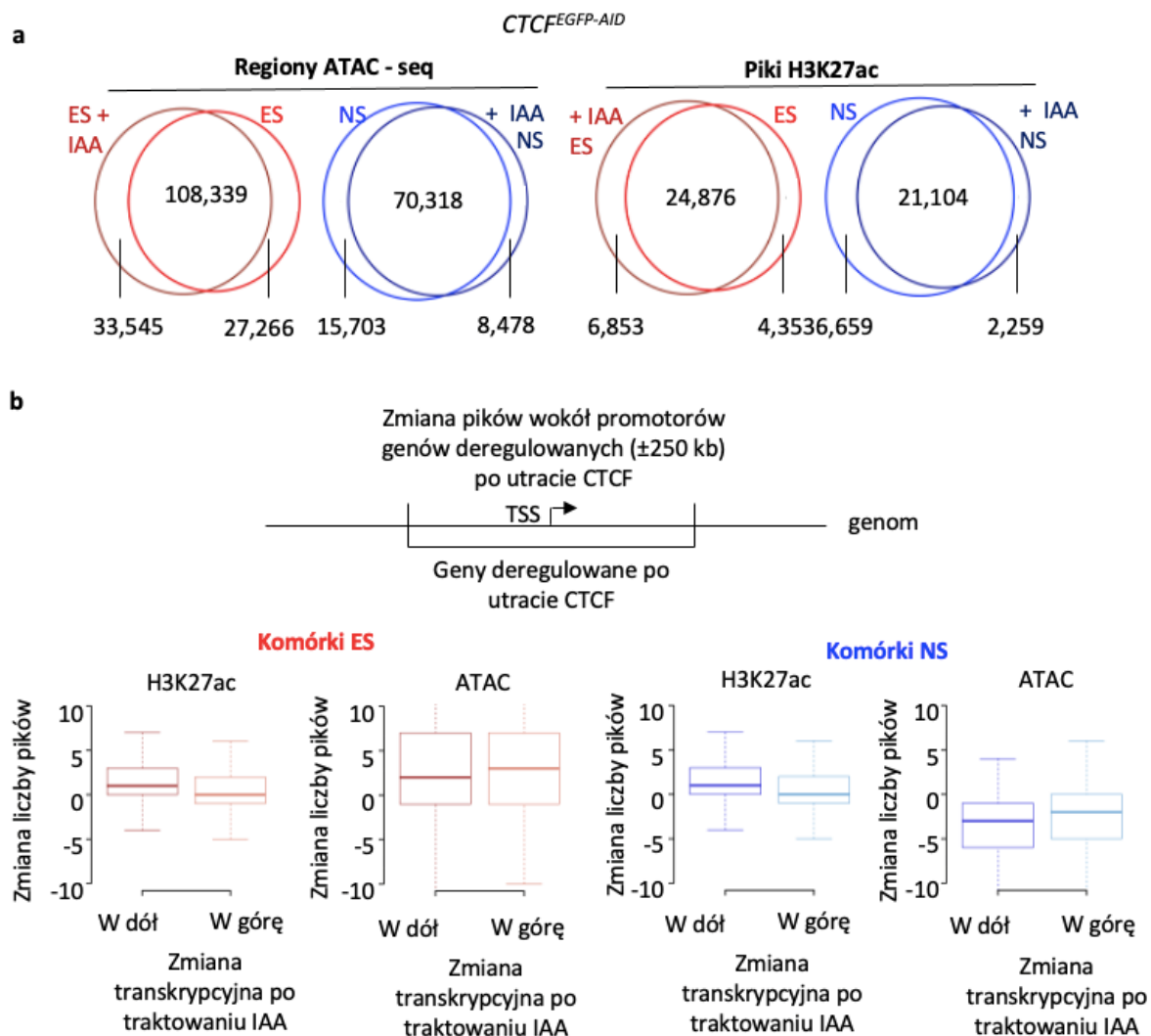
- a. Usunięcie białka CTCF w komórkach NS CTCF^{EGFP-AID}. Intensywność sygnału EGFP informuje o poziomie białka CTCF przed i po traktowaniu IAA. Intensywność sygnału EGFP była mierzona za pomocą cytometrii przepływowej.
- b. Analiza profilu wiązania białka CTCF do DNA metodą ChIP-seq w komórkach ES i NS linii CTCF^{EGFP-AID} traktowanych i nietraktowanych IAA. Poziom wiązania białka CTCF został oszacowany w komórkach w warunkach kontrolnych oraz w komórkach po traktowaniu IAA.
- c. Log₂-krotna zmiana sygnału białka CTCF po traktowaniu IAA w komórkach ES i NS linii CTCF^{EGFP-AID}. Uwzględniono współrzędne pików (miejsc wiązania) białka CTCF w warunkach kontrolnych. Znormalizowany sygnał RPGC zintegrowano wokół szczytów pików (+/- 50 par zasad) w komórkach traktowanych i nietraktowanych. Większość miejsc wiązania białka CTCF traci sygnał białka CTCF w wyniku po traktowaniu IAA.
- d. Wykres wulkaniczny analizy DESeq2 na podstawie danych RNA-seq komórek ES i NS linii CTCF^{EGFP-AID} traktowanych i nietraktowanych IAA. Na czerwono zaznaczono geny o istotnie zmienionej ekspresji ($p\text{-adj.} < 0,1$), natomiast na szaro geny, dla których zmiany ekspresji nie były istotne statystycznie ($p\text{-adj.} \geq 0,1$).
- e. Porównanie efektów transkrypcyjnych po usunięciu białka CTCF w komórkach ES i NS (log₂-krotna zmiana ekspresji genu została obliczona przy użyciu metody DESeq2). Uwzględniono DEG, które zostały zidentyfikowane w co najmniej jednym porównaniu ($p\text{-adj.} < 0,1$). Czerwony: geny zmieniające aktywność tylko w ES; niebieski: tylko w NS; zielony: statystycznie istotna zmiana w obu typach komórek.

1.1. Funkcje izolacyjne CTCF determinują zmiany transkrypcyjne

Aby ustalić co przyczynia się do deregulacji genów po utracie białka CTCF w pierwszej kolejności przeanalizowałam profil aktywności promotorów i wzmacniaczy w komórkach ES i NS. Zastosowałam analizę ChIP-seq dla cało genomowego zmapowania obecności modyfikacji H3K27ac oraz analizę otwartości chromatyny metodą ATAC-seq, którą na moich komórkach przeprowadziła Aleksandra Piotrowska - techniczka w laboratorium.

Obie metody wykazały jedynie niewielkie zmiany w profilach aktywności chromatyny po traktowaniu IAA zarówno w komórkach ES jak i NS. Wyniki te wskazują, że usunięcie CTCF nie wpływa istotnie na globalną aktywność CRE (rycina 16).

Łączna analiza danych z RNA-seq, ATAC-seq i ChIP-seq przedstawionych w tej pracy doktorskiej silnie sugeruje, że obserwowane zmiany w ekspresji genów w obu typach komórek (ES i NS) są prawdopodobnie konsekwencją utraty funkcji izolacyjnych czynnika CTCF. Efekty transkrypcyjne zaobserwowane po traktowaniu IAA wynikają więc przede wszystkim z perturbacji architektury chromatyny spowodowanej funkcjonalnym czynnikiem CTCF.



Rycina 16: Usunięcie białka CTCF nie przyczynia się do istotnych zmian w ogólnej aktywności elementów regulatorowych.

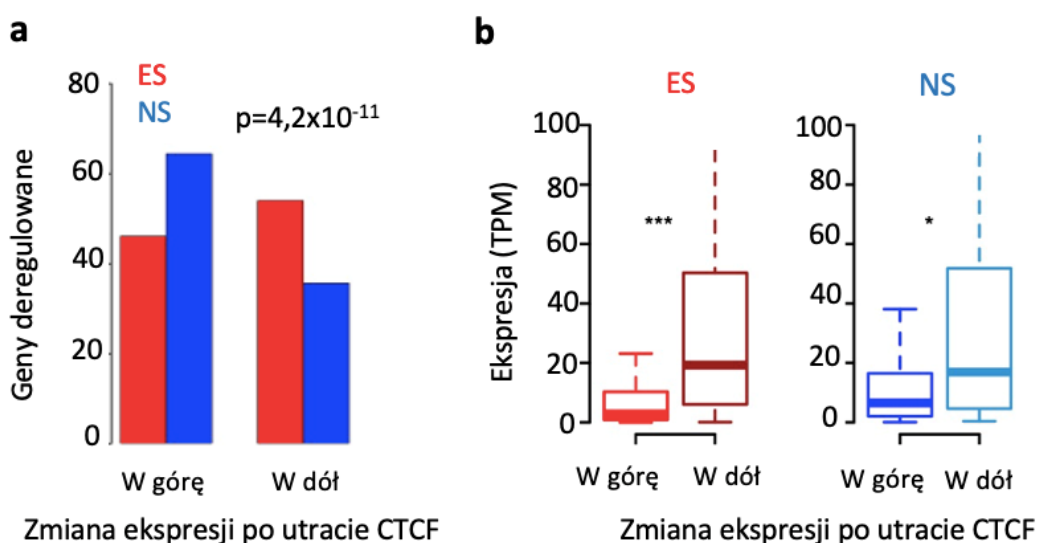
a) Diagramy Venna porównują zbiór pików zidentyfikowanych w komórkach kontrolnych (nieotraktowanych IAA) i komórkach traktowanych IAA. Usunięcie białka CTCF, nie prowadzi do zmian w otwartości chromatyny, zbadanej przy użyciu metody ATAC-seq (lewy panel) i aktywacji elementów regulatorowych zbadanej analizą H3K27ac ChIP-seq (prawy panel).

Wykresy pudełkowe przedstawiające liczbę pików (odpowiednio H3K27ac i ATAC-seq) po usunięciu białka CTCF, w odstępach 500 kbp skupionych wokół miejsca czasu transkrypcji (z ang. Transcription Start Site).

b) genów deregulowanych po traktowaniu IAA w komórkach ES (zaznaczone kolorem czerwonym) i NS (zaznaczone kolorem niebieskim).

1.2. Zyskanie funkcji CTCF jako izolatora po utracie pluripotencji

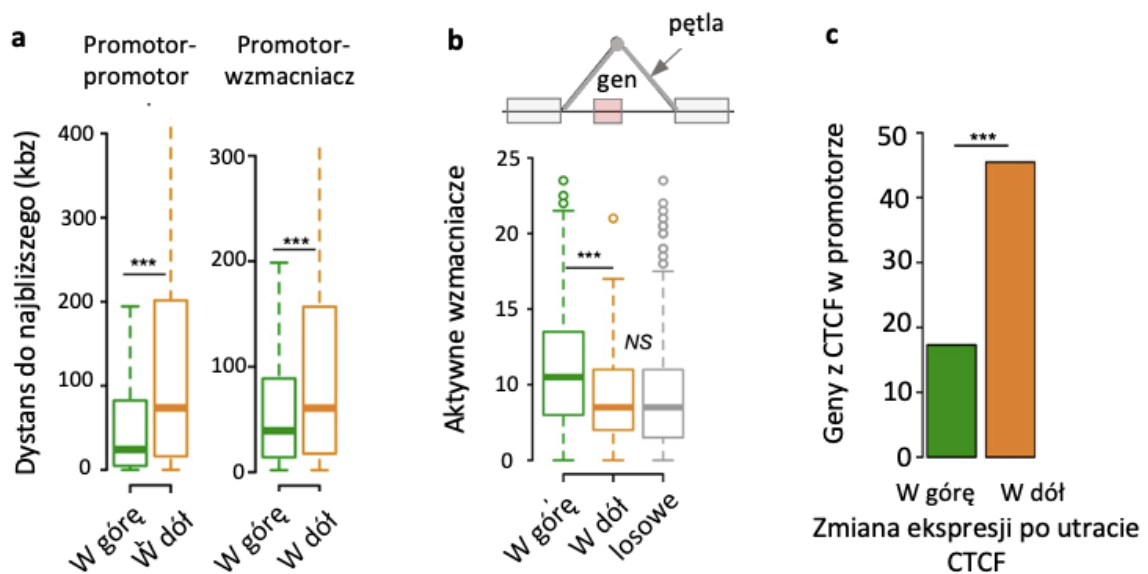
Porównując geny deregulowane wskutek usunięcia białka CTCF w komórkach ES i NS, zaobserwowałam wyraźny trend zmian ekspresji zależny od typu komórkowego. W komórkach ES dominowały geny z obniżoną ekspresją po traktowaniu IAA podczas gdy w komórkach NS większa liczba genów wykazała podwyższoną ekspresję po utracie CTCF (rycina 17, $p = 4,2 \times 10^{-11}$, test Fishera). W puli genów deregulowanych w obu typach komórek na 81 genów po traktowaniu IAA większość z nich (**73%**) wykazywała spadek ekspresji po utracie CTCF podobnie jak miało to miejsce w komórkach ES.



Rycina 17: Utrata CTCF prowadzi do odmiennych zmian ekspresji genów w zależności od stanu różnicowania komórki.

- Usunięcie białka CTCF w komórkach NS (zaznaczone kolorem niebieskim) prowadzi częściej do wzmocnienia ekspresji genów niż jej obniżenia, natomiast w komórkach ES (zaznaczone kolorem czerwonym) utrata białka CTCF prowadzi głównie do obniżenia ekspresji genów. Geny o różnicowym poziomie aktywności między komórkami w warunkach kontrolnych, a traktowanymi IAA zostały zidentyfikowane przy użyciu metody DESeq2 ($p\text{-adj.} < 0,1$)
- Wykres pudełkowy znormalizowanego poziomu ekspresji transkryptu na milion par sekwencjonowanych odczytów (TPM) genów, których ekspresja jest deregulowana po utracie białka CTCF w komórkach ES (zaznaczone kolorem czerwonym) i NS (zaznaczone kolorem niebieskim).

W celu znalezienia trendu determinującego deregulację genów po indukcji neuronalnej zależnej od czynnika CTCF porównałam geny o podwyższonej ekspresji w komórkach NS w warunkach kontrolnych i traktowanych IAA. Geny, których ekspresja została wzmocniona pod wpływem utraty białka CTCF charakteryzowały się krótszymi odległościami genomowymi od siebie (test Kołmogorowa-Smirnowa; $p = 3,4 \times 10^{-7}$; rycina 18) oraz od najbliższych aktywnych wzmacniaczy (test Kołmogorowa-Smirnowa $p = 5,4 \times 10^{-4}$; rycina 18a). Dodatkowo promotory genów, których ekspresja wzrastała po utracie białka CTCF znajdowały się w obrębie domen pętli które były flankowane przez większą liczbę wzmacniaczy (rycina 18b; dwustronny test T, $p = 6 \times 10^{-6}$). Ponadto geny o podwyższonej ekspresji po traktowaniu IAA w komórkach NS charakteryzowały się dwukrotnie mniejszą częstością wiązania białka CTCF w swoim promotorze w porównaniu do genów, których ekspresja uległa obniżeniu (dokładny test Fishera, $p = 2,4 \times 10^{-6}$; rycina 18c).



Rycina 18: Zmiany w funkcjonalności czynnika CTCF podczas różnicowania.

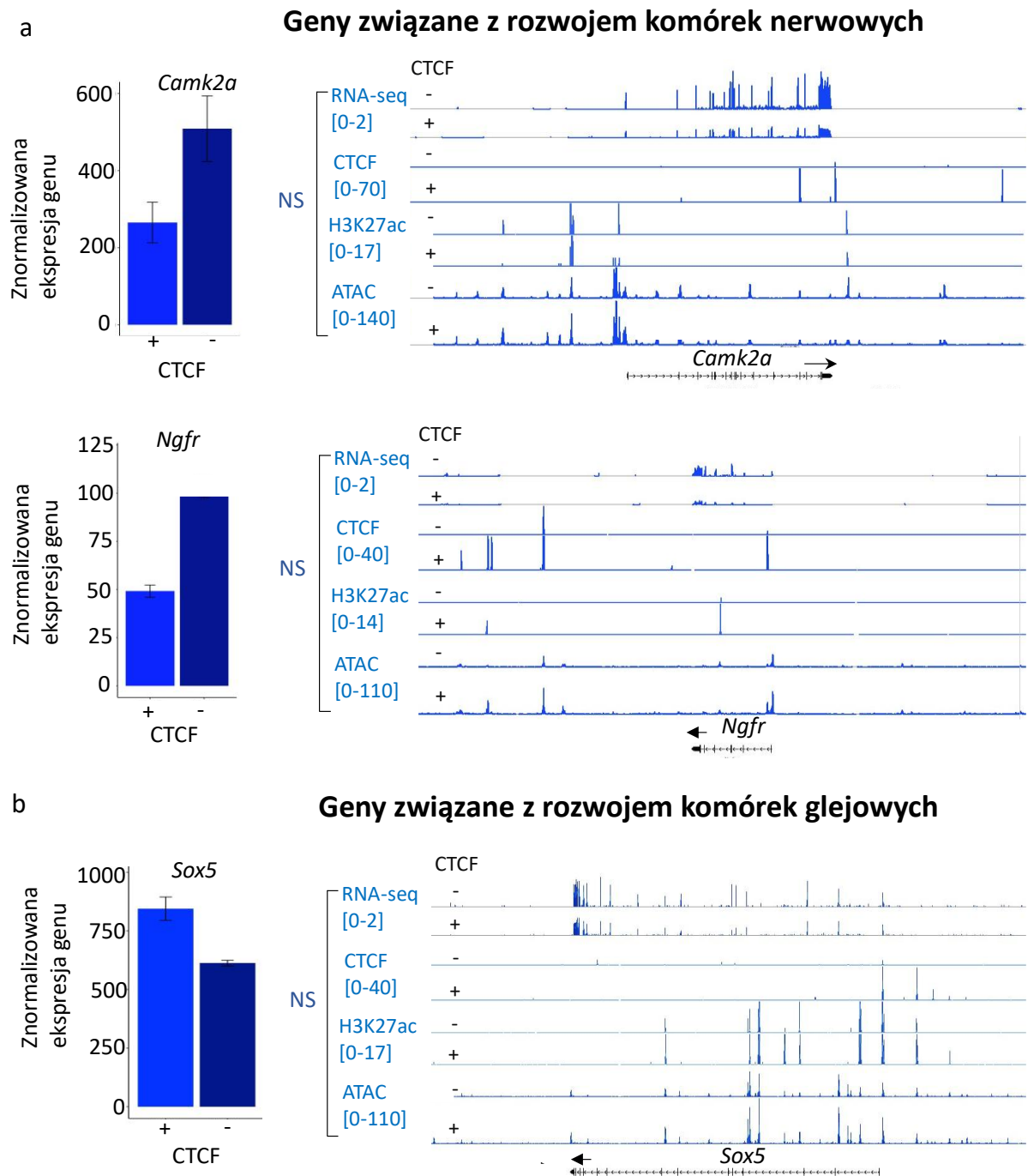
- Wykres pudełkowy przedstawia znormalizowaną odległość fizyczną w genomie (wyrażoną w kilo parach zasad, kpb) dla genów, których ekspresja ulega deregulacji po utracie białka CTCF w komórkach NS w górę (oznaczone kolorem zielonym) lub w dół (oznaczone kolorem pomarańczowym). Zaobserwowano, że geny, których promotory znajdują się bliżej siebie lub aktywnych wzmacniaczy, wykazują zwiększoną ekspresję w komórkach NS linii CTCF^{EGFP-AID} po traktowaniu IAA.
- Wykres pudełkowy przedstawia zależność między zmianami ekspresji genów a obecnością aktywnych wzmacniaczy po traktowaniu IAA) w komórkach NS. Geny, których ekspresja wzrosła, są częściej powiązane z aktywnymi wzmacniaczami niż geny o obniżonej ekspresji. Wzmacniacze zdefiniowano na podstawie sygnałów ATAC-seq i H3K27ac zlokalizowanych poza regionami promotorowymi. Analiza objęła domeny pętli zawierające geny deregulowane lub losowo wybrane regiony genomu. Adnotacja pętli została oparta na istniejących już danych Hi-C (komórki NS pozyskane in vitro z komórek ES linii E14 (Bonev et al., 2017c)).
- Wykres kolumnowy ilustrujący procent genów, których ekspresja jest deregulowana po traktowaniu IAA w komórkach NS i które jednocześnie mają miejsce wiązania CTCF w swoim promotorze.

Jednym z głównych objawów utraty jednego z alleli kodujących gen *CTCF* u człowieka jest opóźnienie rozwojowe i deficyt intelektualny. Analiza ontologii genów deregulowanych w komórkach NS wykazała, że nagłe usunięcie białka CTCF prowadzi do zwiększonej ekspresji genów związanych z różnicowaniem komórek w kierunku neuronalnym (GO:0030154, $p = 2,9 \times 10^{-2}$). Przykładami takich genów są między innymi: Receptor czynnika wzrostu nerwów (*Ngfr*) (rycina 16a), neuronalny receptor pentraksyny (*Nptxr*), gen dehydrogenazy aldehydowej 1, członek rodziny $\alpha 3$ (*Aldh1a3*). Geny związane z gęstością postsynaptyczną (GO:0014069, $p = 2,2 \times 10^{-2}$) w tym kinaza białkowa II alfa zależna od wapnia (*Camk2a*) (rycina 19a), czy Neureksyna-1 (*Nrpn1*). Geny te są związane z aktywnością neuronalną i przewodzeniem bodźców, czyli procesami które mają miejsce na późniejszych etapach rozwoju oraz funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Moje dane sugerują więc, że właściwa dawka białka CTCF jest kluczowa dla prawidłowej synchronizacji tranzycji rozwojowych. Obniżenie ilości białka CTCF prowadzi do przedwczesnej aktywacji genów neuronalnych w komórkach macierzystych.

Co ciekawe, grupa genów o obniżonej ekspresji zawierała geny kodujące białka adhezyjne komórek ($N = 28$, GO:0007155, $p = 1,2 \times 10^{-10}$), głównie kadheryny ($N = 21$, $p = 3,5 \times 10^{-24}$). Co istotne, rola czynnika CTCF w regulacji *loci* kodujących protokadheryny została szeroko opisana w literaturze. Otóż CTCF jest kluczowym białkiem organizującym strukturę chromatyny w dużych klastrach genów kodujących protokadheryny (*Pcdh α* , *Pcdh β* , *Pcdh γ*). Jego główna funkcja polega na kotwiczeniu pętli chromatynowych, które umożliwiają kontakt pomiędzy pojedynczymi promotorami *Pcdh* a wspólnymi wzmacniaczami znajdującymi się poza klastrem genów. Dzięki stochastycznemu tworzeniu pętli między miejscami wiązania CTCF w promotorach *Pcdh* a wzmacniaczem, możliwa jest izoformowo-specyficzna, losowa ekspresja protokadheryn w neuronach (Golan-Mashiach et al., 2012; Y. Guo et al., 2012; Hirayama et al., 2012; Monahan et al., 2012). Sugeruje to bezpośrednią rolę białka CTCF w nawiązywaniu kontaktów między promotorami i wzmacniaczami.

Szersza analiza ontologii wykazała, że geny związane z tożsamością gleju takie jak *Sox5* wykazywały obecność białka CTCF w obrębie promotorów lub wzmacniaczy, oraz często wykazywały spadek ekspresji po delecji CTCF (rycina 19b). W tym przypadku,

analogicznie do sytuacji w *loci* kodującym protokadheryny, czynnik CTCF może pełnić rolę kotwicy sprzyjającej interakcjom między elementami regulatorowymi.



Rycina 19: Utrata białka CTCF koreluje ze wzrostem ekspresji genów neuronalnych

Rycina przedstawia ścieżki RNA-seq, CTCF ChIP-seq; H3K27ac-seq i ATAC seq linii dla CTCF i H3K27ac CTCF^{EGFP-AID} komórek NS po traktowaniu IAA (zaznaczone jako **CTCF-**) oraz w warunkach kontrolnych (zaznaczone jako **CTCF+**) w obrębie 3 wybranych loci.

a. Dwa pierwsze geny: *Camk2a* oraz *Ngfr* są związane z rozwojem komórek nerwowych oraz wykazują wyraźną zwiększoną ekspresję po traktowaniu IAA wyłącznie w komórkach NS.

b. Gen *Sox5* jest charakterystyczny dla komórek dojrzewających w kierunku glejowym wykazuje spadek ekspresji po traktowaniu IAA w komórkach NS.

Spośród genów które zidentyfikowałam tylko 5,73 % uległo deregulacji pod wpływem utraty białka CTCF zarówno w komórkach ES jak i NS (rycina 15e). Geny wykazujące deregulację w obu typach komórek to *loci* które regulują:

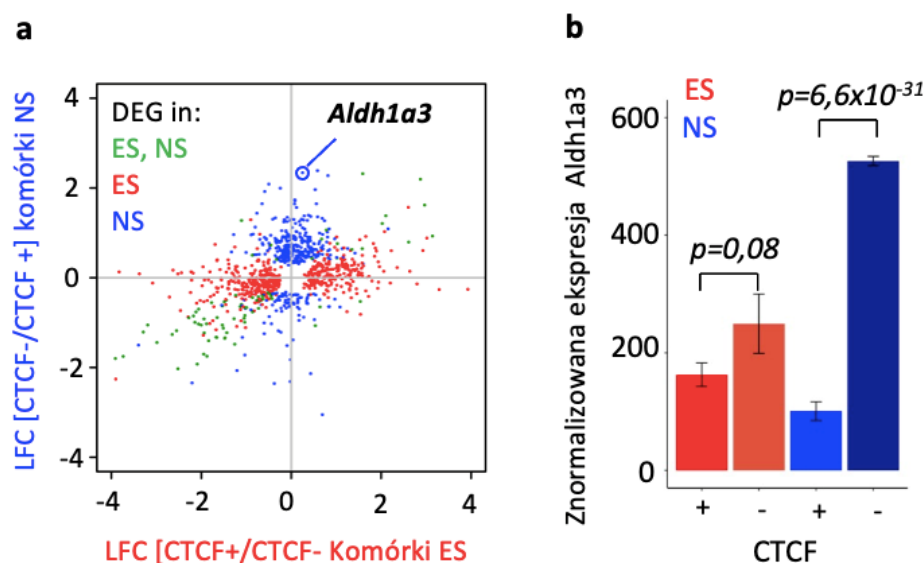
- i) aktywność i funkcjonowanie mitochondrium
- ii) wiązanie jonów
- iii) aktywność genów
- iv) adhezję komórkową,
- v) organizację cytoszkieletu.

W trakcie rozwoju mózgu komórka pnia nerwowego generuje najpierw neurony. Następnie, pod wpływem tak zwanego przełączenia neuronalno-glejewego komórka ta generuje astrocyty i oligodendrocyty czyli komórki gleju. Mechanizmy molekularne tego zjawiska są bardzo słabo poznane. Moje odkrycia mocno sugerują istotną rolę czynnika CTCF w sterowaniu decyzjami rozwojowymi komórki pnia nerwowego i udział tego czynnika w kluczowych przejściach rozwojowych komórek NS. Dalsze badania będą konieczne aby lepiej zrozumieć jaki jest dokładnie wkład białka CTCF we wczesny rozwój mózgu.

1.3. Utrata pluripotencji komórki wzmacnia rolę CTCF jako izolatora

Zrozumienie w jakich kontekstach czynnik CTCF pełni funkcję izolatora jest kluczowe nie tylko dla dokładnego poznania jego roli w organizacji chromatyny, lecz także dla szerszego zrozumienia mechanizmów regulacji transkrypcji genów. W związku z tym, w dalszej części pracy skupiłam się na analizie genów ulegających represji po utracie białka CTCF wyłącznie w komórkach NS. Jednym z przykładów ilustrujących komórkowo-specyficzny wpływ białka CTCF na regulację ekspresji genów jest gen *Aldh1a3* kodujący dehydrogenazę aldehydową 1 z rodziny A3. Gen *Aldh1a3* odgrywa znaczącą rolę w rozwoju układu nerwowego szczególnie w kontekście różnicowania przez udział w regulacji beztlenowej glikolizy (Lange et al., 2016). Jego ekspresja jest istotnie związana z metabolizmem komórek nerwowych oraz ich zdolnością do tworzenia neurosfer (La Rosa et al., 2016). Ekspresja *Aldh1a3* po utracie CTCF jest wzmocniona

w komórkach NS. CTCF nie ma wpływu na poziom aktywności tego *locus* w komórkach ES (rycina 20 a, b).



Rycina 20: Komórkowo-specyficzny wpływ czynnika CTCF na ekspresję genu *Aldh1a3*

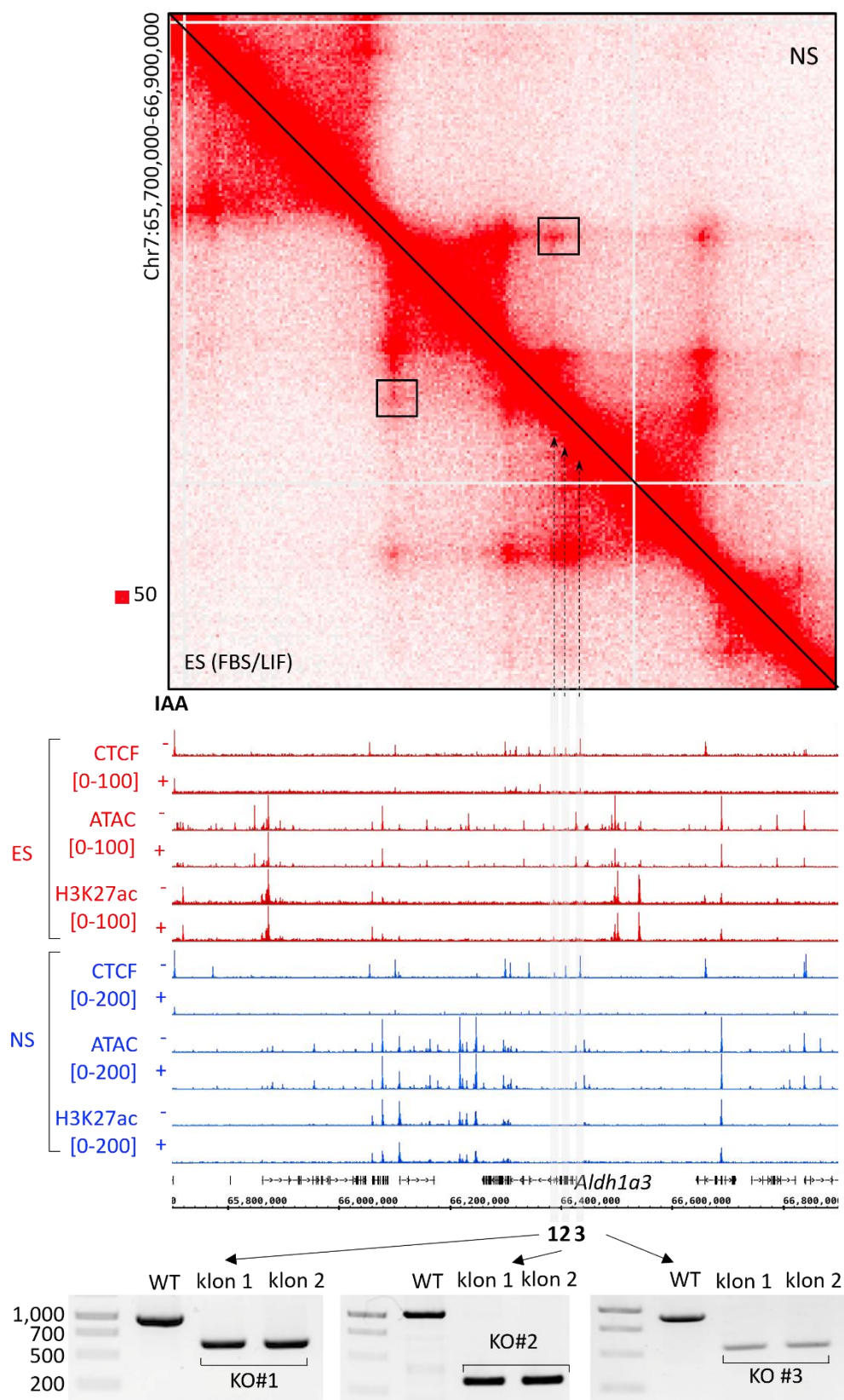
a. Wykres punktowy przedstawiający wszystkie geny deregulowane w komórkach ES i NS po traktowaniu IAA. Na wykresie wskazano *Aldh1a3* jako gen deregulowany w górę, tylko w komórkach NS (zaznaczony kolorem niebieskim).

b. Wykres kolumnowy pokazujący ekspresję genu *Aldh1a3* na podstawie analizy RNA-seq w komórkach ES (zaznaczone kolorem czerwonym) i NS (zaznaczone kolorem niebieskim) linii CTCF^{EGPF AID} w warunkach kontrolnych i traktowanych IAA. Wartości *p* uzyskano metodą DESeq2.

Na podstawie danych CTCF ChIP-seq (ta praca, Dehingia, [Milewska-Puchala](#), et al., 2025) oraz wcześniej opublikowanych danych Hi-C (Bonev et al., 2017c), zidentyfikowałam, iż *Aldh1a3* znajduje się w domenie wyznaczonej przez kotwice pętli CTCF-CTCF, które są wyraźnie wzmocnione po indukcji neuronalnej komórek ES do komórek NS. Dane z analizy CTCF ChIP-seq pozwoliły w zidentyfikowaniu trzech miejsc wiązania białka CTCF blisko promotora genu *Aldh1a3* (rycina 20). Dodatkowo analiza wspomnianych już danych map Hi-C (Bonev et al., 2017c) sugerowała, że miejsca wiązania białka CTCF #1 i #2 pełniły funkcje architektoniczne jako kotwice pętli CTCF-CTCF, w przeciwieństwie do #3 miejsce wiązania białka CTCF (rycina 20).

Używając CRISPR-Cas9, usunęłam każde z trzech miejsc wiązania białka CTCF w komórkach ES uzyskując po dwie homozygotyczne linie klonalne dla delekcji każdego miejsca wiązania białka CTCF w *locus Aldh1a3* (rycina 21). Poprawność każdej z trzech

delecji potwierdziłam na poziomie genomowym za pomocą reakcji PCR (rycina 20, panel dolny).



Rycina 21: Utrata pluripotencji prowadzi do wzmocnienia pętli architektonicznych.

Podczas indukcji neuronalnej komórek ES do komórek NS dochodzi do wzmocnienia pętli CTCF-CTCF w locus Aldh1a3 (górny panel: mapy Hi-C (Bonev et al., 2017b).

Ścieżki CTCF ChIP-seq, ATAC-seq oraz H3K27ac ChIP-seq (panel środkowy) wskazują, że globalne usunięcie CTCF nie wpływa istotnie na aktywność lokalnych elementów regulatorowych w obrębie genu Aldh1a3.

Analiza danych CTCF ChIP-seq pozwoliła na identyfikację miejsc wiązania CTCF (oznaczonych jako szare pola), które mogą potencjalnie wpływać na ekspresję genu Aldh1a3. Każde z tych miejsc zostało indywidualnie usunięte w komórkach ES za pomocą systemu CRISPR-Cas9.

Poprawność delecji potwierdzono na poziomie genomowym metodą PCR (panel dolny: zdjęcia żeli).

W celu określenia wpływu poszczególnych miejsc wiązania CTCF w *locus Aldh1a3* na regulację ekspresji tego genu podczas wczesnego rozwoju neuronalnego, komórki ES z delecją miejsca CTCF (#1, #2 lub #3) zostały zróżnicowane do komórek NS a następnie przeprowadzono analizę poziomu transkryptu *Aldh1a3* metodą qPCR w obu typach komórek.

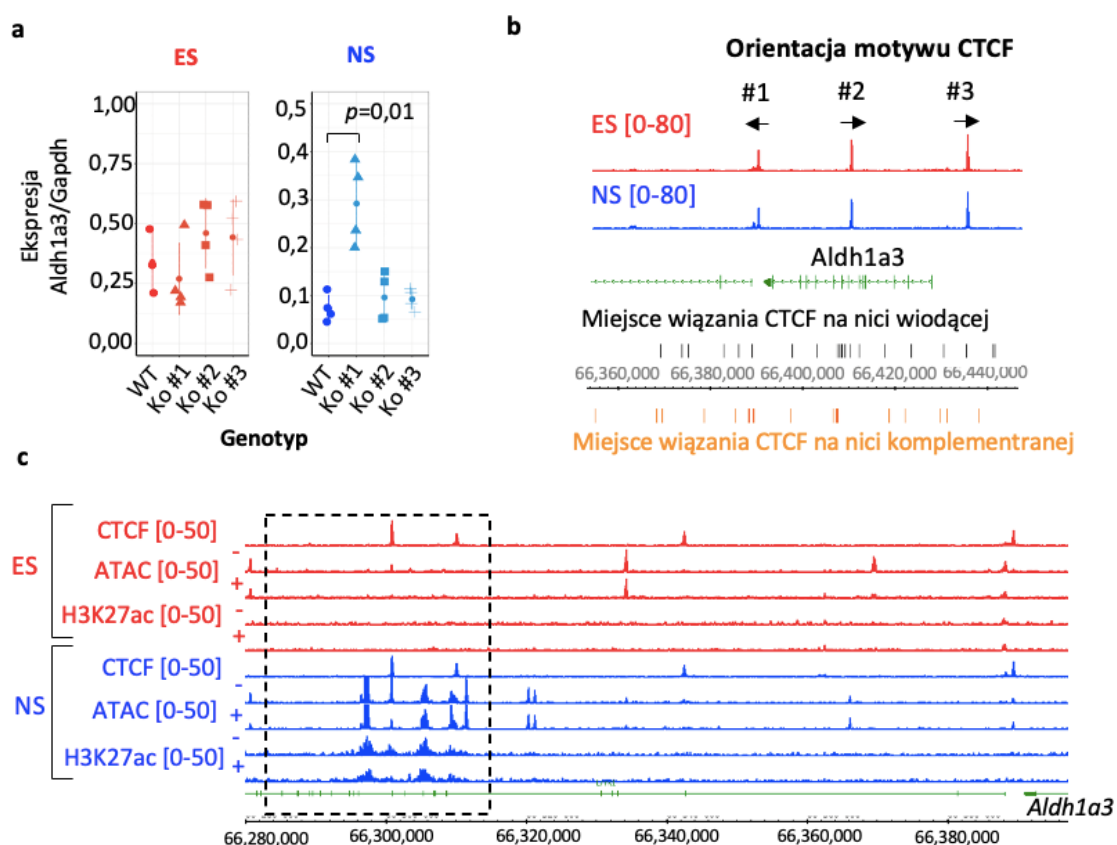
Po delecji każdego z trzech wybranych miejsc wiązania białka CTCF w obrębie *locus Aldh1a3* w komórkach ES nie zaobserwowano istotnych zmian poziomu ekspresji genu w porównaniu do komórek typu dzikiego (WT). Niezależnie od tego, które miejsce wiązania białka CTCF (#1, #2 lub #3) zostało usunięte. Dane te wskazują, że w warunkach pluripotencji obecność analizowanych sekwencji *CTCF* nie jest kluczowa dla transkrypcyjnej regulacji *Aldh1a3*.

W przeciwieństwie do komórek ES, w komórkach NS delecja miejsca wiązania białka CTCF #1 doprowadziła do 2,4-krotnego zwiększenia poziomu ekspresji genu *Aldh1a3* względem komórek typu dzikiego (rycina 22a). Wszystkie trzy analizowane miejsca wiązania białka CTCF zlokalizowane są w obrębie granicznego izolatora (rycina 22c). Spośród nich tylko miejsce #1, którego usunięcie wpłynęło na ekspresję *Aldh1a3* jest zorientowane w kierunku 3' końca *locus* tego genu. Miejsca #2 i #3 skierowane są w stronę 5' końca (rycina 22b).

Co istotne, miejsce #1 ukierunkowane jest w stronę licznych sygnałów ATAC-seq i ChIP-seq (H3K27ac), specyficznych dla komórek NS, co sugeruje obecność aktywnych wzmacniaczy w jego sąsiedztwie. Samo miejsce #1 nie wykazuje jednak cech aktywnego

elementu regulatorowego - nie obserwuje się w nim sygnału H3K27ac, ani otwartej chromatyny (rycina 22c).

Obserwacje te wskazują, że miejsce #1 najprawdopodobniej pełni funkcję izolacyjną chroniąc *Aldh1a3* przed wpływem CRE aktywnych w komórkach NS. Z kolei delekcja miejsc #2 i #3 nie miała istotnego wpływu na ekspresję *Aldh1a3* w komórkach NS co sugeruje ich mniejsze znaczenie w stosunku do regulacji *Aldh1a3* na tym etapie różnicowania (rycina 22a). Ponadto, fakt iż motyw CTCF w miejscu #1 jest zwrócony w kierunku tych potencjalnych wzmacniaczy sugeruje udział kompleksu kohezyny w tworzeniu kontaktów między tymi potencjalnymi wzmacniaczami a promotorem *Aldh1a3*.



Rycina 22: Utrata pluripotencji i różnicowanie do komórek NS prowadzi do wzmocnienia funkcji CTCF jako izolatora w locus *Aldh1a3*.

a) Wykres punktowy przedstawia ilościową analizę ekspresji genu *Aldh1a3* w komórkach ES i NS typu dzikiego (WT) oraz komórkach z delekcją pojedynczego miejsca wiązania CTCF w locus *Aldh1a3* (#1, #2 lub #3).

b) Profil wiązania CTCF w locus Aldh1a3 w komórkach ES i NS linii 46C. Rycina uwzględnia adnotacje orientacji motywów CTCF oraz umiejscowienie pików CTCF z uwzględnieniem orientacji/typu nici (wiodącej lub komplementarnej).

c) Ścieżki analiz CTCF: ChIP-seq, ATAC-seq oraz H3k27ac ChIP-seq powyżej locus Alh1a3. Zaznaczone piki ścieżek H327ac i ATAC-seq w komórkach ES, świadczą o obecności aktywnych elementów regulatorowych (wzmacniaczy) powyżej locus Aldh1a3, aktywowanych w tym typie komórki.

Podsumowanie części I

Przedstawione analizy sugerują, że czynnik CTCF pełniąc rolę izolatora odgrywa kluczową funkcję w utrzymywaniu stanu wyciszenia genów neuronalnych w komórkach macierzystych.

Wnioski te oraz ich potencjalne konsekwencje biologiczne zostaną szczegółowo omówione w dyskusji, jednak na obecnym etapie istotne było zrozumienie mechanizmu działania czynnika CTCF w kontekście jego specyficzności komórkowej.

W świetle zgromadzonych danych zdecydowaliśmy się pogłębić analizę molekularnych zmian towarzyszących różnicowaniu komórek, koncentrując się na roli czynnika CTCF i jego potencjalnych partnerów w regulacji architektury chromatyny. W kontekście uzyskanych wyników, intrygującym wydaje się rola RNA w funkcjach czynnika CTCF oraz mechanizmy stojące za tymi interakcjami, które w dalszym ciągu pozostawały niejasne. Na tym etapie projektu fundamentalne wydawała się identyfikacja nowych typów RNA wiążących się z czynnikiem CTCF oraz dokładniejsze zrozumienie ich funkcji w regulacji topologii chromatyny.

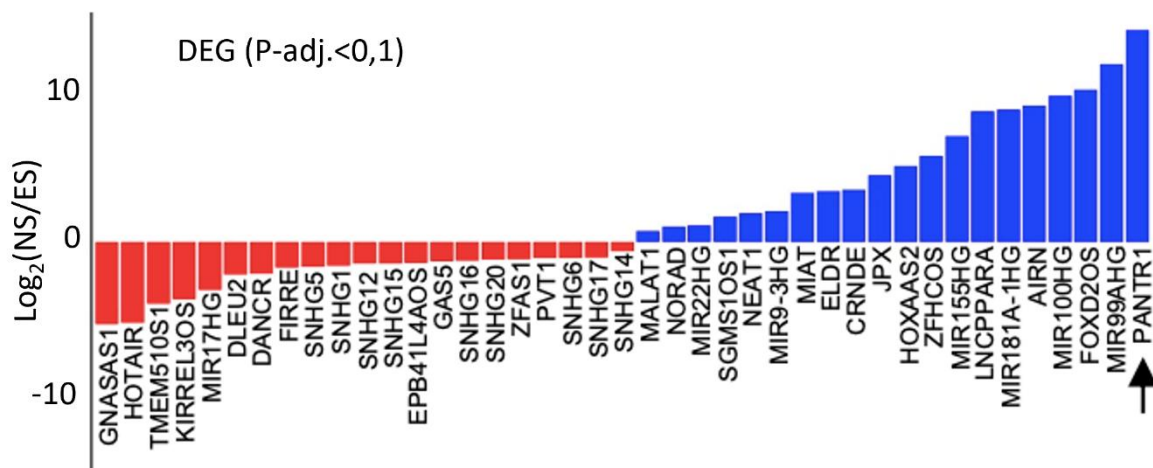
Część II Identyfikacja ncRNA istotnych w topologii chromatyny

2. ncRNA stabilizuje interakcję CTCF-RBP w komórkach NS.

W toku naszych prac w laboratorium odkryliśmy, że utrata pluripotentności komórek ES oraz ich indukcja do linii neuronalnej jest związana ze wzrostem asocjacji pomiędzy czynnikiem CTCF a białkami wiążącymi RNA takimi jak zależna od ATP helikaza RNA DEAD-box helicase 5 (Ddx5) czy białkiem Fused in Sarcoma (FUS, Dehingia B. Milewska-Puchała M et al., 2025 Nat. Cell Biol).

Nasza grupa wykazała, że białka wiążące RNA wpływają na aktywność izolatorową czynnika CTCF oraz na jego zdolność do tworzenia pętli chromatynowych. Asocjacja CTCF-RBP jest całkowicie zależna od obecności RNA (Dehingia, Milewska-Puchała, et al., 2025, część pracy Bondity Dehingii). Postawiliśmy hipotezę, że aktywność specyficznych RNA odpowiada za wzrost interakcji pomiędzy czynnikiem CTCF a białkami wiążącymi RNA, a przez to za dojrzewanie trójwymiarowej struktury genomu podczas rozwoju.

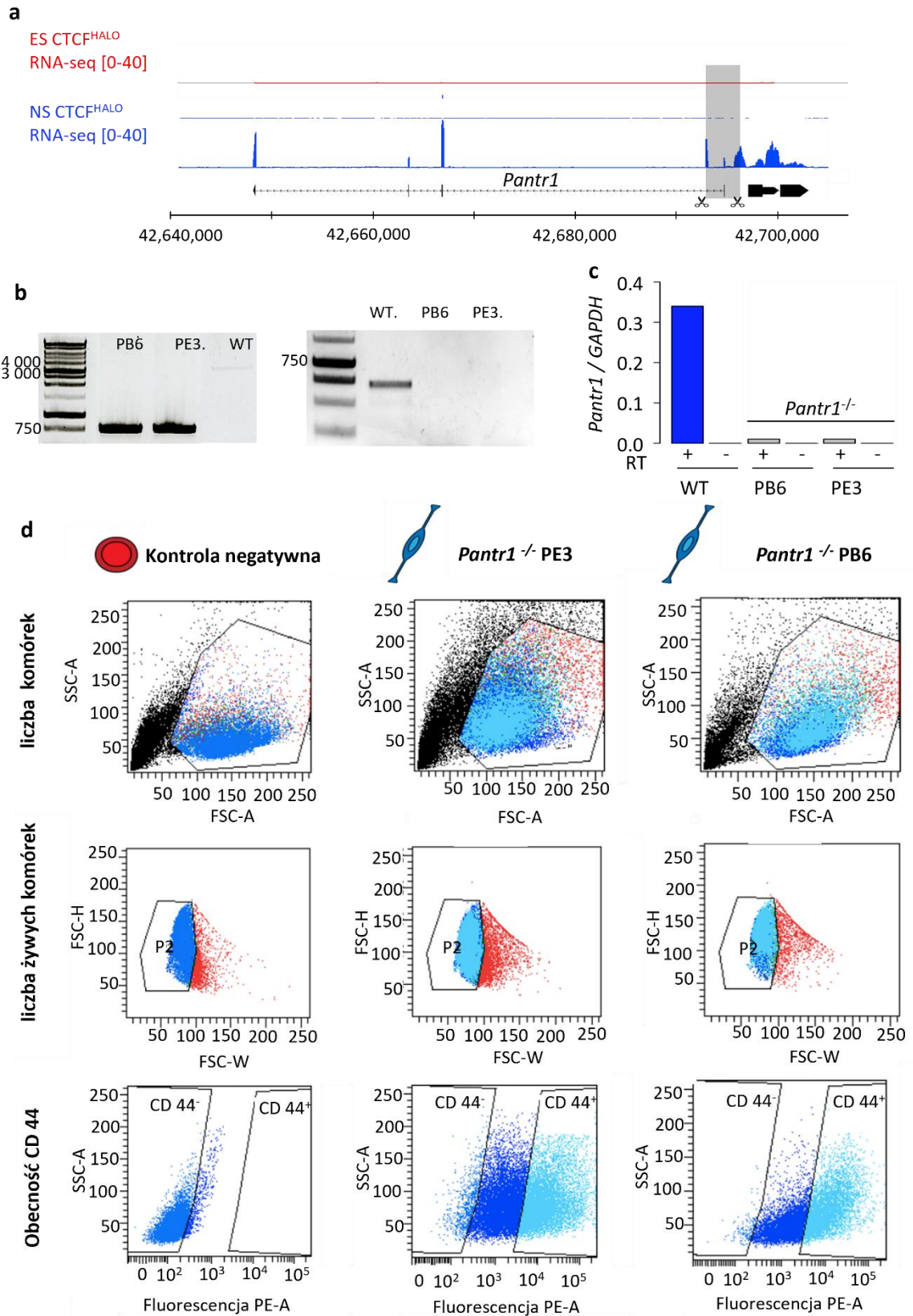
W celu identyfikacji lncRNA potencjalnie wpływających na architektoniczną funkcję czynnika CTCF wykorzystałam dane opublikowane przez Saldaña-Meyer i współpracowników (Saldaña-Meyer et al., 2019), które obejmują wykaz RNA zidentyfikowanych jako te oddziałujące z CTCF. Na podstawie analizy ich aktywności w komórkach ES oraz NS we współpracy z doktorantką Misbah Abbas wspólnie wyróżniłyśmy kilka niekodujących RNA. Spośród nich szczególną uwagę poświęciłyśmy *Pantr1*, czyli lncRNA charakteryzującemu się wyraźnym wzrostem ekspresji w komórkach nerwowych (rycina 23). Zmieniający się profil ekspresji *Pantr1* w trakcie różnicowania komórek oraz jego nasilona interakcja z białkiem CTCF mocno sugerowały możliwy udział *Pantr1* w regulacji przestrzennej organizacji chromatyny.



Rycina 23: Różnicowanie komórek ES do NS ujawnia dynamiczną regulację lncRNA wiążących białkoCTCF.

Wykres uwzględniający zmianę poziomu ekspresji lncRNA podczas różnicowania komórkowego ($p < 0,01$ metoda DESeq2). W analizie uwzględnione tylko lncRNA wchodzące w interakcje z białkiem CTCF na podstawie danych (Saldaña-Meyer et al., 2019). Dane ekspresji otrzymane na podstawie analiz RNA-seq komórek ES i NS linii 46C.

W celu sprawdzenia roli *Pantr1* w biologii czynnika CTCF oraz jego interakcji z białkami wiążącymi RNA (Ddx5 i FUS) usunęłam obszar genomowy obejmujący promotor i część pierwszego eksonu genu *Pantr1*, pozwalający na wyciszenie jego ekspresji w komórkach ES. Poprawność delekcji potwierdziłam na poziomie genomowym w dwóch homozygotycznych liniach klonalnych (rycina 24a). Za pomocą analizy qPCR wykazałam, że ekspresja *Pantr1* uległa pomniejszeniu ponad 10-krotnie w zmutowanych komórkach NS w porównaniu do typu dzikiego (rycina 24b). Z powodu bardzo niskiej ekspresji *Pantr1* w komórkach ES nie sprawdzałam zmiany poziomu ekspresji badanego genu w tym typie komórek.



Rycina 24: Charakterystyka funkcjonalna i molekularna komórek po delecji lncRNA *Pantr1*

- a) Schematyczne przedstawienie strategii delecji genu *Pantr1* w genomie mysim (mm10).
- b) Wyniki reakcji PCR, potwierdzających delecję *Pantr1*, **Panel górny**: namnożenie fragmentu starterami flankującymi obszar poza delecją. Długość fragmentu typ dziki (WT): 3,375 pz, delecja: 786 pz, **panel dolny**: namnożenie fragmentu starterami flankującymi obszar w regionie delecji. Długość fragmentu typ dziki (WT): 723 pz, delecja: brak fragmentu,
- c) Wyniki ilościowej reakcji RT-PCR ilustrujące znormalizowaną ekspresję *Pantr1* w komórkach NS typu dzikiego (WT) i dwóch linii klonalnych z delecją *Pantr1* -/-.
- d) Wykresy przedstawiające ustawienia bramek selekcyjnych użytych do sortu komórek NS metodą cytometrii przepływowej. Do sortowania użyto dwóch linii NS monoklonalnych z delecją genu *Pantr1* -/- oraz linii WT ES jako kontroli negatywnej. W analizie zastosowano trzy etapowy sposób sortowania. **Panel górny**: bramka selekcyjna na podstawie parametrów FSC/SSC umożliwiająca wykluczenie zanieczyszczeń. **Panel środkowy**: bramka żywotności pozwalająca na wyodrębnienie komórek żywych na podstawie wykluczenia barwnika martwych komórek. **Panel dolny**: identyfikacja komórek pozytywnych względem ekspresji antygenu docelowego CD44 przy użyciu znakowanego przeciwciała, wykorzystywanego do sortowania.

Przeprowadzone przez Bonditę Dehingię testy ligacji zbliżeniowej: PLA z ang. *Proximity Ligation Assay* wykazała wyraźny wpływ delecji *Pantr1* na poziom interakcji między CTCF a białkami wiążącymi RNA-Ddx5 oraz FUS. Zmniejszenie siły interakcji CTCF-Ddx5 ($p < 0,001$) oraz CTCF-FUS ($p < 0,001$) wskazuje na potencjalny wpływ *Pantr1* na stabilizację tych interakcji. Przedstawione wyniki pokazują istotną różnicę w intensywności interakcji CTCF-RBP po usunięciu *Pantr1* co daje silne dowody na rolę *Pantr1* w regulacji kontaktów CTCF z RBP w komórkach NS.

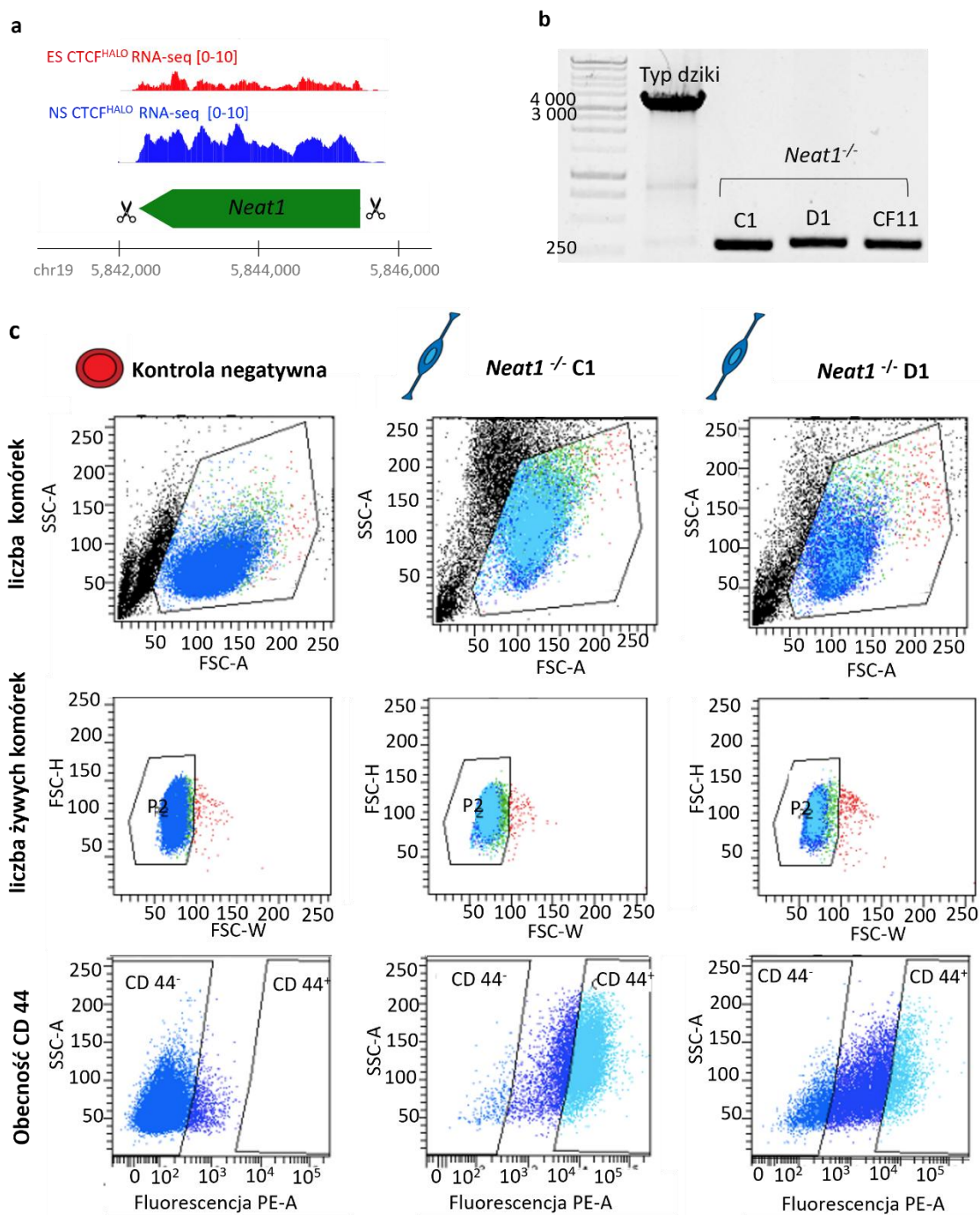
Choć w obu przypadkach zarówno dla interakcji CTCF-Ddx5, jak i CTCF-FUS usunięcie *Pantr1* korelowało ze spadkiem siły interakcji, efekt ten był bardziej wyraźny w przypadku interakcji białka CTCF z Ddx5.

Reasumując, używając komórek które otrzymałam odkryliśmy, że usunięcie pojedynczego lncRNA *Pantr1* pozornie niewielkiego elementu prowadzi do istotnego osłabienia interakcji pętli CTCF-CTCF co wyraźnie widoczne jest na mapach Hi-C (eksperyment przeprowadzony przez Bonditę Dehingię). Tak wyraźna reorganizacja struktury chromatyny wskazuje, że *Pantr1* może pełnić istotną rolę w regulacji funkcji czynnika CTCF zarówno w kontekście jego zdolności do tworzenia pętli jak

i klastrowania. To odkrycie podkreśla znaczenie niekodujących RNA jako potencjalnych regulatorów architektury genomu i dowodzi jak fundamentalne dla funkcjonowania CTCF mogą być mechanizmy zależne od lncRNA.

Uzyskane wyniki skłaniają do postawienia pytania o specyficzność roli *Pantr1* w biologii CTCF szczególnie w kontekście wczesnych etapów rozwoju układu nerwowego. W celu lepszego zrozumienia mechanizmów stabilizujących oddziaływanie CTCF z RBP na podstawie analizy interakcji CTCF-RNA wyłoniłam *Nuclear Enriched Abundant Transcript 1 (Neat1)* jako jednego z głównych kandydatów mogących pełnić istotną funkcję w biologii białka CTCF. *Neat1* wraz z *Pantr1* należał do grupy lncRNA silnie oddziałujących z CTCF. Dodatkowo, *Neat1* wykazywał znane interakcje z białkami Ddx5 oraz FUS.

Aby zbadać czy *Neat1* pełni podobną rolę przeprowadziłam delecję genu kodującego *Neat1* w komórkach ES linii CTCF^{HALO} uzyskując trzy niezależne homozygotyczne linie klonalne. Następnie linie te zostały poddane różnicowaniu do komórek NS. W celu zapewnienia jednorodnej populacji neuronalnej przeprowadziłam sortowanie komórek NS po indukcji neuronalnej z wykorzystaniem powierzchniowego antygenu CD44 i cytometrii przepływowej (rycina 25c).



Rycina 25: Charakterystyka funkcjonalna i molekularna komórek po delecji lncRNA *Neat1*

a. Schematyczne przedstawienie strategii delecji genu *Neat1* w genomie mysim (mm10).
b. Wyniki analizy PCR potwierdzające skuteczną delecję genu *Neat1* w komórkach ES. Widoczne pasma odpowiadające skróconym produktom amplifikacji wskazują na prawidłowe usunięcie wybranego regionu obejmującego promotor oraz część pierwszego eksonu *Neat1* w trzech niezależnych liniach klonalnych.
c. Wykresy przedstawiające ustawienia bramek selekcyjnych użytych do sortu komórek NS metodą cytometrii przepływowej. Do sortowania użyto dwóch z trzech linii NS

monoklonalnych z delecją genu $Neat1^{-/-}$ oraz linii WT ES jako kontroli negatywnej. W analizie zastosowano trzy etapowy sposób sortowania. Panel górny przedstawia bramkę selekcyjną na podstawie parametrów FSC/SSC umożliwiającą wykluczenie zanieczyszczeń i zidentyfikowanie populacji komórek. Panel środkowy: bramka żywotności pozwalająca na wyodrębnienie komórek żywych na podstawie wykluczenia barwnika martwych komórek. Panel dolny: identyfikacja komórek pozytywnych względem ekspresji antygeny docelowego CD44 przy użyciu znakowanego przeciwciała, wykorzystywanego do sortowania.

Usunięcie *Neat1* nie spowodowało istotnych zmian w poziomie ekspresji CTCF, ani w jego rozmieszczeniu wewnątrz jądra komórkowego (nukleoplazmie) zarówno w komórkach ES jak i NS. Ten wynik sugeruje, że obecność *Neat1* nie jest niezbędna do prawidłowego rozmieszczenia białka CTCF w jądrze komórkowym w analizowanych warunkach. Mgr Bondita Dehingia przeprowadziła eksperyment PLA na wygenerowanej przeze mnie linii z delecją genu *Neat1*, gdzie wykazała, że interakcje CTCF z wybranymi białkami wiążącymi RNA: FUS i Ddx5 pozostają niezmiennione po delecji *Neat1*. Brak statystycznie istotnych różnic w poziomie tych interakcji wskazuje, że *Neat1* nie pełni istotnej roli w bezpośrednim wspomaganie lub stabilizacji kompleksów CTCF-RBP w komórkach ES oraz NS.

Podsumowanie części II

Przedstawione badania pokazują, że interakcje między białkami wiążącymi RNA a CTCF są zależne od obecności RNA i mają istotny wpływ na tworzenie struktur przestrzennych chromatyny, takich jak pętle CTCF-CTCF. Na poziomie populacyjnym zaobserwowano, że różnicowaniu komórek ES do NS towarzyszy stopniowe wzmacnianie przestrzennej architektury chromatyny, w szczególności zauważalna była większa liczba stabilnych pętli kotwiczonych przez białka CTCF oraz wyraźniejsze ostrzej zdefiniowane granice TAD w komórkach NS w porównaniu do ES.

Obecność *Pantr1* w interakcji między czynnikiem CTCF a RBP sugeruje, że niekodujące RNA może działać jako strukturalny komponent chromatyny, który stabilizuje powstały kompleks CTCF-RBP ułatwiając tworzenie się pętli DNA czy klastrów białka CTCF. Zgromadzone dane wskazują, że takie kompleksy mogą lokalnie regulować kinetykę wiązania białka CTCF do DNA oraz oddziaływać na kompleks kohezyny, prowadząc do bardziej trwałych interakcji i stabilnych struktur przestrzennych.

Wyniki te dają podstawy do wnioskowania, że lncRNA nie tylko modulują ekspresję genów, ale mogą również bezpośrednio wpływać na organizację trójwymiarową genomu. Co istotne, nie wszystkie lncRNA wykazują taką aktywność. Jak wykazano w tej pracy doktorskiej delecja *Neat1* nie wpływała na interakcje między czynnikiem CTCF a badanymi RBP co dodatkowo podkreśla specyficzną rolę *Pantr1* w tym mechanizmie. Warto również zaznaczyć, że *Pantr1* wykazuje szczególną aktywność podczas różnicowania komórek ES do NS co sugeruje, że RNA tego typu może wspomagać komórkowo-specyficzną kontrolę nad strukturą przestrzenną genomu oraz dojrzewaniem architektury 3D podczas rozwoju.

Część III Przyżyciowa analiza kinetyki pętli CTCF w komórkach ES i NS

3.Strategia eksperymentalna badająca kinetykę pętli CTCF w żywych komórkach

Wyniki przedstawione we wcześniejszych częściach pracy pokazują ogólną zmianę funkcji białka CTCF w trakcie rozwoju neuronalnego. Aby odpowiedzieć na wciąż otwarte pytanie, w jaki sposób konsolidacja genomu wpływa na dynamikę formowania się pętli CTCF-CTCF w żywych komórkach, istotne było określenie zmian przestrzennej aktywności białka CTCF pełniącego rolę kotwic pętli w komórkach ES i NS z wykorzystaniem zaawansowanych technik mikroskopowych.

W tym kontekście, kluczowym krokiem było zaplanowanie eksperymentów, które pozwoliłyby uzyskać realny wgląd w zmiany dynamiki pętli podczas wczesnego rozwoju neuronalnego u ssaków, unikając jednocześnie wprowadzenia stresu komórkowego, który mógłby zafałszować wyniki.

W celu realizacji tego celu, moja praca została podzielona na trzy główne etapy:

1. Wybór odpowiedniego *locus* do obserwacji: identyfikacja regionu genomu, który będzie reprezentatywny dla badanych procesów.
2. Konstrukcja narzędzia umożliwiającego czasową obserwację dynamiki pętli w żywych komórkach: opracowanie technologii, która pozwoli na obrazowanie w czasie rzeczywistym bez wprowadzania zniekształceń w funkcjonowaniu komórek.
3. Optymalizacja wizualizacji: dopracowanie metod analitycznych, by uzyskać jak najbardziej precyzyjne i użyteczne dane.

3.1. Wybór *locus*

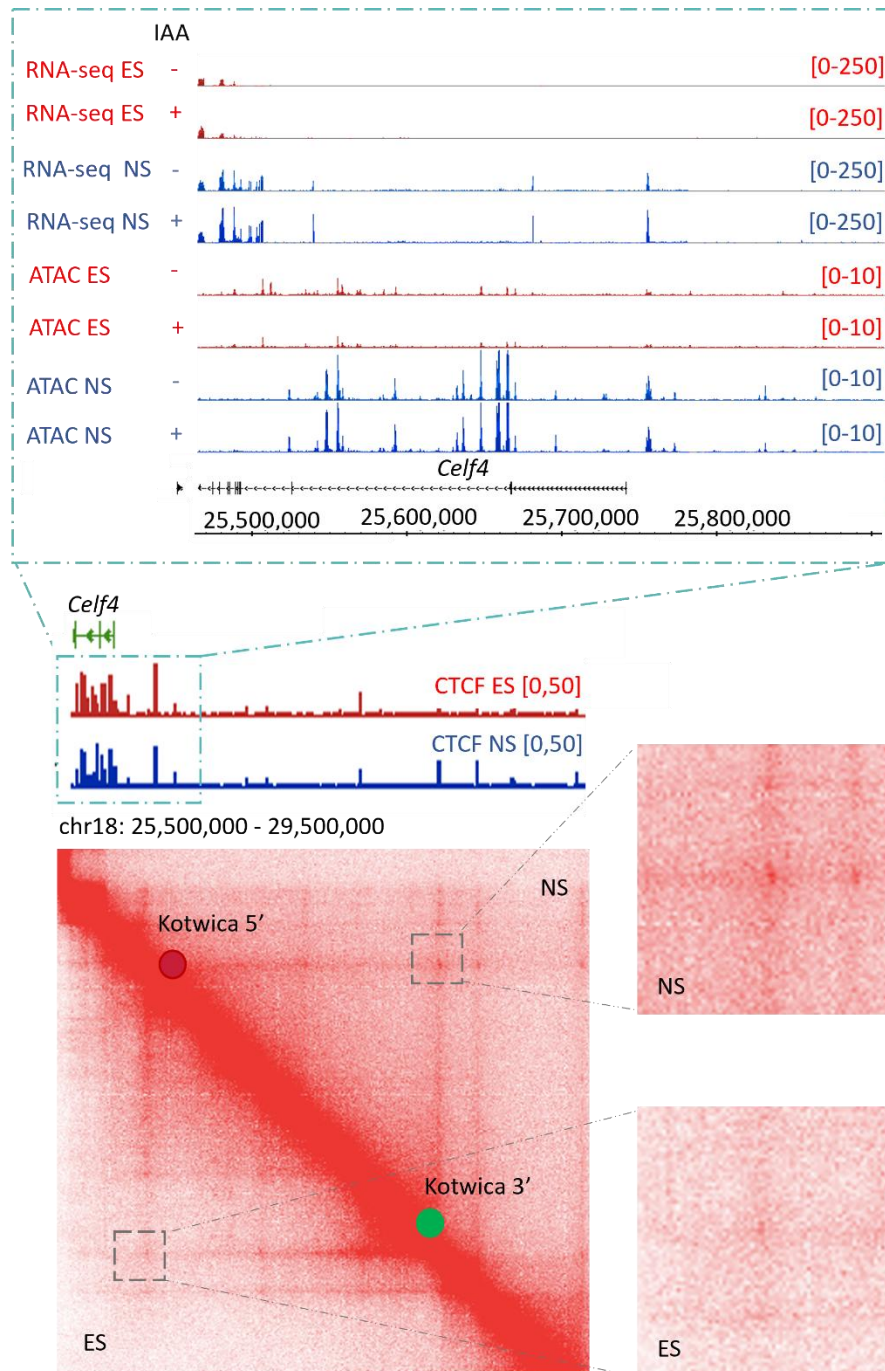
Techniką, która najlepiej odpowiadała potrzebom projektu był system CRISPR-Sirius (Ma H. et al., 2018), który pozwala na wizualizację wybranych *loci* w czasie rzeczywistym. Założeniem projektu była wizualizacja kotwic wybranej pętli CTCF-CTCF w czasie rzeczywistym żywych komórkach ES i NS w celu pozyskania reprezentacyjnego modelu zmiany w dynamice pętli podczas wczesnego rozwoju neuronalnego u ssaków.

Technologia CRISPR-Sirius, mimo wielu istotnych zalet takich jak: możliwość prowadzenia obserwacji w czasie rzeczywistym, tworzenie stabilnych linii komórkowych czy niska toksyczność wobec komórek cechuje się jednak ograniczoną przepustowością. Oznacza to, że pozwala na szczegółowe monitorowanie jedynie kilku wybranych miejsc w genomie. Z tego względu wybór odpowiedniego *loci* do wizualizacji stał się jednym z kluczowych etapów całego eksperymentu. Konieczne było staranne dobranie takiego fragmentu genomu, który nie tylko pozwalałby na uchwycenie zmian przestrzennych i czasowych, ale również dostarczałby danych istotnych z punktu widzenia ogólnych mechanizmów regulacji genomu w badanych komórkach. W procesie doboru *locus* do wizualizacji kierowałam się trzema głównymi kryteriami:

1. **Wzmocnienie pętli po utracie pluripotencji:** wybór *locus*, którego struktura pętli wykazuje wyraźną zmianę po przejściu komórek z stanu pluripotentnego do stanu bardziej zróżnicowanego.
2. **Odpowiednia długość pętli umożliwiająca jej obrazowanie:** przy wizualizacji pętli CTCF-CTCF w czasie rzeczywistym istotne jest uwzględnienie dystansu genomowego między kotwicami pętli. Pętle o bardzo małym dystansie między kotwicami są trudne do wyraźnego zobrazowania z powodu ograniczeń rozdzielczości mikroskopowej oraz nakładających się sygnałów podczas gdy pętle o umiarkowanej rozpiętości umożliwiają uzyskanie jakościowych obrazów przestrzennej struktury chromatyny.
3. **Ciekawe *locus* pod względem funkcjonalności oraz roli czynnika CTCF w tym *locus*:** wybór *locus*, które posiada istotne znaczenie w kontekście regulacji transkrypcyjnej oraz interakcji z czynnikiem CTCF, a także jest zaangażowane w procesy funkcjonalne, takie jak splicing czy regulacja ekspresji genów.

Na podstawie powyższych kryteriów wybrałam *locus Celf4*, które koduje białko wiążące RNA i jest zaangażowane w regulację alternatywnego obróbki potranslacyjnej RNA *Celf4* może także wpływać na rozwój neuronów. Wyniki analizy RNA-seq z linii degronowej CTCF^{EGFP-AID} wykazały, że ekspresja *Celf4* była znacząco zwiększona po usunięciu białka CTCF w komórkach NS nie zaobserwowałam tego efektu w komórkach ES. Dodatkowo, przejście komórek ES do komórek NS było związane z pojawieniem się licznych pętli łączących miejsca wiązania CTCF w *locus Celf4* (rycina 29, panel dolny).

Podobnie jak w poprzednich przykładach usunięcie białka CTCF nie wpłynęło na aktywność promotora ani innych elementów regulatorowych w obszarze tego *locus*. Sugeruje to, że to funkcje izolacyjne czynnika CTCF najprawdopodobniej prowadzą do obserwowanej regulacji transkrypcyjnej *Celf4* po jego usunięciu.



Rycina 26: Zależność między reorganizacją pętli CTCF a ekspresją *Celf4* w komórkach neuronalnych.

Profil Hi-C w locus *Celf4* ukazuje zwiększoną liczbę pętli CTCF-CTCF w komórkach NS względem ES (Bonev et al., 2017) co wskazuje na reorganizację struktury chromatyny podczas różnicowania. Równocześnie, ścieżki przedstawiające analizę RNA-seq (górny panel) ilustrują wzrost ekspresji *Celf4* po przejściu komórek ES do komórek NS (porównanie ścieżek niebieskich i czerwonych). W samych komórkach NS po traktowaniu IAA ekspresja również wzrasta, mimo braku zmian w otwartości promotora ATAC-seq (górny panel).

Wyniki analizy Hi-C dla *locus Celf4* w komórkach ES i NS ukazują wyraźne różnice w organizacji przestrzennej chromatyny w obu typach komórek. W komórkach NS zaobserwowano obecność wielu pętli zakotwiczonych w miejscach wiązania CTCF z zlokalizowanych w regionie 5' względem promotora *Celf4*, które nie były widoczne w komórkach ES (rycina 26, dolny panel). Dodatkowo, analiza ścieżek RNA-seq i ATAC-seq w komórkach ES i NS wykazała, że ekspresja genu po usunięciu CTCF poziom transkryptu *Celf4* znacząco wzrósł wyłącznie w komórkach NS ($p < 0,01$) (rycina 26, panel górny). Co istotne zjawisko to występuje pomimo braku zmian w dostępności promotora *Celf4*. Wyniki te silnie sugerują, że deregulacja *Celf4* może wynikać ze zmian w strukturze pętli chromatynowej zależnej od białka CTCF, a nie z bezpośredniego wpływu na dostępność promotora.

3.2. Konstrukcja stałej linii komórkowej ES i NS do wizualizacji *loci*

Celem badań było poznanie mechanizmów, za pośrednictwem których białko CTCF wpływa na organizację chromatyny oraz regulację ekspresji genów niezależnie od zmian w dostępności promotora.

W pierwszym etapie eksperymentów wykorzystano linie komórkowe ES i NS zawierające system degronowy na końcu C-końca genu CTCF (CTCF^{EGFP-AID}), umożliwiający kontrolowaną degradację białka CTCF. Początkowo planowano użycie tej linii zarówno do kontroli, jak i do przeprowadzenia eksperymentów właściwych z zastosowaniem systemu CRISPR-Sirius.

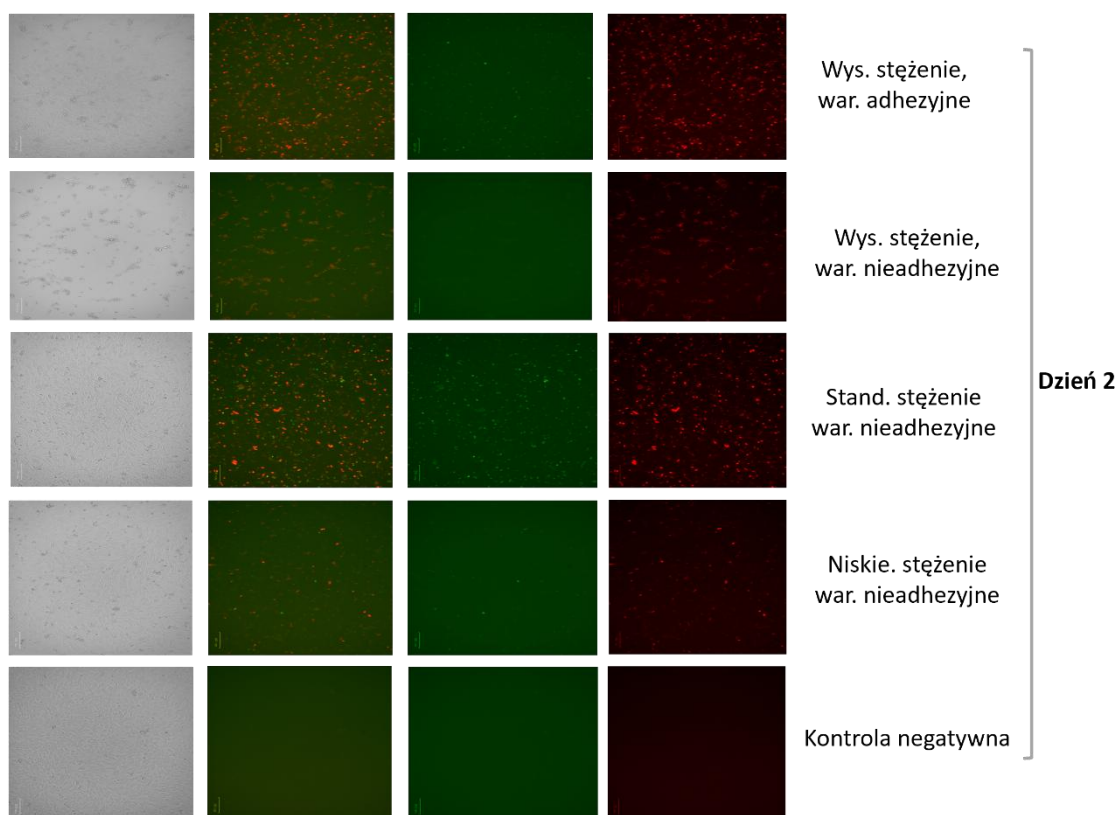
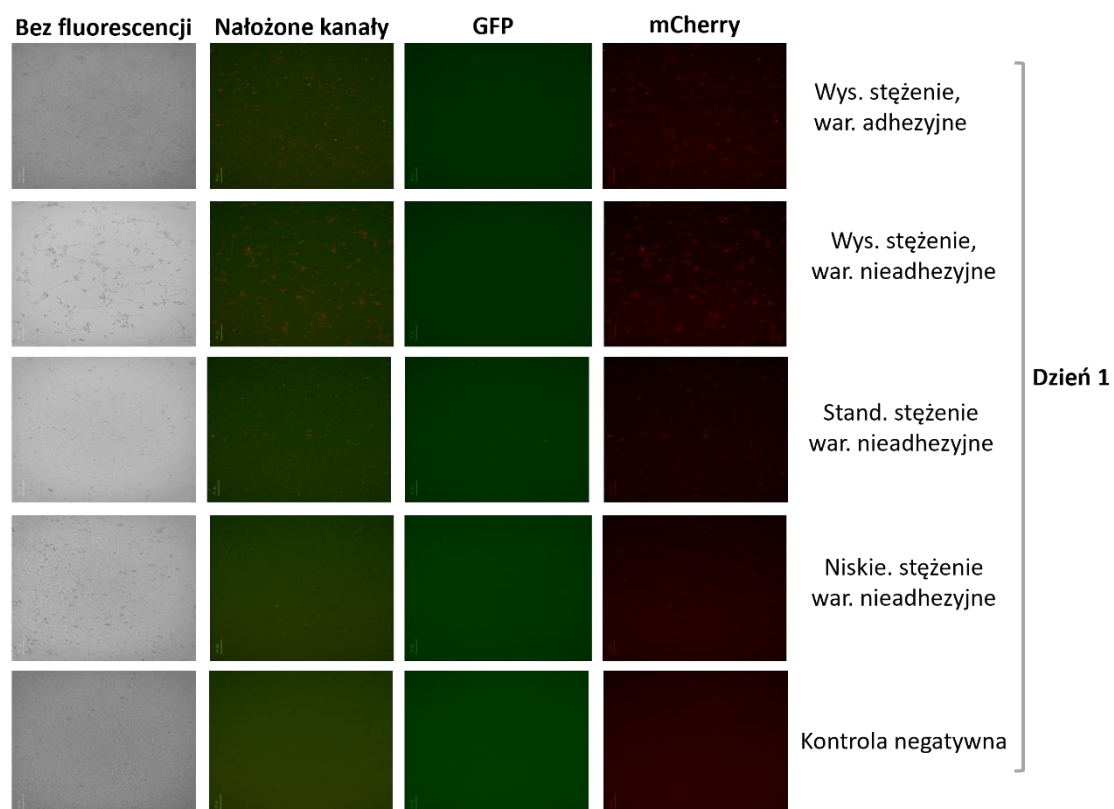
Pomimo prawidłowego działania układu w warunkach testowych m.in. podczas wizualizacji telomerów, gdzie w komórkach ES uzyskano satysfakcjonującą jakość sygnału, jego zastosowanie w badaniach docelowych okazało się ograniczone. Próby wizualizacji *locus Celf4* wiązały się z niską jakością sygnału: nie obserwowano wiarygodnych sygnałów niebieskich, a sygnał czerwonej fluorescencji był w dużej mierze zdominowany przez artefakty.

Dodatkowo, linia degronowa wykazywała wysoką wrażliwość na stres komórkowy wywołany przez procedury takie jak transdukcja lentiwirusowa, transfekcja plazmidami o dużej wielkości około 15 kbp czy posiew komórek na szkle w celu przeprowadzenia mikroskopii. Czynniki te prowadziły do powstawania licznych

artefaktów, znacząco obniżających jakość uzyskiwanych obrazów oraz wiarygodność wyników. W związku z powyższym, do dalszych badań wybrano inną linię mysich komórek CTCF^{HALO}, która wykazywała większą stabilność oraz niższą podatność na stres komórkowy podczas eksperymentów związanych z wizualizacją.

Uzyskane linie komórkowe ES i różnicowane do stadium NS wykazały większą stabilność, a zastosowane procedury wizualizacyjne, mimo wyzwań technicznych, pozwoliły na uzyskanie funkcjonalnych wyników, szczególnie w warunkach kontrolnych.

W przypadku komórek ES transdukcja lentiwirusowa przebiegła efektywnie i szybko bez konieczności czasochłonnej optymalizacji. Dla komórek linii NS proces ten okazał się bardziej wymagający. W celu zapewnienia optymalnych warunków transfekcji, skorzystałam z optymalizacji przeprowadzonej na komórkach NS przez mg. Eryka Duńskiego (doktoranta w laboratorium) gdzie porównał efektywność transdukcji przy różnych stężeniach wirusa, zarówno w warunkach adhezyjnych (komórki przyklejone) jak i nieadhezyjnych (komórki nieprzyklejone). Uzyskane wyniki wskazują, że niezależnie od zastosowanego stężenia wirusa kluczowym czynnikiem determinującym efektywność transdukcji był stan fizjologiczny komórek oraz ich interakcja z podłożem. Komórki przyczepione wykazywały wyraźnie wyższą podatność na transdukcję w porównaniu do komórek zawieszonych.

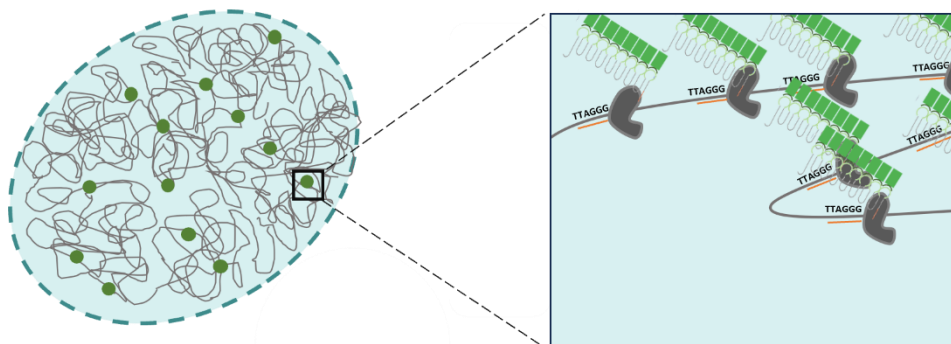


Rycina 27: Optymalizacja warunków transdukcji wirusowej w komórkach NS.

Reprezentatywne obrazy mikroskopii fluorescencyjnej pokazują skuteczność transdukcji lentiwirusowej w komórkach NS linii CTCF^{HALO}. Komórki hodowano w dwóch warunkach **i)** adhezyjnych (przyklejone do podłoża) oraz **ii)** nieadhezyjnych (w zawieszynie). Transdukcję przeprowadzono przy użyciu trzech różnych stężeń wirusa, a obrazy zarejestrowano w 1. i 2. dniu po zakażeniu. Intensywność sygnału fluorescencyjnego odzwierciedla poziom ekspresji transgeny, co pozwala ocenić wpływ stanu adhezji komórek na efektywność infekcji lentiwirusowej.

3.3. Wizualizacja i testowanie systemu

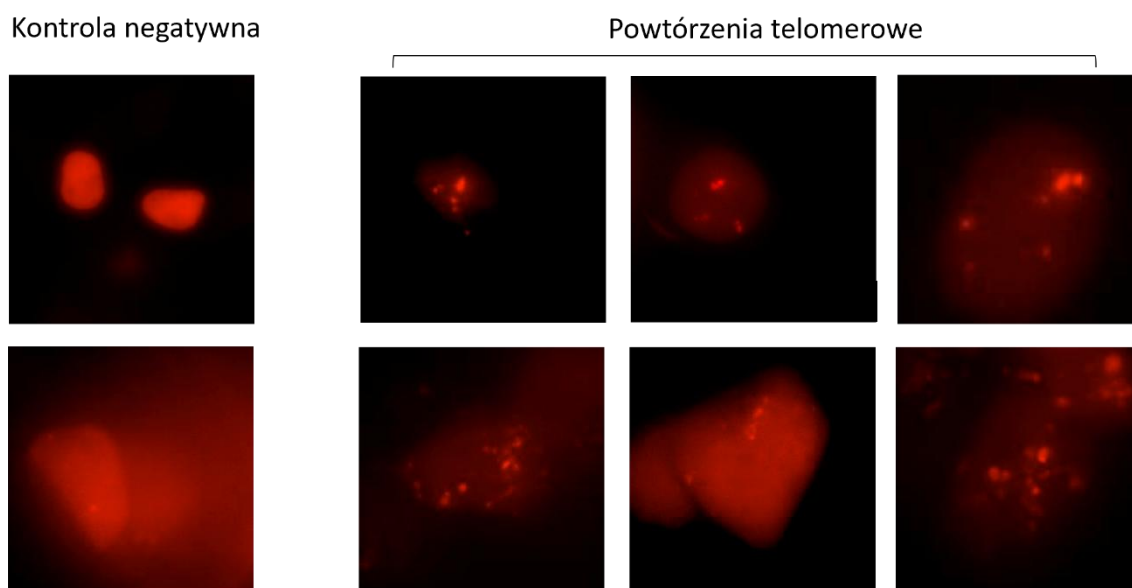
W celu przetestowania aktywności opracowanego systemu oraz metody klonowania wielu sgRNA (metoda CARGO, Gu et al., 2018), sklonowałam sgRNA ukierunkowane na powtórzenia telomerowe i wprowadziłam je do wektora bazowego (px-filler, materiały 7.2.). Po 24 godzinach od transfekcji, przeprowadziłam wizualizację na żywych komórkach ES i NS linii reporterowej: CTCF^{HALO} oraz komórkach ES linii degronowej: CTCF^{EGFP-AID}. Telomery wybrano jako sekwencję docelową ze względu na wysoką liczebność ich kopii w genomie, przewidywalną lokalizację oraz dobrze udokumentowaną architekturę jądrową. Taki wybór umożliwia jednoznaczną ocenę działania systemu znakowania DNA, ponieważ przy skutecznym kierowaniu dCas9 sgRNA do powtórzeń telomerowych powinno dochodzić do widocznego skupienia sygnału w postaci punktów fluorescencyjnych w jądrze.



Rycina 28: Schemat obrazowania powtórzeń telomerowych przy użyciu mikroskopii przyżyciowej z wykorzystaniem skonstruowanego systemu wizualizacji opartego na metodzie CRISP-Sirius.

Schemat przedstawia eksperymentalne podejście do wizualizacji powtórzeń telomerowych w genomie myszy przy użyciu systemu CRISPR-Sirius. Technologia ta opiera się na kierowaniu nieaktywnego białka dCas9, stabilizującego specjalnie zaprojektowane rusztowania RNA nakierowujące na powtarzającą się w telomerach sekwencje TTAGG. Skuteczne wiązanie kompleksu prowadzi do powstania skupisk zielonego sygnału fluorescencyjnego w jądrze komórkowym, odpowiadających lokalizacjom telomerów.

Uzyskane wyniki pozwoliły na zaobserwowanie jasno-czerwonych punktów w jądrach komórkowych, co wskazuje na skuteczne kierowanie sgRNA do specyficznych miejsc docelowych w jądrze komórkowym. Wizualizacja ta potwierdza, że ekspresja PCP-mCherry oraz dCas9 została uzyskana na odpowiednio wysokim poziomie, umożliwiając skuteczną detekcję i śledzenie sekwencji DNA w czasie rzeczywistym w żywych komórkach. Takie wyniki wskazują na stabilność konstruktu oraz jego zdolność do precyzyjnego monitorowania dynamiki pętli CTCF-CTCF w czasie rzeczywistym.



Rycina 29: Wizualizacja powtórzeń telomerowych w żywych komórkach w czasie rzeczywistym.

Wizualizację wykonano z w komórkach ES i NS linii $CTCF^{HALO}$, z wykorzystaniem Systemu CRISPR-Sirius w żywych komórkach. Zdjęcia zostały wykonane przy użyciu mikroskopu CD7 LSM900.

Kolejnym krokiem było opracowanie systemu wizualizacji umożliwiającego detekcję kotwic pętli chromatynowych w *locus Celf4*. Na tym etapie zaprojektowałam wektor kodujący zestaw 10 sgRNA kierowanych do wybranego obszaru w celu precyzyjnego zlokalizowania wiązań białka CTCF w żywych komórkach. Warunki eksperymentalne zostały zoptymalizowane pod kątem wydajności transfekcji oraz minimalizacji stresu komórkowego, który w przypadku dużych konstrukcji plazmidowych (~10 kbp) stanowił istotne ograniczenie.

W początkowej fazie oceny efektywności systemu korzystałam z testów typu „test-cut”, wykorzystujących enzymy restrykcyjne. Choć dawały one sygnał w przewidywanym regionie, ich ograniczona specyfika nie pozwalała na jednoznaczną interpretację wyników. Dopiero na późniejszym etapie badań, kiedy możliwe stało się przeprowadzenie sekwencjonowania konstrukcji plazmidowej (usługa sekwencjonowania długich odczytów była wcześniej niedostępna), ujawniono, że rzeczywista zawartość wektora odbiegała od pierwotnych założeń projektu. Skonstruowany wektor zawierał 8 sgRNA, z czego tylko 4 okazały się unikatowe, a pozostałe stanowiły powtórzenia. Mimo tych ograniczeń uzyskano wyraźną detekcję

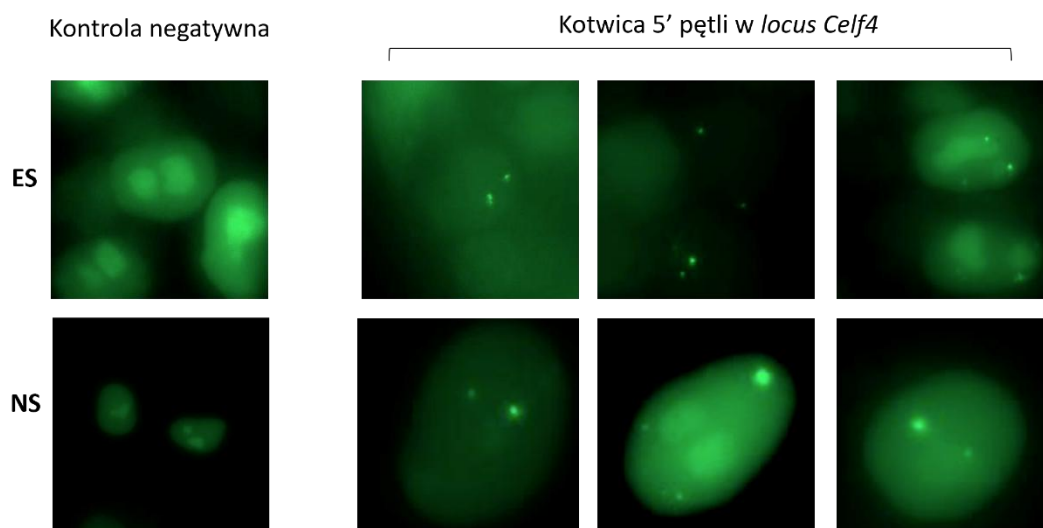
sygnału, co potwierdza funkcjonalność konstrukcji w jej podstawowym zakresie i wskazuje na możliwość wykorzystania jej zgodnie z pierwotnym założeniem.

Ostatecznie obserwacje te posłużyły jako punkt wyjścia do przeprojektowania układu oraz wnioski dotyczące konieczności wczesnej walidacji wektorów na poziomie sekwencji szczególnie w przypadku bardziej złożonych układów wieloskładnikowych.

W celu weryfikacji poprawności działania systemu, w pierwszej kolejności zdecydowałam się wprowadzić jedynie pojedynczy wektor zawierający sgRNA skierowane przeciw jednej z kotwic pętli CTCF-CTCF (5'). Po transfekcji komórek zaobserwowałam wyraźne, zielone sygnały punktowe w obrębie jąder komórkowych, wskazujące na obecność kotwicy pętli w *locus Celf4* (rycina 30).

Zielony sygnał odpowiadał za lokalizację w obrębie specyficznego miejsca w genomie, kotwicy 5' pętli CTCF-CTCF. Obecność tych punktów w komórkach ES i NS jest potwierdzeniem uzyskania uniwersalnego systemu wizualizacji, który pozwoli między innymi na ocenę przestrzennej organizacji chromatyny w różnych warunkach eksperymentalnych, co stanowiło ważny krok w kierunku zrozumienia, jak dynamika pętli CTCF zmienia się w czasie rzeczywistym w trakcie przejścia od komórek ES do bardziej zróżnicowanych komórek NS.

Za pomocą tej konfiguracji wizualizacji udało się również uzyskać wysokiej jakości obrazy czasowej. Zoptymalizowałam parametry mikroskopii tak, aby możliwe było uzyskanie stabilnego sygnału przy akwizycji obrazów co 5 minut, w seriach o interwale 500 ms. Umożliwiło to uzyskanie ciągłego zapisu zmian przestrzennej organizacji chromatyny, stanowiącego podstawę do szczegółowej analizy kinetyki pętli CTCF-CTCF. Zastosowane ustawienia systemu w przyszłości pozwolą na dokładne śledzenie interakcji między poszczególnymi regionami genomu w różnych stanach komórkowych, przyczyniając się tym samym do lepszego zrozumienia roli czynnika CTCF w regulacji przestrzennej organizacji chromatyny.



Rycina 30: Wizualizacja kotwicy 5' pętli CTCF-CTCF w locus Celf4.

Wizualizację wykonano w komórkach ES i NS linii CTCF^{HALO} z wykorzystaniem Systemu CRISPR-Sirius żywych komórkach. Zdjęcia zostały wykonane przy użyciu mikroskopu CD7 LSM900.

Podsumowanie części III

Opracowany system wizualizacji stanowi zaawansowane narzędzie umożliwiające badanie interakcji molekularnych w czasie rzeczywistym w żywych komórkach, między innymi takie jak kontakty elementów regulatorowych. Dzięki zastosowaniu technologii CRISPR-Sirius, opracowany system umożliwia precyzyjne śledzenie lokalizacji oraz zmian wajemnej interakcji CRE w genomie komórki. Kluczowym etapem podczas tworzenia linii eksperymentalnej jest integracja dCas9 z genomem, co zapewnia stabilne i specyficzne wiązanie się z wybranymi sekwencjami DNA za pośrednictwem sgRNA. Takie rozwiązanie pozwala na szybką i ukierunkowaną wizualizację wybranych *loci* genomowych w dalszych etapach eksperymentu, bez potrzeby ponownego wprowadzania systemu. W połączeniu z białkami fluorescencyjnymi, w tej pracy: EGFP i mCherry, system pozwala na wizualizację określonych *loci* genomowych z wysoką rozdzielczością, co zapewnia uzyskanie wysokiej jakości obrazów w czasie rzeczywistym, co ma kluczowe znaczenie dla analizy interakcji molekularnych w żywych komórkach.

Wyraźną zaletą systemu jest również możliwość wizualizacji dwóch punktów fluorescencyjnych znajdujących się w dalekich odległościach od siebie. Fakt ten stanowi znaczną przewagę opisanego systemu np. nad powszechną technologią FRET gdzie

wymóg bliskiej odległości fluorochromów ogranicza zakres zastosowania systemu. Dzięki implementacji systemu do stabilnej linii komórkowej, badacze zyskują możliwość wielokrotnego i szybkiego do osiągnięcia monitorowania interakcji molekularnych w różnych warunkach eksperymentalnych.

Dodatkowo w porównaniu do tradycyjnych metod, które zazwyczaj pozwalają na analizę pojedynczych interakcji lub wymagają skomplikowanej konstrukcji wielu wektorów, zastosowanie metody CARGO daje możliwość uproszczenia procesu eksperymentalnego. Ten fakt, czyni zaproponowany system szczególnie użyteczny w badaniach nad regulacją transkrypcji, czy architekturą chromatyny.

Podsumowując, opracowany system wizualizacji stanowi potężne narzędzie w badaniach nad interakcjami molekularnymi, oferując precyzyjność, elastyczność i możliwość wielokrotnego stosowania w różnych warunkach komórkowych. Jego zastosowanie może przyczynić się do głębszego zrozumienia mechanizmów regulacyjnych zachodzących w komórkach.

DYSKUSJA

Dotychczasowe badania wykazały, że białko CTCF pełni istotną rolę w organizacji przestrzennej struktury chromatyny m.in.: poprzez wyznaczanie granic TAD, regulując kontakty między CRE takimi jak: promotory czy wzmacniacze w konsekwencji kontrolując ekspresję genów (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012). Choć białko CTCF przez lata postrzegano jako czynnik o konserwatywnej i uniwersalnej funkcji, który wykazuje podobny mechanizm działania niezależnie od typu komórki czy gatunku coraz więcej danych sugeruje, że jego funkcja zależy lokalnego kontekstu epigenetycznego (Beagan et al., 2017; Narendra et al., 2015). Zgromadzone w ramach tej rozprawy wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że czynnik CTCF może pełnić dwie pozornie przeciwstawne funkcje: **i)** jako swoista antena wspierając kontakt wzmacniaczy z promotorami, tym samym zwiększając efektywność aktywacji genów (Kubo et al., 2021; Ren et al., 2017a), **ii)** z drugiej działać jako izolator blokując kontakty między elementami regulatorowymi i dzieląc genom na niezależne TAD (Bell et al., 1999b; Bower & Kvon, 2024; Jia et al., 2020).

Dane przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazują, że balans między tymi funkcjami białka CTCF jest zależny od typu komórkowego oraz epigenetycznego kontekstu danego *locus*, co podkreśla dynamiczny a zarazem komórkowo-specyficzny charakter działania białka CTCF. Uzyskane wyniki sugerują, że w trakcie różnicowania komórek ES do NS funkcja CTCF ulega istotnej zmianie. Po nagłej deplecji białka CTCF zaobserwowano odmienne profile transkrypcyjne w obu typach komórek co potwierdza, że rola białka CTCF nie jest uniwersalna, lecz silnie zależna od kontekstu epigenetycznego. W komórkach ES, białko CTCF częściej działa jak element wspierający aktywację, stabilizując kontakty między promotorem a wzmacniaczem i tym samym utrzymuje ekspresję genów kluczowych dla pluripotencji. Jednocześnie pełni funkcję izolatora, choć ta rola jest mniej dominująca w tym typie komórki. W komórkach NS trend działania czynnika CTCF jest odwrotny. Przeważa funkcja izolacyjna, która ogranicza niepożądane w tym typie komórki interakcje między CRE oraz chroni przed niewłaściwą aktywacją genów. Takie przesunięcie balansu funkcji białka CTCF pokazuje, że jego rola w regulacji genomu jest dynamiczna i dostosowana do kontekstu rozwojowego komórki.

Białko CTCF, mimo że wiąże się z DNA w sposób sekwencyjnie specyficzny nie jest klasycznym czynnikiem transkrypcyjnym, ponieważ nie posiada domeny transaktywacyjnej, a co za tym idzie, nie rekrutuje bezpośrednio kompleksu polimerazy RNA II ani nie inicjuje bezpośrednio procesu transkrypcji. Jego wpływ na ekspresję genów ma charakter pośredni i wynika z możliwości kształtowania architektury przestrzennej genomu. W tym kontekście białko CTCF działa jako czynnik architektoniczny utrzymujący granice domen TAD oraz stabilizujący pętle chromatynowe wytwarzane przez kompleks kohezyny (Sanborn et al., 2015; Rao et al., 2017). Ten architektoniczny aspekt roli białka CTCF zapewnia selektywny dostęp wzmacniaczy do odpowiednich promotorów, chroniąc jednocześnie przed niepożądanymi interakcjami między sąsiednimi domenami.

Wyniki uzyskane w komórkach ES i NS pokazują, że konserwatywne miejsca wiązania białka CTCF mogą pełnić odmienne funkcje w zależności od typu komórki, mimo identycznej sekwencji motywu i pozycji w genomie. Analiza lokalnych modyfikacji histonowych oraz dostępności chromatyny pokazała, że rola danego miejsca wiązania białka CTCF jest determinowana przez środowisko epigenetyczne w tym poziom acetylacji H3K27 obecność markerów aktywnych wzmacniaczy oraz interakcję z białkami wiążącymi. Te obserwacje są zgodne z doniesieniami w których wykazano, że aktywne wysokoacetylowane środowisko koreluje z funkcją czynnika CTCF jako elementu wspomagającego interakcje między CRE, natomiast regiony o niższej aktywności częściej pełnią funkcję graniczną i izolacyjną (Lee et al., 2023; Ren et al., 2017b).

Przedstawione dane potwierdzają dominujący model zależności funkcji CTCF od otoczenia epigenetycznego, ale jednocześnie wskazują, że architektura genomu zawiera elementy bardziej odporne na lokalne zmiany chromatyny oraz elementy zdolne do częściowego „przeskoczenia” izolacji czynnika CTCF.

Jednym z przykładów genów regulowanych przez CTCF w zależności od kontekstu epigenetycznego i typu komórki jest gen *Aldh1a3*. Po usunięciu CTCF ekspresja genu *Aldh1a3* wzrastała wyłącznie w komórkach NS, podczas gdy w komórkach ES nie zauważono zmiany ekspresji *Aldh1a3* po deplecji białka CTCF. Dane te potwierdzają komórkowo-specyficzny mechanizm regulacji zależny od białka CTCF. Dodatkowo, delecja specyficznego miejsca wiązania białka CTCF w *locus Aldh1a3* (jednego z trzech - w regionie 3') skutkowała istotnym wzrostem ekspresji genu *Aldh1a3*, jednak tylko

w komórkach NS. Obszar ten wykazywał cechy strukturalne typowe dla miejsc architektonicznych, co popiera również hipotezę, że białko CTCF pełni funkcję izolatora blokującego niepożądane interakcje między promotorem a wzmacniaczem w określonym stadium różnicowania.

W komórkach ES brak aktywacji genu *Aldh1a3* po delecji miejsca wiązania białka CTCF może wynikać z przestrzennej niezgodności w interakcji między CRE (promotorem genu *Aldh1a3*, a jego wzmacniaczami), które w naturalnych warunkach w komórkach NS współdziałają.

Aldh1a3 nie jest jedynym przykładem genu regulowanego przez białko CTCF w sposób zależny od typu komórki. W tej rozprawie doktorskiej przedstawiono kilka przykładów genów neuronalnych, których zwiększona ekspresja po deplecji CTCF w komórkach NS może wskazywać, że działanie czynnika CTCF jako izolatora ograniczającego kontakt aktywnych wzmacniaczy z promotorem.

W przypadku genów glejowych obserwowany jest natomiast spadek ekspresji po utracie białka CTCF, co sugeruje, że w tych *loci* białko CTCF pełni funkcję architektoniczną, stabilizując interakcje promotor-wzmacniacz lub w przypadku, gdy białko CTCF jest związane w miejscu wzmacniacza może pełnić funkcję anteny wspomagającej efektywny kontakt wzmacniacza z promotorem. Delecja czynnika CTCF prowadzi wówczas do dezintegracji lokalnej topologii chromatyny, osłabienia sygnałów aktywacyjnych a w konsekwencji zmniejszenia ekspresji oraz acetylacji H3K27. Takie obserwacje uzupełniają wyniki dotyczące *Aldh1a3*, gdzie brak aktywacji genu w komórkach ES po delecji białka CTCF wynikał najprawdopodobniej z niezgodności przestrzennej między promotorem a wzmacniaczami, które współdziałają w komórkach NS. Dane te sugerują, że białko CTCF pełni nie tylko funkcję izolatora, blokującego niepożądane interakcje, ale także działa jak "antena" rekrutująca sygnały lokalnych wzmacniaczy kierując je do właściwych promotorów w sposób zależny od kontekstu epigenetycznego i typu komórki.

Dane przedstawione w tej rozprawie doktorskiej sugerują, że balans między funkcją anteny wzmacniającej sygnały wzmacniaczy, a izolacyjną rolą białka CTCF zmienia się w trakcie różnicowania komórek, co jest istotne dla precyzyjnej regulacji ekspresji genów podczas różnicowania. W komórkach ES, CTCF współdziała głównie z czynnikami transkrypcyjnymi specyficznymi dla pluripotentności. Większość genów

reaguje obniżeniem ekspresji po delecji białka CTCF, co wskazuje, że funkcja „anteny” jest dominująca, natomiast funkcja izolatora jest obecna, lecz mniej wyraźna. Zgodnie z opublikowanymi danymi, dynamiczna i otwarta architektura chromatyny w komórkach ES ogranicza spontaniczne oddziaływanie wzmacniacza z promotorem. W konsekwencji usunięcie białka CTCF nie zawsze prowadzi do aktywacji genów (Lee et al., 2023). Natomiast, w komórkach NS pętle CTCF-CTCF są bardziej skonsolidowane a białko CTCF współdziała głównie z RBP. W tym kontekście funkcja izolatora dominuje, blokując niepożądane interakcje między promotorem a wzmacniaczem. Po delecji białka CTCF czyli w sytuacji zniesienia bariery izolacyjnej część genów ulega aktywacji (Beagan et al., 2017; Lee et al., 2023).

Przykład genu *Alh1a3* wskazuje, że pojedyncze miejsce wiązania białka CTCF może pełnić funkcję izolatora skutecznie blokując interakcje między promotorem a wzmacniaczem, które są niepożądane w określonym typie komórkowym. Dotychczas opisano jedynie nieliczne przypadki, w których tak wyraźna rola izolacyjna mogła być przypisana pojedynczemu motywowi CTCF, a jeszcze mniej danych wskazuje, że efekt ten może być ściśle zależny od typu komórki. (Gombert & Krumm, 2009; Pant et al., 2004). Odkrycia te podkreślają, że funkcja białka CTCF jest zależna od kontekstu komórkowego i strukturalnego, a jej działanie nie ogranicza się wyłącznie do tworzenia granic domen czy stabilizacji pętli. W tym miejscu rodzi się istotne pytanie: jakie czynniki molekularne modulują tę komórkowo-specyficzną aktywność czynnika CTCF. Coraz więcej dowodów wskazuje, że kluczową rolę mogą odgrywać RNA niekodujące, które wpływają na lokalną organizację chromatyny i interakcje białkowe.

Dotychczasowe badania wskazywały, że niektóre lncRNA takie jak: *RMST* czy *TUNA*, uczestniczą w neurogenezie głównie poprzez regulację transkrypcji lub interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi (Lin et al., 2014; Ng et al., 2013). Choć funkcjonalne znaczenie RNA w organizacji chromatyny było już wcześniej podkreślane, brakowało bezpośrednich dowodów pokazujących zależność architektonicznej aktywności białka CTCF od lncRNA (Hansen et al., 2019b; Saldaña-Meyer et al., 2014b). Przykładem takiej zależności jest *Jpx*, lncRNA działający w kontekście inaktywacji chromosomu X. *Jpx* wiąże się z białkiem CTCF, konkurując z DNA w granicach chromosomowych co umożliwia rozprzestrzenienie *Xist* i reorganizację struktury 3D chromosomu X (Sun et al., 2013; Tian et al., 2010). Takie obserwacje wskazują, że lncRNA pełnią wielowymiarową rolę

w organizacji przestrzennej genomu obejmując zarówno bezpośrednie wzmocnienie pętli, jak i modulację dostępności granic chromosomowych. Wyniki przedstawione w tej pracy rozszerzają wiedzę z poprzednich lat pokazując, że lncRNA mogą również działać jako elementy stabilizujące strukturalne kompleksy białkowe lub wiązania białko-DNA, które są znaczące dla przestrzennej organizacji genomu.

Istotnym aspektem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie zmian w molekularnych interakcjach białka CTCF podczas różnicowania komórek ES do NS ze szczególnym uwzględnieniem roli RNA oraz RBP. W ramach projektu OPU17 mgr Bondita Dehingia wykazała, że w komórkach NS dochodzi do wyraźnego wzmocnienia interakcji białka CTCF z RBP (Dehingia, Milewska-Puchala., et al., 2025). RBP stabilizują w komórkach NS skupiska białka CTCF wzmacniając jego wiązanie do DNA tym samym sprzyjając tworzeniu pętli, co odpowiada obserwowanemu globalnemu wzmocnieniu architektury chromatyny po utracie pluripotentności co zostało również opisane w naszej najnowszej publikacji (Dehingia, Milewska-Puchala., et al., 2025).

Jednym z kluczowych odkryć, do których przyczyniła się moja praca było to, że lncRNA *Pantr1* jest zaangażowane w regulację funkcji białka CTCF. *Pantr1* jest niezbędny do indukcji interakcji między CTCF a RBP w komórkach NS. W komórkach ES, gdzie ekspresja *Pantr1* jest niska, interakcje między białkiem CTCF a RBP są znacznie słabsze co przekłada się na ograniczoną aktywność izolacyjną chromatyny. Jednakże, nie wszystkie miejsca wiązania CTCF reagują jednakowo na brak *Pantr1* co wskazuje na lokalną specyficzność jej funkcji. Analizy Hi-C oraz ChIP-seq przeprowadzone w ramach projektu OPUS 17 przez mgr Bonditę Dehingię pokazały, że tylko część kotwic białka CTCF, szczególnie tych związanych z konsolidacją struktur chromatyny w komórkach NS traci stabilność po delecji *Pantr1*. Pętle osadzone w słabszych lub mniej aktywnych miejscach wiązania białka CTCF pozostają względnie odporne na utratę *Pantr1*.

Wnioski te mogą sugerować, że architektoniczna funkcja białka CTCF formuje się stopniowo podczas różnicowania, przy czym kompleksy z udziałem lncRNA takich jak *Pantr1* działają jako specyficzny „modulator” dla wybranych miejsc wiązania białka CTCF umożliwiając stabilizację kluczowych pętli chromatynowych w komórkach NS podczas gdy inne pętle pozostają względnie niezależne od *Pantr1*.

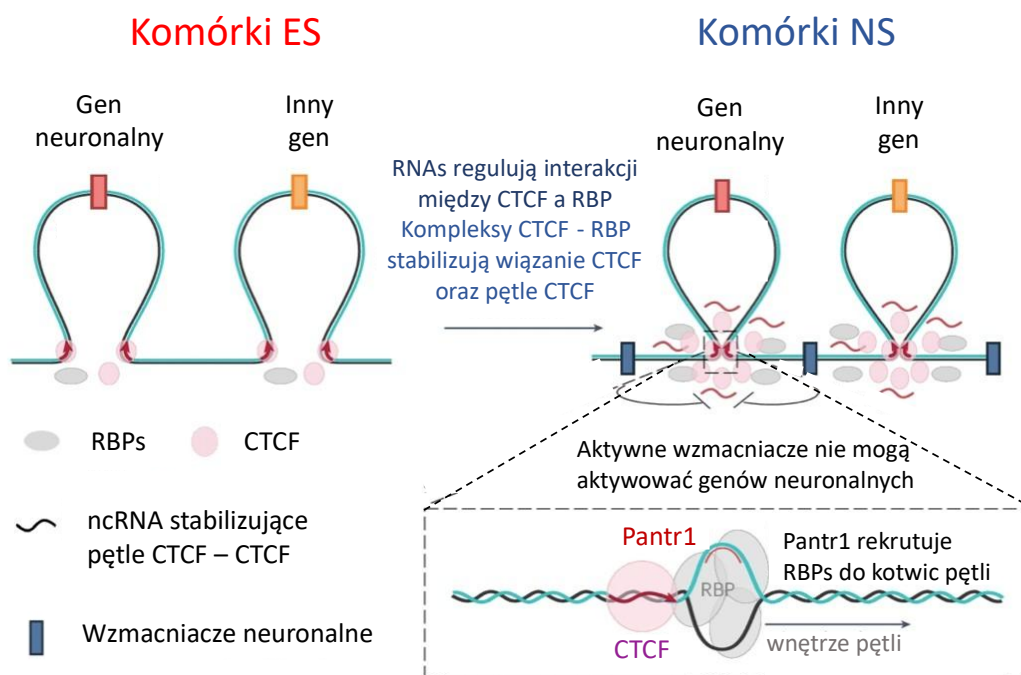
Utrata *Pantr1* wprawdzie nie prowadzi do osłabienia klastrów białka CTCF zależnych od RBP, ale zaburza zdolność białka CTCF do stabilizacji pętli chromatynowych.

Co istotne tego efektu nie kompensują inne lncRNA obecne w NS takie jak *Neat1* co wskazuje na funkcjonalną swoistość *Pantr1*. *Neat1*, mimo że wchodzi w interakcje z białkiem CTCF nie wspiera tworzenia interakcji między białkiem CTCF a RBP. Wyniki te wskazują, że działanie *Pantr1* jest miejscowo i funkcjonalnie wyspecjalizowane ograniczone do podzbioru kompleksów CTCF-RBP których *Neat1* nie jest w stanie stabilizować.

Motywy DNA bogate w guaniny, które wiąże CTCF, mają tendencję do tworzenia G-kwadrupleksów (G4q, z ang. *G-quadruplex*), specjalnych czterołańcuchowych struktur DNA powstających w sekwencjach bogatych w guaninę) oraz pętli R, struktur DNA-RNA, w których transkrypt RNA hybrydyzuje z jedną nicią DNA, wypychając drugą nić na zewnątrz co może zarówno wspierać wiązanie białka CTCF jak i wpływać na proces wydłużania pętli przez kompleks kohezyny. Natomiast, gdy G4q powstają bezpośrednio na miejscu rozpoznawanym przez białko CTCF, mogą utrudniać jego przyłączenie do DNA (Robinson et al., 2021; Wulfridge et al., 2023). Helikaza Ddx5 przeciwdziała powstawaniu G4q i pętli R a jej brak prowadzi do osłabienia pętli zakotwiczonych przez białko CTCF co wskazuje na jej podwójną rolę w usuwaniu G4q ułatwiających dostęp białka CTCF do DNA oraz w modulacji pętli R w pobliżu motywu CTCF (Wu et al., 2019). Jest więc możliwe, że *Pantr1* poprzez promowanie pętli R wzmacnianych przez G4q, sprzyja rekrutacji RBP, takich jak *Ddx5*, które tworzą kondensaty biomolekularne przy kotwicach pętli co prawdopodobnie spowalnia ruch kompleksu kohezyny stabilizując pętle architektoniczne.

Na podstawie powyższych obserwacji można zatem wyróżnić kilka etapów, w których *Pantr1* wpływa na stabilizację pętli chromatynowych w komórkach NS:

- 1. Wzrost ekspresji *Pantr1* w komórkach NS.** Podczas różnicowania komórek ES do NS poziom *Pantr1* rośnie, co uruchamia zmiany w architekturze chromatyny zależnej od białka CTCF.
- 2. *Pantr1* najprawdopodobniej promuje tworzenie pętli R-lncRNA.** Na podstawie obserwacji formułujemy hipotezę, że *Pantr1* może promować tworzenie pętli R, szczególnie w pobliżu miejsc wiązania CTCF.
- 3. *Pantr1* może sprzyjać rekrutacji rekrutację białek RBP do kotwic pętli.** Proponujemy model, gdzie pętle R zależne od *Pantr1* mogą pełnić funkcję platform rekrutacyjnych dla białek RBP (Ddx5 i FUS), które następnie tworzą kondensaty biomolekularne w obrębie miejsc wiązania CTCF.
- 4. Stabilizacja skupisk CTCF.** Obecność *Pantr1* + pętli R + RBP stabilizuje: i) klastry białka CTCF ii) wiązanie CTCF do DNA iii) kotwice pętli chromatynowych.



Rycina 31: CTCF, ncRNA i RBP wspólnie stabilizują strukturę chromatyny podczas różnicowania komórek ES do NS.

Schemat przedstawia reorganizację struktury chromatyny podczas różnicowania komórek ES do NS. W miarę postępu różnicowania obserwuje się (I) zwiększenie liczby pętli chromatynowych zakotwiczonych przez CTCF oraz (II) wzrost liczby interakcji pomiędzy białkiem CTCF a RBP. Niektóre niekodujące RNA (ncRNA) w tym lncRNA mogą stabilizować te kompleksy, wspierając konsolidację architektury chromatyny w komórkach NS. Rycina, przetłumaczona na język Polski, pochodzi z publikacji Dehingia, Milewska-Puchała et al., 2025.

Wyniki te wskazują, że lokalne, RNA-zależne wzmocnienie interakcji CTCF-RBP przez *Pantr1* jest przykładem szerszej zasady funkcjonowania białka CTCF w organizacji genomu. Czynniki CTCF funkcjonują jako centralni koordynator architektury genomu, którego działanie obejmuje zarówno klasyczną rolę izolatora, jak i ułatwienia kontaktów między promotorem a wzmacniaczem, w zależności od lokalnego kontekstu epigenetycznego i obecności partnerów białkowych. Kompleksy CTCF-RBP stabilizowane przez RNA pozwalają na elastyczne, czasowo kontrolowane kształtowanie przestrzennej organizacji chromatyny, umożliwiając precyzyjną regulację genów w trakcie różnicowania neuronalnego. Taka plastyczność funkcjonalna jest kluczowa dla

utrzymania równowagi między aktywacją, a wyciszeniem genów w komórkach w różnych stadiach rozwoju, zapewniając prawidłowy przebieg programów transkrypcyjnych i stabilizację struktury genomu. Z perspektywy klinicznej mechanizm ten jest szczególnie istotny, ponieważ heterozygotyczna utrata białka CTCF wiąże się z zaburzeniami neurorozwojowymi a komórki neuronalne tworzą wiele długo - zasięgowych pętli obejmujących loci chorób neuropsychiatrycznych. Otwiera to pytanie czy linia neuronalna w większym stopniu niż inne wymaga stabilnych interakcji dalekiego zasięgu (Gregor et al., 2013b).

Opisany model sugeruje kilka kierunków przyszłych badań. Przede wszystkim konieczne jest potwierdzenie istnienia kondensatów białkowo-RNA przy kotwicach pętli identyfikacja innych RNA współpracujących z białka CTCF, zrozumienie dynamiki G4q oraz pętli R a także ocena klinicznego znaczenia *Pantr1*, zwłaszcza w kontekście chorób neurorozwojowych. Jednocześnie przedstawiony model daje nowe możliwości od potencjalnych terapii ukierunkowanych na RNA i RBP po zaawansowaną inżynierię architektury genomu, która mogłaby pozwolić na precyzyjną regulację struktury i funkcji chromatyny w rozwoju i chorobie.

Rygorystyczna analiza tego modelu wymaga uwzględnienia kilku kluczowych kwestii i potencjalnych ograniczeń. Istotny jest fakt, iż istnienie kondensatów RBP-CTCF-RNA przy kotwicach pętli wymaga dalszego potwierdzenia, ponieważ dotychczasowe dane mają charakter pośredni (Hnisz et al., 2017; Sabari et al., 2018; Dehingia, Milewska-Puchala et al., 2025). Obserwacje wskazują, że białko CTCF, RBP i pętle R współwystępują w tych samych regionach chromatyny, a *Pantr1* zwiększa lokalne nagromadzenie RBP (Saldana-Meyer et al., 2019; Li et al., 2021). Te wyniki sugerują możliwość tworzenia kondensatów o charakterze ciekło-fazowym (LLPS), choć dalsze badania są potrzebne, aby bezpośrednio wykazać cechy typowe dla kondensatów ciekło-fazowych, takie jak dynamiczna wymiana cząsteczek, zdolność do koalescencji czy wrażliwość na 1,6-hexanodiol (Banani et al., 2017; Shin & Brangwynne, 2017). Obecnie brakuje bezpośrednich eksperymentów pokazujących te właściwości dla kompleksów CTCF-RNA-RBP. Zrozumienie, czy i w jaki sposób takie kondensaty powstają, jest kluczowe, by zrozumieć pozwoliłoby mechanizm stabilizacji pętli chromatynowych w komórkach neuronalnych (Bonev et al., 2017).

Znaczące jest również pytanie o bezpośredniość interakcji między CTCF i RNA. Wyniki mogą sugerować, że *Pantr1* wiąże białko CTCF i stabilizuje tym samym pętle pośrednio poprzez rekrutację RBP. Jednak niezależne badania wskazują, że ta interakcja może być bardziej złożona. Praca Huber'a i współpracowników z wykorzystaniem pojedynczo-molekularnego obrazowania pokazała, że domeny cynkowe białka CTCF mediuje klastrowanie białka, a to klastrowanie umożliwia rekrutację RNA i białek takich jak podjednostka SA kompleksu kohezyny, co wydłuża czas przebywania SA na chromatynie z nowych kotwicach TAD (Huber et al., 2024). To sugeruje, że czynnik CTCF może bezpośrednio rekrutować RNA, ale dzieje się to w kontekście klastrów białkowych a niekoniecznie poprzez prostą, bezpośrednią interakcję. Z drugiej strony, istnieje jawna krytyka teorii bezpośredniego wiązania CTCF z RNA. Guo, Blanco i Guttman zastosowali denaturujące puryfikacje (CLAP) po UV-crosslinkingu, gdzie nie wykryli stabilnych trwałych interakcji między białkiem CTCF a RNA w warunkach in vivo, co sugeruje, że wiele doniesień o bezpośrednim wiązaniu RNA przez białko CTCF może być artefaktem (J. K. Guo et al., 2024). Ich wyniki skłaniają do refleksji czy interakcje CTCF z RNA zaobserwowane w wielu eksperymentach, są rzeczywiście biologicznie istotne, czy może są zależne od warunków eksperymentalnych.

Z uwagi na obserwowane sprzeczności, przedstawiony model jest innowacyjny, ponieważ sugeruje komórkowo-specyficzny mechanizm w którym *Pantr1* w komórkach NS działa jako wzmacniacz architektury pętli CTCF, nie jako uniwersalny czynnik stabilizujący pętle, lecz jako mediator zależny od kontekstu epigenetycznego, czy typu komórki. Takie spojrzenie stanowi istotny krok w kierunku zrozumienia w jaki sposób funkcje CTCF są dynamicznie regulowane podczas rozwoju. Potwierdzenie przedstawionego modelu wymaga dalszych, ukierunkowanych eksperymentów. Po pierwsze, warto przeprowadzić eksperyment CLIP-seq (lub inne techniki crosslinkowania RNA-białko) w komórkach NS i ES uwzględniając mutacje *Pantr1*, w celu dokładnego zmapowania bezpośrednich miejsc interakcji między CTCF i RNA. Po drugie, badania typu knockdown lub knockout innych lncRNA obecnych w tych komórkach mogłyby ujawnić czy rekrutacja *Pantr1* do kompleksów CTCF-RBP jest rzeczywiście specyficzna, czy też inne lncRNA mogą pełnić podobną rolę w stabilizacji tych interakcji. Warto podkreślić, że takie podejście zostało uwzględnione w moim grancie Preludium 22, który

otrzymałam w 2024 roku (obecnie kierownikiem tego grantu jest mgr. Bondita Dehingia) co daje realną możliwość realizacji tych kluczowych eksperymentów.

Poza badaniami CLIP-seq i analizą funkcji innych lncRNA, istotnym krokiem będzie również analiza czasu i dynamiki powstawania pętli chromatynowych w trakcie różnicowania, np. przy użyciu Hi-C w seriach czasowych lub mikroskopii przyżyciowej.

Te podejście pozwoliłoby zrozumieć, kiedy i w jakim stopniu interakcje *Pantr1*-CTCF-RBP wpływają na kształtowanie granic TAD. Dodatkowo, biorąc pod uwagę, że stabilność pętli CTCF-CTCF może być modulowana przez inne elementy np. struktury G-kwadrupleks, czy struktury typu pętla R, należy również rozważyć eksperymenty, które testują wpływ takich struktur na zależność między białkiem CTCF a *Pantr1*.

Podsumowując, zaproponowany model daje istotny wkład w aktualną wiedzę w zakresie epigenetycznej regulacji genomu. Bazując na zebranych danych bardzo prawdopodobny jest mechanizm, gdzie lncRNA mogą modułować funkcje białka CTCF w sposób specyficzny dla typu komórki i etapu różnicowania, a nie jedynie jako ogólne „rusztowanie” pętli. Jednocześnie pełne potwierdzenie tego mechanizmu wymaga dalszych eksperymentów, które uwzględnią złożoność bezpośrednich i pośrednich interakcji oraz dynamikę architektury chromosomowej podczas rozwoju.

W celu dokładnego zbadania czasowo-przestrzennego aspektu regulacji białka CTCF konieczne jest zastosowanie technik pozwalających na obserwację architektury chromatyny oraz interakcji np: kotwicę pętli CTCF w czasie rzeczywistym, w żywych komórkach. Tradycyjne metody, takie jak FISH czy mikroskopia elektronowa, choć dostarczają szczegółowych informacji strukturalnych wymagają utrwalania komórek, co uniemożliwia obserwację tych procesów w czasie rzeczywistym. Nadzieję na pokonanie tych ograniczeń dają systemy oparte na dCas9 sprzężonym z białkami fluorescencyjnymi takimi jak GFP, umożliwiające nieinwazyjne znakowanie endogennych sekwencji DNA w żywych komórkach (T. W. Chen et al., 2013b). Techniki wzmacniania sygnału, takie jak SunTag, pozwalają na wizualizację pojedynczych loci nawet w mniej powtarzalnych obszarach genomu (Zhang et al., 2014.) Dzięki temu możliwe jest śledzenie ruchu i organizacji wybranych miejsc na chromosomach w czasie rzeczywistym (B. Chen et al., 2013; Ima et al., 2016; Gu et al., 2018). Zastosowanie tych systemów wizualizacji w modelach zwierzęcych (np. myszy transgeniczne z dCas9-EGFP) pozwala na śledzenie architektury genomu także in vivo (Duan et al., 2018). Mimo postępów, systemy takie

jak SunTag mają ograniczenia: efektywność sygnału w unikalnych regionach genomu jest niska, a konieczność ekspresji wielu białek fuzyjnych może wywoływać stres komórkowy, zaburzając naturalne procesy. W związku z tym nadal istnieje potrzeba konstruowania nowych systemów wizualizacyjnych, które będą nie tylko bardziej stabilne i czułe, ale także minimalizujące wpływ na funkcje komórkowe, jednocześnie pozwalając na monitorowanie chromosomów z wysoką rozdzielczością czasową i przestrzenną.

W odpowiedzi na przedstawione powyżej wyzwania, opracowałam przyżyciowy system wizualizacji konkretnych *locus* oparty na połączeniu technologii CRISPR-Sirius z metodą klonowania wielu sgRNA w jednym wektorze. Metoda CARGO znacząco wzmacnia sygnał fluorescencyjny, umożliwiając efektywną i nieinwazyjną obserwację wybranych *locus* genomowych w żywych komórkach bez wywoływania stresu komórkowego.

System CRISPR-Sirius, implementowany w niniejszej pracy, łączy technologię dCas9, amplifikację sygnału SunTag oraz wielokolorowe markery (EGFP, mCherry). Umożliwia to dynamiczne, wielopunktowe śledzenie wybranych regionów genomu w żywych komórkach bez utrwalania, co pozwala obserwować kontakty między promotorem a wzmacniacz w ich naturalnym środowisku i czasie. System jest elastyczny dzięki łatwej modyfikacji sgRNA co umożliwia stosowanie go w różnych modelach i długotrwałych eksperymentach.

CRISPR-Sirius pozwala precyzyjnie śledzić molekularne interakcje, kluczowe dla zrozumienia zmian w architekturze chromatyny i regulacji transkrypcyjnej. Amplifikacja sygnału poprzez SunTag i aptamery RNA (np. MS2/PP7) umożliwia wizualizację unikalnych regionów genomu, a wielokolorowe markery pozwalają monitorować wiele *loci* jednocześnie.

Implementacja w stabilnych liniach komórkowych zwiększa powtarzalność i umożliwia długoterminowe obserwacje, przewyższając tradycyjne metody wymagające złożonych modyfikacji genetycznych. System ten otwiera nowe możliwości badań dynamicznej przestrzennej struktury genomu podczas różnicowania komórek, odpowiedzi na bodźce np. stresowe oraz procesów chorobowych, stanowiąc cenne uzupełnienie istniejących metod.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przeprowadzone badania w ramach niniejszej rozprawy wykazały, że:

1. Utrata białka CTCF prowadzi do komórkowo-specyficzných zmian w ekspresji genów

Usunięcie białka CTCF w komórkach ES i NS powoduje deregulację ekspresji genów, przy czym efekt jest zależny od typu komórki. W komórkach ES przeważają geny o obniżonej ekspresji, natomiast w NS geny o zwiększonej ekspresji.

2. CTCF działa jako izolator w *locus Aldh1a3* w komórkach NS

Przykładem genu deregulowanego tylko w komórkach NS podczas utraty białka CTCF jest gen *Aldh1a3*. Usunięcie specyficznego miejsca wiązania CTCF w tym *locus* 3' końcowego, znacząco zwiększa ekspresję genu w komórkach NS. To miejsce jako jedyne z trzech występujących w *locus Aldh1a3* pełni funkcję architektoniczną. W tym przypadku CTCF działa jako izolator, blokując kontakt promotora z potencjalnymi wzmacniaczami. W komórkach ES brak aktywacji *Aldh1a3* może wynikać z niekompatybilności między wzmacniaczami aktywnymi wokół tego *locus* a promotorem *Aldh1a3*.

3. lncRNA i RBP mogą wzmacniać funkcję białka CTCF podczas różnicowania

W trakcie różnicowania komórek ES do komórek NS, obserwuje się zmianę ilości lncRNA, które mogą oddziaływać z czynnikiem CTCF i białkami wiążącymi RNA (RBP), takimi jak Ddx5 i FUS. Jednym z badanych lncRNA jest *Pantr1*, który mógłby stabilizować kompleks CTCF-RBP i wspierać tworzenie pętli chromatynowych.

4. CTCF wraz z białkami wiążącymi RNA i lncRNA wspiera utrzymanie represji genów neuronalnych w komórkach NS.

Konsolidacja struktury chromatyny przez wzmocnienie granic TAD i pętli architektonicznych zakotwiczonych przez białko CTCF jest czynnikiem stabilizującym tożsamość komórki NS co podkreśla znaczenie zarówno trójwymiarowej organizacji struktury chromatyny, jak funkcji białka CTCF w regulacji ekspresji genów w różnicowaniu.

BIBLIOGRAFIA

1. Adriaens, C., Serebryanny, L. A., Feric, M., Schibler, A., Meaburn, K. J., Kubben, N., Trzaskoma, P., Shachar, S., Vidak, S., Finn, E. H., Sood, V., Pegoraro, G., & Misteli, T. (2018). Blank spots on the map: some current questions on nuclear organization and genome architecture. *Histochemistry and Cell Biology*, 150(6), 579. <https://doi.org/10.1007/S00418-018-1726-1>
2. Anton, T., Bultmann, S., Leonhardt, H., & Markaki, Y. (2014). Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 5(2), 163-172. <https://doi.org/10.4161/NUCL.28488>
3. Arzate-Mejía, R. G., Recillas-Targa, F., & Corces, V. G. (2018a). Developing in 3D: the role of CTCF in cell differentiation. *Development (Cambridge, England)*, 145(6). <https://doi.org/10.1242/DEV.137729>
4. Arzate-Mejía, R. G., Recillas-Targa, F., & Corces, V. G. (2018b). Developing in 3D: The role of CTCF in cell differentiation. *Development (Cambridge)*, 145(6). <https://doi.org/10.1242/DEV.137729/48856>
5. Bai, X., Tang, X., Wang, Y., Yue, S., Xu, X., Hu, P., Xu, J., Li, Y., Wang, J., Tao, H., Zheng, Y., Chen, B., Tian, M., Lin, L., Wang, R., Sun, Y., Ren, C., Bo, X., Li, H., ... Lu, M. (2025). The hierarchical folding dynamics of topologically associating domains during early embryo development. *BMC Biology* 2025 23:1, 23(1), 175-. <https://doi.org/10.1186/S12915-025-02259-Y>
6. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., & Rosen, M. K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2017 18:5, 18(5), 285-298. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>
7. Banerji, J., Rusconi, S., & Schaffner, W. (1981). Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 27(2 PART 1), 299-308. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90413-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90413-X)
8. Baralle, F. E., & Giudice, J. (2017). Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(7), 437-451. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.27>

9. Barsanti, L., Birindelli, L., Sbrana, F., Lombardi, G., Gualtieri, P., Barsanti, L., Birindelli, L., Sbrana, F., Lombardi, G., & Gualtieri, P. (2023). Advanced Microscopy Techniques for Molecular Biophysics. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, 24(12). <https://doi.org/10.3390/IJMS24129973>
10. Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., & Zhao, K. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, 129(4), 823-837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
11. Beagan, J. A., Duong, M. T., Titus, K. R., Zhou, L., Cao, Z., Ma, J., Lachanski, C. V., Gillis, D. R., & Phillips-Cremins, J. E. (2017). YY1 and CTCF orchestrate a 3D chromatin looping switch during early neural lineage commitment. *Genome Research*, 27(7), 1139-1152. <https://doi.org/10.1101/GR.215160.116/-/DC1>
12. Bell, A. C., & Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*, 405(6785), 482-485. <https://doi.org/10.1038/35013100>
13. Bell, A. C., West, A. G., & Felsenfeld, G. (1999a). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*, 98(3), 387-396. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81967-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81967-4)
14. Benabdallah, N. S., Williamson, I., Illingworth, R. S., Kane, L., Boyle, S., Sengupta, D., Grimes, G. R., Therizols, P., & Bickmore, W. A. (2019). Decreased Enhancer-Promoter Proximity Accompanying Enhancer Activation. *Molecular Cell*, 76(3), 473-484.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.038>
15. Bonev, B., & Cavalli, G. (2016). Organization and function of the 3D genome. *Nature Reviews. Genetics*, 17(11), 661-678. <https://doi.org/10.1038/NRG.2016.112>
16. Bonev, B., Mendelson Cohen, N., Szabo, Q., Fritsch, L., Papadopoulos, G. L., Lubling, Y., Xu, X., Lv, X., Hugnot, J. P., Tanay, A., & Cavalli, G. (2017a). Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development. *Cell*, 171(3), 557-572.e24. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.09.043>
17. Bower, G., & Kvon, E. Z. (2024). Genetic factors mediating long-range enhancer-promoter communication in mammalian development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 90, 102282. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2024.102282>

18. Buenrostro, J. D., Wu, B., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2015). ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide. *Current Protocols in Molecular Biology*, 109, 21.29.1-21.29.9. <https://doi.org/10.1002/0471142727.MB2129S109>
19. Bulger, M., & Groudine, M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*, 144(3), 327. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.01.024>
20. Cerase, A., Pintacuda, G., Tattermusch, A., & Avner, P. (2015). Xist localization and function: new insights from multiple levels. *Genome Biology* 2015 16:1, 16(1), 166-. <https://doi.org/10.1186/S13059-015-0733-Y>
21. 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. (2013a). 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>
22. Chen, L., Cao, W., Aita, R., Aldea, D., Flores, J., Gao, N., Bonder, E. M., Ellison, C. E., & Verzi, M. P. (2021). Three-dimensional interactions between enhancers and promoters during intestinal differentiation depend upon HNF4. *Cell Reports*, 34(4), 108679. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.108679>
23. Chen, T. W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K., & Kim, D. S. (2013a). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295-300. <https://doi.org/10.1038/NATURE12354;SUBJMETA>
24. Chen, Z., Snetkova, V., Bower, G., Jacinto, S., Clock, B., Dizehchi, A., Barozzi, I., Mannion, B. J., Alcaina-Caro, A., Lopez-Rios, J., Dickel, D. E., Visel, A., Pennacchio, L. A., & Kvon, E. Z. (2024a). Increased enhancer-promoter interactions during developmental enhancer activation in mammals. *Nature Genetics*, 56(4), 675-685. <https://doi.org/10.1038/S41588-024-01681-2>
25. Concordet, J. P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W242-W245. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY354>
26. Cremer, M., Hase, J. V., Volm, T., Brero, A., Kreth, G., Walter, J., Fischer, C., Solovei, I., Cremer, C., & Cremer, T. (2001). Non-random radial higher-order chromatin

- arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Research : An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 9(7), 541-567. <https://doi.org/10.1023/A:1012495201697>
27. Cremer, T., Kurz, A., Zirbel, R., Dietzel, S., Rinke, B., Schrock, E., Speicher, M. R., Mathieu, U., Jauch, A., Emmerich, P., Scherthan, H., Ried, T., Cremer, C., & Lichter, P. (1993). Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 58, 777-792. <https://doi.org/10.1101/SQB.1993.058.01.085>
 28. Davidson, E. H., & Erwin, D. H. (2006). Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5762), 796-797. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1113832>
 29. de Wit, E. (2019). Gene Regulation Knows Its Boundaries. *Trends in Genetics : TIG*, 35(12), 883-885. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2019.09.002>
 30. Dehingia, B., Milewska, M., Janowski, M., & Pękowska, A. (2022). CTCF shapes chromatin structure and gene expression in health and disease . *EMBO Reports*, 23(9). <https://doi.org/10.15252/EMBR.202255146;WEBSITE:WEBSITE:EMBO-SITE;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
 31. Dehingia, B., Milewska-Puchała, M., Janowski, M., Rafiee, M. R., Abbas, M., Piotrowska, A., Senge, J., Blaut, P., Walsh, D., Severino, J., Chaudhury, D., Iqbal, S., Montiel-Manriquez, R., Jankowska, S., Zare, P., Huber, W., Xu, J., Casellas, R., Zimmermann, T., ... Pękowska, A. (2025). RNA-binding proteins mediate the maturation of chromatin topology during differentiation. *Nature Cell Biology*, 27(9), 1510-1525. <https://doi.org/10.1038/S41556-025-01735-5;TECHMETA>
 32. Dekker, J., & Mirny, L. (2016a). The 3D genome as moderator of chromosomal communication. *Cell*, 164(6), 1110. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.02.007>
 33. Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., & Kleckner, N. (2002). Capturing chromosome conformation. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5558), 1306-1311. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1067799>
 34. Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J. K., Shi, Y., & Yan, N. (2012). Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6069), 720-723. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1215670>

35. Despagne, A., Schöpflin, R., Franke, M., Ali, S., Jerković, I., Paliou, C., Chan, W. L., Timmermann, B., Wittler, L., Vingron, M., Mundlos, S., & Ibrahim, D. M. (2019a). Functional dissection of the Sox9-Kcnj2 locus identifies nonessential and instructive roles of TAD architecture. *Nature Genetics*, 51(8), 1263-1271. <https://doi.org/10.1038/S41588-019-0466-Z>
36. Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. S., & Ren, B. (2012a). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 2012 485:7398, 485(7398), 376-380. <https://doi.org/10.1038/nature11082>
37. Douthwright, S., & Sluder, G. (2017). Live Cell Imaging: Assessing the Phototoxicity of 488 and 546 nm Light and Methods to Alleviate it. *Journal of Cellular Physiology*, 232(9), 2461-2468. <https://doi.org/10.1002/JCP.25588>
38. Duan, J., Lu, G., Hong, Y., Hu, Q., Mai, X., Guo, J., Si, X., Wang, F., & Zhang, Y. (2018). Live imaging and tracking of genome regions in CRISPR/dCas9 knock-in mice. *Genome Biology*, 19(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/S13059-018-1530-1/FIGURES/2>
39. Ea, V., Baudement, M. O., Lesne, A., & Forné, T. (2015). Contribution of Topological Domains and Loop Formation to 3D Chromatin Organization. *Genes*, 6(3), 734. <https://doi.org/10.3390/GENES6030734>
40. Eils, R., Dietzel, S., Bertin, E., Schröck, E., Speicher, M. R., Ried, T., Robert-Nicoud, M., Cremer, C., & Cremer, T. (1996). Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *The Journal of Cell Biology*, 135(6 Pt 1), 1427-1440. <https://doi.org/10.1083/JCB.135.6.1427>
41. Engreitz, J. M., Pandya-Jones, A., McDonel, P., Shishkin, A., Sirokman, K., Surka, C., Kadri, S., Xing, J., Goren, A., Lander, E. S., Plath, K., & Guttman, M. (2013). The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6147). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1237973>
42. Fang, C., Huang, Y., & Zhao, Y. (2023). Review of FRET biosensing and its application in biomolecular detection. *American Journal of Translational Research*, 15(2), 694. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10006758/>

43. Fedoriw, A. M., Stein, P., Svoboda, P., Schultz, R. M., & Bartolomei, M. S. (2004). Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5655), 238-240. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1090934>
44. Feric, M., & Misteli, T. (2021). Phase separation in genome organization across evolution. *Trends in Cell Biology*, 31(8), 671-685. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.03.001>
45. Filippova, G. N., Fagerlie, S., Klenova, E. M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P. E., Collins, S. J., & Lobanenko, V. V. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 2802-2813. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.6.2802>
46. Franke, M., Ibrahim, D. M., Andrey, G., Schwarzer, W., Heinrich, V., Schöpflin, R., Kraft, K., Kempfer, R., Jerković, I., Chan, W. L., Spielmann, M., Timmermann, B., Wittler, L., Kurth, I., Cambiaso, P., Zuffardi, O., Houge, G., Lambie, L., Brancati, F., ... Mundlos, S. (2016a). Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. *Nature*, 538(7624), 265-269. <https://doi.org/10.1038/NATURE19800>
47. 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>
48. Gallagher, M. D., Posavi, M., Huang, P., Unger, T. L., Berlyand, Y., Gruenewald, A. L., Chesi, A., Manduchi, E., Wells, A. D., Grant, S. F. A., Blobel, G. A., Brown, C. D., & Chen-Plotkin, A. S. (2017). A Dementia-Associated Risk Variant near TMEM106B Alters Chromatin Architecture and Gene Expression. *American Journal of Human Genetics*, 101(5), 643. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2017.09.004>
49. 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>
50. Ghavi-Helm, Y., Klein, F. A., Pakozdi, T., Ciglar, L., Noordermeer, D., Huber, W., & Furlong, E. E. M. (2014). Enhancer loops appear stable during development and are

- associated with paused polymerase. *Nature*, 512(7512), 96-100.
<https://doi.org/10.1038/NATURE13417>
51. Ghirlando, R., & Felsenfeld, G. (2016). CTCF: making the right connections. *Genes & Development*, 30(8), 881-891. <https://doi.org/10.1101/GAD.277863.116>
 52. Girdhar, K., Hoffman, G. E., Bendl, J., Rahman, S., Dong, P., Liao, W., Hauberg, M. E., Sloofman, L., Brown, L., Devillers, O., Kassim, B. S., Wiseman, J. R., Park, R., Zharovsky, E., Jacobov, R., Flatow, E., Kozlenkov, A., Gilgenast, T., Johnson, J. S., ... Akbarian, S. (2022). Chromatin domain alterations linked to 3D genome organization in a large cohort of schizophrenia and bipolar disorder brains. *Nature Neuroscience*, 25(4), 474. <https://doi.org/10.1038/S41593-022-01032-6>
 53. Golan-Mashiach, M., Grunspan, M., Emmanuel, R., Gibbs-Bar, L., Dikstein, R., & Shapiro, E. (2012). Identification of CTCF as a master regulator of the clustered protocadherin genes. *Nucleic Acids Research*, 40(8), 3378-3391. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR1260>
 54. Gombert, W. M., & Krumm, A. (2009). Targeted deletion of multiple CTCF-binding elements in the human C-MYC gene reveals a requirement for CTCF in C-MYC expression. *PloS One*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006109>
 55. Gregor, A., Oti, M., Kouwenhoven, E. N., Hoyer, J., Sticht, H., Ekici, A. B., Kjaergaard, S., Rauch, A., Stunnenberg, H. G., Uebe, S., Vasileiou, G., Reis, A., Zhou, H., & Zweier, C. (2013a). De novo mutations in the genome organizer CTCF cause intellectual disability. *American Journal of Human Genetics*, 93(1), 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.05.007>
 56. Gu, Y., Wang, R., Han, Y., Zhou, W., Zhao, Z., Chen, T., Zhang, Y., Peng, F., Liang, H., Qi, L., Zhao, W., Yang, D., & Guo, Z. (2018). A landscape of synthetic viable interactions in cancer. *Briefings in Bioinformatics*, 19(4), 644-655. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw142>
 57. Guo, J. K., Blanco, M. R., Walkup, W. G., Bonesteele, G., Urbinati, C. R., Banerjee, A. K., Chow, A., Ettlin, O., Strehle, M., Peyda, P., Amaya, E., Trinh, V., & Guttman, M. (2024). Denaturing purifications demonstrate that PRC2 and other widely reported chromatin proteins do not appear to bind directly to RNA in vivo. *Molecular Cell*, 84(7), 1271-1289.e12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.01.026>

58. Guttman, M., & Rinn, J. L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*, 482(7385), 339-346. <https://doi.org/10.1038/NATURE10887>
59. Hacisuleyman, E., Goff, L. A., Trapnell, C., Williams, A., Henao-Mejia, J., Sun, L., McClanahan, P., Hendrickson, D. G., Sauvageau, M., Kelley, D. R., Morse, M., Engreitz, J., Lander, E. S., Guttman, M., Lodish, H. F., Flavell, R., Raj, A., & Rinn, J. L. (2014a). Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(2), 198-206. <https://doi.org/10.1038/NSMB.2764>
60. Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 62(2), 465-503. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.465-503.1998>
61. Han, J. W., & Yoon, Y. S. (2012). Epigenetic Landscape of Pluripotent Stem Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(2), 205. <https://doi.org/10.1089/ARS.2011.4375>
62. Hashimoto, H., Wang, D., Horton, J. R., Zhang, X., Corces, V. G., & Cheng, X. (2017a). Structural Basis for the Versatile and Methylation-Dependent Binding of CTCF to DNA. *Molecular Cell*, 66(5), 711-720.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.004>
63. Hawkins, R. D., Hon, G. C., Lee, L. K., Ngo, Q., Lister, R., Pelizzola, M., Edsall, L. E., Kuan, S., Luu, Y., Klugman, S., Antosiewicz-Bourget, J., Ye, Z., Espinoza, C., Agarwahl, S., Shen, L., Ruotti, V., Wang, W., Stewart, R., Thomson, J. A., ... Ren, B. (2010). Distinct Epigenomic Landscapes of Pluripotent and Lineage-committed Human Cells. *Cell Stem Cell*, 6(5), 479. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2010.03.018>
64. He, X., Tan, Y., Feng, Y., Sun, Y., & Ma, H. (2024). Tracking pairwise genomic loci by the ParB-ParS and Noc-NBS systems in living cells. *Nucleic Acids Research*, 52(9), 4922-4934. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAE134>
65. Heath, H., De Almeida, C. R., Sleutels, F., Dingjan, G., Van De Nobelen, S., Jonkers, I., Ling, K. W., Gribnau, J., Renkawitz, R., Grosveld, F., Hendriks, R. W., & Galjart, N. (2008). CTCF regulates cell cycle progression of $\alpha\beta$ T cells in the thymus. *The EMBO Journal*, 27(21), 2839. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2008.214>
66. Hernández-Hernández, A., Soto-Reyes, E., Ortiz, R., Arriaga-Canon, C., Echeverría-Martínez, O. M., Vázquez-Nin, G. H., & Recillas-Targa, F. (2012). Changes of the

- Nucleolus Architecture in Absence of the Nuclear Factor CTCF. *Cytogenetic and Genome Research*, 136(2), 89-96. <https://doi.org/10.1159/000335752>
67. Hirayama, T., Tarusawa, E., Yoshimura, Y., Galjart, N., & Yagi, T. (2012). CTCF Is Required for Neural Development and Stochastic Expression of Clustered Pcdh Genes in Neurons. *Cell Reports*, 2(2), 345-357. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.06.014>
 68. Hirose, T., Yamazaki, T., & Nakagawa, S. (2019). Molecular anatomy of the architectural NEAT1 noncoding RNA: The domains, interactors, and biogenesis pathway required to build phase-separated nuclear paraspeckles. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 10(6). <https://doi.org/10.1002/WRNA.1545>
 69. Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R. A., Chakraborty, A. K., & Sharp, P. A. (2017). A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell*, 169(1), 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.007>
 70. Hou, C., Dale, R., & Dean, A. (2010). Cell type specificity of chromatin organization mediated by CTCF and cohesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3651-3656. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0912087107>
 71. Icha, J., Weber, M., Waters, J. C., & Norden, C. (2017). Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 39(8). <https://doi.org/10.1002/BIES.201700003>
 72. Ing-Simmons, E., Seitan, V. C., Faure, A. J., Flicek, P., Carroll, T., Dekker, J., Fisher, A. G., Lenhard, B., & Merckenschlager, M. (2015). Spatial enhancer clustering and regulation of enhancer-proximal genes by cohesin. *Genome Research*, 25(4), 504-513. <https://doi.org/10.1101/GR.184986.114>
 73. Islam, Z., Saravanan, B., Walavalkar, K., Farooq, U., Singh, A. K., Sabarinathan, R., Thakur, J., Pandit, A., Henikoff, S., & Notani, D. (2023). Active enhancers strengthen insulation by RNA-mediated CTCF binding at chromatin domain boundaries. *Genome Research*, 33(1), 1-17. <https://doi.org/10.1101/GR.276643.122>
 74. Jia, Z., Li, J., Ge, X., Wu, Y., Guo, Y., & Wu, Q. (2020). Tandem CTCF sites function as insulators to balance spatial chromatin contacts and topological enhancer-

- promoter selection. *Genome Biology* 2020 21:1, 21(1), 75-.
<https://doi.org/10.1186/S13059-020-01984-7>
75. Kaaij, L. T. J., van de Wetering, M., Fang, F., Decato, B., Molaro, A., van de Werken, H. J. G., van Es, J. H., Schuijers, J., de Wit, E., de Laat, W., Hannon, G. J., Clevers, H. C., Smith, A. D., & Ketting, R. F. (2013). DNA methylation dynamics during intestinal stem cell differentiation reveals enhancers driving gene expression in the villus. *Genome Biology* 2013 14:5, 14(5), R50-. <https://doi.org/10.1186/GB-2013-14-5-R50>
 76. Kamiyama, D., & Huang, B. (2012). Development in the STORM. *Developmental Cell*, 23(6), 1103-1110. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2012.10.003>
 77. Kentepozidou, E., Aitken, S. J., Feig, C., Stefflova, K., Ibarra-Soria, X., Odom, D. T., Roller, M., & Flicek, P. (2020). Clustered CTCF binding is an evolutionary mechanism to maintain topologically associating domains. *Genome Biology* 2020 21:1, 21(1), 5-. <https://doi.org/10.1186/S13059-019-1894-X>
 78. Kim, Y. J., Lee, M., Lee, Y. T., Jing, J., Sanders, J. T., Botten, G. A., He, L., Lyu, J., Zhang, Y., Mettlen, M., Ly, P., Zhou, Y., & Xu, J. (2023). Light-activated macromolecular phase separation modulates transcription by reconfiguring chromatin interactions. *Science Advances*, 9(13). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ADG1123>
 79. Konrad, E. D. H., Nardini, N., Caliebe, A., Nagel, I., Young, D., Horvath, G., Santoro, S. L., Shuss, C., Ziegler, A., Bonneau, D., Kempers, M., Pfundt, R., Legius, E., Bouman, A., Stuurman, K. E., Öunap, K., Pajusalu, S., Wojcik, M. H., Vasileiou, G., ... Zweier, C. (2019). CTCF variants in 39 individuals with a variable neurodevelopmental disorder broaden the mutational and clinical spectrum. *Genetics in Medicine*, 21(12), 2723-2733. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0585-z>
 80. Kubo, N., Ishii, H., Xiong, X., Bianco, S., Meitinger, F., Hu, R., Hocker, J. D., Conte, M., Gorkin, D., Yu, M., Li, B., Dixon, J. R., Hu, M., Nicodemi, M., Zhao, H., & Ren, B. (2021). Promoter-proximal CTCF binding promotes distal enhancer-dependent gene activation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 28(2), 152-161. <https://doi.org/10.1038/S41594-020-00539-5>
 81. La Rosa, P., Bielli, P., Compagnucci, C., Cesari, E., Volpe, E., Vecchioli, S. F., & Sette, C. (2016). Sam68 promotes self-renewal and glycolytic metabolism in mouse neural

- progenitor cells by modulating Aldh1a3 pre-mRNA 3'-end processing. *ELife*, 5(NOVEMBER2016). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.20750>
82. Lakadamyali, M. (2024). From feulgen to modern methods: marking a century of DNA imaging advances. *Histochemistry and Cell Biology* 2024 162:1, 162(1), 13-22. <https://doi.org/10.1007/S00418-024-02291-Z>
 83. Lan, X., Witt, H., Katsumura, K., Ye, Z., Wang, Q., Bresnick, E. H., Farnham, P. J., & Jin, V. X. (2012). Integration of Hi-C and ChIP-seq data reveals distinct types of chromatin linkages. *Nucleic Acids Research*, 40(16), 7690. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS501>
 84. Lange, C., Turrero Garcia, M., Decimo, I., Bifari, F., Eelen, G., Quaegebeur, A., Boon, R., Zhao, H., Boeckx, B., Chang, J., Wu, C., Le Noble, F., Lambrechts, D., Dewerchin, M., Kuo, C. J., Huttner, W. B., & Carmeliet, P. (2016). Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis. *The EMBO Journal*, 35(9), 924-941. https://doi.org/10.15252/EMBJ.201592372/SUPPL_FILE/EMBJ201592372-SUP-0003-SDAPPENDIXFIGS3A.ZIP
 85. Lee, H. K., Willi, M., Liu, C., & Hennighausen, L. (2023). Cell-specific and shared regulatory elements control a multigene locus active in mammary and salivary glands. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 4992-. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40712-0>
 86. Lettice, L. A., Heaney, S. J. H., Purdie, L. A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B. A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R. E., & de Graaff, E. (2003). A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Human Molecular Genetics*, 12(14), 1725-1735. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDG180>
 87. Levine, M. E., Lu, A. T., Quach, A., Chen, B. H., Assimes, T. L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A. A., Stewart, J. D., Li, Y., Whitsel, E. A., Wilson, J. G., Reiner1, A. P., Aviv1, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L., & Horvath, S. (2018). An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY)*, 10(4), 573. <https://doi.org/10.18632/AGING.101414>
 88. Levine, M., & Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, 424(6945), 147-151. <https://doi.org/10.1038/NATURE01763;KWRD>

89. Li, G., Fullwood, M. J., Xu, H., Mulawadi, F. H., Velkov, S., Vega, V., Ariyaratne, P. N., Mohamed, Y. Bin, Ooi, H. S., Tennakoon, C., Wei, C. L., Ruan, Y., & Sung, W. K. (2010). ChIA-PET tool for comprehensive chromatin interaction analysis with paired-end tag sequencing. *Genome Biology* 2010 11:2, 11(2), R22-. <https://doi.org/10.1186/GB-2010-11-2-R22>
90. Li, X., An, Z., Zhang, W., & Li, F. (2023). Phase Separation: Direct and Indirect Driving Force for High-Order Chromatin Organization. *Genes*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/GENES14020499>
91. Li, Y., Haarhuis, J. H. I., Sedeño Cacciatore, Á., Oldenkamp, R., van Ruiten, M. S., Willems, L., Teunissen, H., Muir, K. W., de Wit, E., Rowland, B. D., & Panne, D. (2020b). The structural basis for cohesin-CTCF-anchored loops. *Nature* 2020 578:7795, 578(7795), 472-476. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1910-z>
92. Lieberman-Aiden, E., Van Berkum, N. L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B. R., Sabo, P. J., Dorschner, M. O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M. A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L. A., Lander, E. S., & Dekker, J. (2009a). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5950), 289-293. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1181369>
93. Lin, N., Chang, K. Y., Li, Z., Gates, K., Rana, Z. A., Dang, J., Zhang, D., Han, T., Yang, C. S., Cunningham, T. J., Head, S. R., Duester, G., Dong, P. D. S., & Rana, T. M. (2014). An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment. *Molecular Cell*, 53(6), 1005-1019. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.021>
94. Liu, H., Tsai, H., Yang, M., Li, G., Bian, Q., Ding, G., Wu, D., & Dai, J. (2023). Three-dimensional genome structure and function. *MedComm*, 4(4). <https://doi.org/10.1002/MCO2.326>
95. Liu, X., Chen, M., Qu, X., Liu, W., Dou, Y., Liu, Q., Shi, D., Jiang, M., & Li, H. (2023). Cis-Regulatory Elements in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 343, 25(1), 343. <https://doi.org/10.3390/IJMS25010343>
96. Llères, D., James, J., Swift, S., Norman, D. G., & Lamond, A. I. (2009). Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET. *The Journal of Cell Biology*, 187(4), 481-496. <https://doi.org/10.1083/JCB.200907029>

97. Lupiáñez, D. G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J. M., Laxova, R., Santos-Simarro, F., Gilbert-Dussardier, B., Wittler, L., Borschiwer, M., Haas, S. A., Osterwalder, M., Franke, M., Timmermann, B., Hecht, J., ... Mundlos, S. (2015). Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*, *161*(5), 1012-1025. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.004>
98. Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S. W., Wu, J., Hayama, T., Darby, H., Van Dyken, C., Li, Y., Koski, A., Liang, D., Suzuki, K., Gu, Y., Gong, J., Xu, X., Ahmed, R., Lee, Y., Kang, E., Ji, D., Park, A. R., ... Mitalipov, S. (2018). Ma et al. reply. *Nature*, *560*(7717), E10-E23. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0381-Y>
99. Ma, H., Tu, L. C., Naseri, A., Huisman, M., Zhang, S., Grunwald, D., & Pederson, T. (2016). Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nature Biotechnology*, *34*(5), 528-530. <https://doi.org/10.1038/NBT.3526>
100. Ma, T., Chen, L., Shi, M., Niu, J., Zhang, X., Yang, X., Zhanghao, K., Wang, M., Xi, P., Jin, D., Zhang, M., Gao, J., Niu, J., Zhang, X., Yang, X., Zhanghao, K., Wang, M., Xi, P., Jin, D., ... Shi, M. (2018). Developing novel methods to image and visualize 3D genomes. *Cell Biology and Toxicology 2018* *34*:5, *34*(5), 367-380. <https://doi.org/10.1007/S10565-018-9427-Z>
101. Mach, P., Kos, P. I., Zhan, Y., Cramard, J., Gaudin, S., Tünnermann, J., Marchi, E., Eglinger, J., Zuin, J., Kryzhanovska, M., Smallwood, S., Gelman, L., Roth, G., Nora, E. P., Tiana, G., & Giorgetti, L. (2022). Cohesin and CTCF control the dynamics of chromosome folding. *Nature Genetics*, *54*(12), 1907-1918. <https://doi.org/10.1038/S41588-022-01232-7>
102. Margueron, R., & Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* *2011* *469*:7330, *469*(7330), 343-349. <https://doi.org/10.1038/nature09784>
103. Martin-Gonzalez, A., Tišma, M., Analikwu, B. T., Barth, A., Janissen, R., Antar, H., Kemps, G., Gruber, S., & Dekker, C. (2024). DNA supercoiling enhances DNA condensation by ParB proteins. *Nucleic Acids Research*, *52*(21), 13255. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAE936>

104. Matthews, B. J., & Waxman, D. J. (2018). Computational prediction of CTCF/cohesin-based intra-TAD loops that insulate chromatin contacts and gene expression in mouse liver. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.34077>
105. Mehra, D., Adhikari, S., Banerjee, C., & Puchner, E. M. (2022). Characterizing locus specific chromatin structure and dynamics with correlative conventional and super-resolution imaging in living cells. *Nucleic Acids Research*, 50(13), e78-e78. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC314>
106. Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Jaffe, D. B., Gnirke, A., Jaenisch, R., & Lander, E. S. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 2008 454:7205, 454(7205), 766-770. <https://doi.org/10.1038/nature07107>
107. Meschichi, A., Ingouff, M., Picart, C., Mirouze, M., Desset, S., Gallardo, F., Bystricky, K., Picault, N., Rosa, S., & Pontvianne, F. (2021). ANCHOR: A Technical Approach to Monitor Single-Copy Locus Localization in Planta. *Frontiers in Plant Science*, 12, 677849. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.677849/BIBTEX>
108. Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T. K., Koche, R. P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., ... Bernstein, B. E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448(7153), 553-560. <https://doi.org/10.1038/NATURE06008>
109. Minajigi, A., Froberg, J. E., Wei, C., Sunwoo, H., Kesner, B., Colognori, D., Lessing, D., Payer, B., Boukhali, M., Haas, W., & Lee, J. T. (2015). Chromosomes. A comprehensive Xist interactome reveals cohesin repulsion and an RNA-directed chromosome conformation. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6245), 1DUIMMY. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAB2276>
110. Monahan, K., Rudnick, N. D., Kehayova, P. D., Pauli, F., Newberry, K. M., Myers, R. M., & Maniatis, T. (2012). Role of CCCTC binding factor (CTCF) and cohesin in the generation of single-cell diversity of protocadherin- α gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23), 9125-9130. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1205074109>

111. Nakahashi, H., Kwon, K. R. K., Resch, W., Vian, L., Dose, M., Stavreva, D., Hakim, O., Pruett, N., Nelson, S., Yamane, A., Qian, J., Dubois, W., Welsh, S., Phair, R. D., Pugh, B. F., Lobanenkov, V., Hager, G. L., & Casellas, R. (2013). A Genome-wide Map of CTCF Multivalency Redefines the CTCF Code. *Cell Reports*, 3(5), 1678-1689. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.024>
112. Narendra, V., Bulajié, M., Dekker, J., Mazzoni, E. O., & Reinberg, D. (2016a). CTCF-mediated topological boundaries during development foster appropriate gene regulation. *Genes and Development*, 30(24), 2657-2662. <https://doi.org/10.1101/GAD.288324.116/-/DC1>
113. Narendra, V., Rocha, P. P., An, D., Raviram, R., Skok, J. A., Mazzoni, E. O., & Reinberg, D. (2015). CTCF establishes discrete functional chromatin domains at the Hox clusters during differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6225), 1017. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1262088>
114. Ng, S. Y., Bogu, G. K., Soh, B. S., & Stanton, L. W. (2013). The long noncoding RNA RMST interacts with SOX2 to regulate neurogenesis. *Molecular Cell*, 51(3), 349-359. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.017>
115. Nora, E. P., Caccianini, L., Fudenberg, G., So, K., Kameswaran, V., Nagle, A., Uebersohn, A., Hajj, B., Saux, A. Le, Coulon, A., Mirny, L. A., Pollard, K. S., Dahan, M., & Bruneau, B. G. (2020). Molecular basis of CTCF binding polarity in genome folding. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-19283-X>
116. Nora, E. P., Goloborodko, A., Valton, A. L., Gibcus, J. H., Uebersohn, A., Abdennur, N., Dekker, J., Mirny, L. A., & Bruneau, B. G. (2017a). Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell*, 169(5), 930-944.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.004>
117. Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., Van Berkum, N. L., Meisig, J., Sedat, J., Gribnau, J., Barillot, E., Blüthgen, N., Dekker, J., & Heard, E. (2012a). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature*, 485(7398), 381-385. <https://doi.org/10.1038/NATURE11049>

118. Nuebler, J., Fudenberg, G., Imakaev, M., Abdennur, N., & Mirny, L. A. (2018). Chromatin organization by an interplay of loop extrusion and compartmental segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(29), E6697-E6706. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1717730115/-/DCSUPPLEMENTAL>
119. Oh, S., Shao, J., Mitra, J., Xiong, F., D'Antonio, M., Wang, R., Garcia-Bassets, I., Ma, Q., Zhu, X., Lee, J. H., Nair, S. J., Yang, F., Ohgi, K., Frazer, K. A., Zhang, Z. D., Li, W., & Rosenfeld, M. G. (2021). Enhancer release and retargeting activates disease-susceptibility genes. *Nature*, 595(7869), 735-740. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-03577-1>
120. Ohishi, H., Shinkai, S., Owada, H., Fujii, T., Hosoda, K., Onami, S., Yamamoto, T., Ohkawa, Y., & Ochiai, H. (2024). Transcription-coupled changes in genomic region proximities during transcriptional bursting. *Science Advances*, 10(49). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ADN0020>
121. Ong, C. T., & Corces, V. G. (2014a). CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nature Reviews. Genetics*, 15(4), 234-246. <https://doi.org/10.1038/NRG3663>
122. Oti, M., Falck, J., Huynen, M. A., & Zhou, H. (2016). CTCF-mediated chromatin loops enclose inducible gene regulatory domains. *BMC Genomics* 2016 17:1, 17(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/S12864-016-2516-6>
123. Paliou, C., Guckelberger, P., Schöpflin, R., Heinrich, V., Esposito, A., Chiariello, A. M., Bianco, S., Annunziatella, C., Helmuth, J., Haas, S., Jerkovic, I., Brieske, N., Wittler, L., Timmermann, B., Nicodemi, M., Vingron, M., Mundlos, S., & Andrey, G. (2019). Preformed chromatin topology assists transcriptional robustness of Shh during limb development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(25), 12390-12399. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1900672116/-/DCSUPPLEMENTAL>
124. Pant, V., Kurukuti, S., Pugacheva, E., Shamsuddin, S., Mariano, P., Renkawitz, R., Klenova, E., Lobanenko, V., & Ohlsson, R. (2004). Mutation of a single CTCF target site within the H19 imprinting control region leads to loss of Igf2 imprinting and complex patterns of de novo methylation upon maternal inheritance. *Molecular*

- and Cellular Biology*, 24(8), 3497-3504. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.8.3497-3504.2004>
125. Pękowska, A., Klaus, B., Xiang, W., Severino, J., Daigle, N., Klein, F. A., Oleś, M., Casellas, R., Ellenberg, J., Steinmetz, L. M., Bertone, P., & Huber, W. (2018a). Gain of CTCF-Anchored Chromatin Loops Marks the Exit from Naive Pluripotency. *Cell Systems*, 7(5), 482-495.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.09.003>
 126. Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S. W. M., Solovei, I., Brugman, W., Gräf, S., Flicek, P., Kerkhoven, R. M., van Lohuizen, M., Reinders, M., Wessels, L., & van Steensel, B. (2010). Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation. *Molecular Cell*, 38(4), 603-613. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.016>
 127. Phillips-Cremins, J. E., & Corces, V. G. (2013). Chromatin Insulators: Linking genome organization to cellular function. *Molecular Cell*, 50(4), 461. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2013.04.018>
 128. Prawitt, D., Enklaar, T., Gärtner-Rupprecht, B., Spangenberg, C., Oswald, M., Lausch, E., Schmidtke, P., Reutzel, D., Fees, S., Lucito, R., Korzon, M., Brozek, I., Limon, J., Housman, D. E., Pelletier, J., & Zabel, B. (2005). Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(11), 4085-4090. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0500037102>
 129. Pugacheva, E. M., Kubo, N., Loukinov, D., Tajmul, M., Kang, S., Kovalchuk, A. L., Strunnikov, A. V., Zentner, G. E., Ren, B., & Lobanenko, V. V. (2020). CTCF mediates chromatin looping via N-terminal domain-dependent cohesin retention. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(4), 2020-2031. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1911708117/-DCSUPPLEMENTAL>
 130. Quinn, J. J., & Chang, H. Y. (2015). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature Reviews Genetics* 2015 17:1, 17(1), 47-62. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.10>
 131. Quitschke, W. W., Taheny, M. J., Fochtman, L. J., & Vostrov, A. A. (2000a). Differential effect of zinc finger deletions on the binding of CTCF to the promoter

- of the amyloid precursor protein gene. *Nucleic Acids Research*, 28(17), 3370-3378.
<https://doi.org/10.1093/NAR/28.17.3370>
132. Rahman, S., Dong, P., Apontes, P., Fernando, M. B., Kosoy, R., Townsley, K. G., Girdhar, K., Bendl, J., Shao, Z., Misir, R., Tsankova, N., Kleopoulos, S. P., Brennand, K. J., Fullard, J. F., & Roussos, P. (2023). Lineage specific 3D genome structure in the adult human brain and neurodevelopmental changes in the chromatin interactome. *Nucleic Acids Research*, 51(20), 11142-11161.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD798>
 133. Rao, M., & Gershon, M. D. (2016). The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 13(9), 517-528. <https://doi.org/10.1038/NRGASTRO.2016.107>
 134. Rao, S. S. P., Huang, S. C., Glenn St Hilaire, B., Engreitz, J. M., Perez, E. M., Kieffer-Kwon, K. R., Sanborn, A. L., Johnstone, S. E., Bascom, G. D., Bochkov, I. D., Huang, X., Shamim, M. S., Shin, J., Turner, D., Ye, Z., Omer, A. D., Robinson, J. T., Schlick, T., Bernstein, B. E., ... Aiden, E. L. (2017). Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains. *Cell*, 171(2), 305-320.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.026>
 135. 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. (2014a). 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>
 136. Rasim Barutcu, A., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S., & Imbalzano, A. N. (2017). The connection between BRG1, CTCF and topoisomerases at TAD boundaries. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 8(2), 150-155.
<https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1276145>
 137. Ren, G., Jin, W., Cui, K., Rodriguez, J., Hu, G., Zhang, Z., Larson, D. R., & Zhao, K. (2017a). CTCF-mediated enhancer-promoter interaction is a critical regulator of cell-to-cell variation of gene expression. *Molecular Cell*, 67(6), 1049.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2017.08.026>
 138. Reynolds, S. M., & Berridge, K. C. (2008). Emotional environments retune the valence of appetitive versus fearful functions in nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, 11(4), 423-425. <https://doi.org/10.1038/NN2061>

139. Robinson, J., Raguseo, F., Nuccio, S. P., Liano, D., & Di Antonio, M. (2021). DNA G-quadruplex structures: more than simple roadblocks to transcription? *Nucleic Acids Research*, 49(15), 8419. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB609>
140. Rowley, M. J., & Corces, V. G. (2018). Organizational Principles of 3D Genome Architecture. *Nature Reviews. Genetics*, 19(12), 789. <https://doi.org/10.1038/S41576-018-0060-8>
141. Sabari, B. R., Dall'Agnese, A., Boija, A., Klein, I. A., Coffey, E. L., Shrinivas, K., Abraham, B. J., Hannett, N. M., Zamudio, A. V., Manteiga, J. C., Li, C. H., Guo, Y. E., Day, D. S., Schuijers, J., Vasile, E., Malik, S., Hnisz, D., Lee, T. I., Cisse, I. I., ... Young, R. A. (2018). Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science (New York, N.Y.)*, 361(6400). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAR3958>
142. Saldaña A-Meyer, R., Rodriguez-Hernaez, J., Escobar, T., Furlan-Magaril, M., Skok, J., & Correspondence, D. R. (2019). RNA Interactions Are Essential for CTCF-Mediated Genome Organization Saldaña a-Meyer et al. *Molecular Cell*, 76, 412-422. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.015>
143. Saldaña-Meyer, R., González-Buendía, E., Guerrero, G., Narendra, V., Bonasio, R., Recillas-Targa, F., & Reinberg, D. (2014). CTCF regulates the human p53 gene through direct interaction with its natural antisense transcript, Wrap53. *Genes & Development*, 28(7), 723-734. <https://doi.org/10.1101/GAD.236869.113>
144. Schoenfelder, S., & Fraser, P. (2019a). Long-range enhancer-promoter contacts in gene expression control. *Nature Reviews. Genetics*, 20(8), 437-455. <https://doi.org/10.1038/S41576-019-0128-0>
145. Shin, Y., & Brangwynne, C. P. (2017). Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*, 357(6357). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF4382;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION>
146. Shlyueva, D., Stampfel, G., & Stark, A. (2014a). Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nature Reviews Genetics* 2014 15:4, 15(4), 272-286. <https://doi.org/10.1038/nrg3682>
147. Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., De Wit, E., Van Steensel, B., & De Laat, W. (2006). Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip

- (4C). *Nature Genetics* 2006 38:11, 38(11), 1348-1354.
<https://doi.org/10.1038/ng1896>
148. Sofueva, S., Yaffe, E., Chan, W. C., Georgopoulou, D., Vietri Rudan, M., Mira-Bontenbal, H., Pollard, S. M., Schroth, G. P., Tanay, A., & Hadjur, S. (2013). Cohesin-mediated interactions organize chromosomal domain architecture. *The EMBO Journal*, 32(24), 3119-3129. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2013.237>
 149. Solovei, I., Cavallo, A., Schermelleh, L., Jaunin, F., Scasselati, C., Cmarko, D., Cremer, C., Fakan, S., & Cremer, T. (2002). Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). *Experimental Cell Research*, 276(1), 10-23.
<https://doi.org/10.1006/excr.2002.5513>
 150. Spitz, F., & Furlong, E. E. M. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews. Genetics*, 13(9), 613-626.
<https://doi.org/10.1038/NRG3207>
 151. Splinter, E., Heath, H., Kooren, J., Palstra, R. J., Klous, P., Grosveld, F., Galjart, N., & De Laat, W. (2006a). CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes & Development*, 20(17), 2349-2354. <https://doi.org/10.1101/GAD.399506>
 152. Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2020). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 22:2, 22(2), 96-118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
 153. Su, J. H., Zheng, P., Kinrot, S. S., Bintu, B., & Zhuang, X. (2020). Genome-Scale Imaging of the 3D Organization and Transcriptional Activity of Chromatin. *Cell*, 182(6), 1641. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.07.032>
 154. Sun, Y., Zhao, G., Liu, R., Zheng, M., Hu, Y., Wu, D., Zhang, L., Li, P., & Wen, J. (2013). *The identification of 14 new genes for meat quality traits in chicken using a genome-wide association study*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-458>
 155. Szalaj, P., & Plewczynski, D. (2018). Three-dimensional organization and dynamics of the genome. *Cell Biology and Toxicology*, 34(5), 381.
<https://doi.org/10.1007/S10565-018-9428-Y>
 156. Takei, Y., Yang, Y., White, J., Goronzy, I. N., Yun, J., Prasad, M., Ombelets, L. J., Schindler, S., Bhat, P., Guttman, M., & Cai, L. (2025). Spatial multi-omics reveals

- cell-type-specific nuclear compartments. *Nature*, 641(8064), 1037-1047. <https://doi.org/10.1038/S41586-025-08838-X>
157. Tanenbaum, M. E., Gilbert, L. A., Qi, L. S., Weissman, J. S., & Vale, R. D. (2014). A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 159(3), 635-646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>
 158. Tang, Z., Luo, O. J., Li, X., Zheng, M., Zhu, J. J., Szalaj, P., Trzaskoma, P., Magalska, A., Wlodarczyk, J., Ruszczycki, B., Michalski, P., Piecuch, E., Wang, P., Wang, D., Tian, S. Z., Penrad-Mobayed, M., Sachs, L. M., Ruan, X., Wei, C. L., ... Ruan, Y. (2015). CTCF-Mediated Human 3D Genome Architecture Reveals Chromatin Topology for Transcription. *Cell*, 163(7), 1611-1627. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.11.024>
 159. *The Strategy Of The Genes : Waddington, C. H. : Free Download, Borrow, and Streaming : Internet Archive*. (n.d.). Retrieved October 18, 2025, from <https://archive.org/details/in.ernet.dli.2015.547782>
 160. Theunissen, T. W., & Jaenisch, R. (2014). Molecular Control of Induced Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 14(6), 720. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2014.05.002>
 161. Thuma, J., Chung, Y. C., & Tu, L. C. (2023). Advances and challenges in CRISPR-based real-time imaging of dynamic genome organization. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2023.1173545>
 162. Thurman, R. E., Rynes, E., Humbert, R., Vierstra, J., Maurano, M. T., Haugen, E., Sheffield, N. C., Stergachis, A. B., Wang, H., Vernot, B., Garg, K., John, S., Sandstrom, R., Bates, D., Boatman, L., Canfield, T. K., Diegel, M., Dunn, D., Ebersol, A. K., ... Stamatoiyannopoulos, J. A. (2012). The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature* 2012 489:7414, 489(7414), 75-82. <https://doi.org/10.1038/nature11232>
 163. Tian, H., Potts, H. E., Marsch, E., Attie, R., & He, J. S. (2010). Horizontal supergranule-scale motions inferred from TRACE ultraviolet observations of the chromosphere. *Astronomy & Astrophysics*, 519(7), A58. <https://doi.org/10.1051/0004-6361/200913254>
 164. Tseng, Y. Y., Moriarity, B. S., Gong, W., Akiyama, R., Tiwari, A., Kawakami, H., Ronning, P., Reuland, B., Guenther, K., Beadnell, T. C., Essig, J., Otto, G. M., O'Sullivan, M. G., Largaespada, D. A., Schwertfeger, K. L., Marahrens, Y., Kawakami,

- Y., & Bagchi, A. (2014). PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase. *Nature* 2014 512:7512, 512(7512), 82-86. <https://doi.org/10.1038/nature13311>
165. van Berkum, N. L., Lieberman-Aiden, E., Williams, L., Imakaev, M., Gnirke, A., Mirny, L. A., Dekker, J., & Lander, E. S. (2010). Hi-C: a method to study the three-dimensional architecture of genomes. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 39. <https://doi.org/10.3791/1869>
166. van Staalduinen, J., van Staveren, T., Grosveld, F., & Wendt, K. S. (2023). Live-cell imaging of chromatin contacts opens a new window into chromatin dynamics. *Epigenetics & Chromatin* 2023 16:1, 16(1), 27-. <https://doi.org/10.1186/S13072-023-00503-9>
167. Verveer, P. J., Rocks, O., Harpur, A. G., & Bastiaens, P. I. H. (2006). Imaging protein interactions by FRET microscopy: FRET measurements by acceptor photobleaching. *CSH Protocols*, 2006(6), pdb.prot4598. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT4598>
168. Wang, J., Zhuang, J., Iyer, S., Lin, X. Y., Whitfield, T. W., Greven, M. C., Pierce, B. G., Dong, X., Kundaje, A., Cheng, Y., Rando, O. J., Birney, E., Myers, R. M., Noble, W. S., Snyder, M., & Weng, Z. (2012). Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors. *Genome Research*, 22(9), 1798-1812. <https://doi.org/10.1101/GR.139105.112>
169. Williamson, I., Lettic, L. A., Hill, R. E., & Bickmore, W. A. (2016a). Shh and ZRS enhancer colocalisation is specific to the zone of polarising activity. *Development (Cambridge, England)*, 143(16), 2994-3001. <https://doi.org/10.1242/DEV.139188>
170. Wu, G., Xing, Z., Tran, E. J., & Yang, D. (2019). DDX5 helicase resolves G-quadruplex and is involved in MYC gene transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(41), 20453-20461. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1909047116/-/DCSUPPLEMENTAL>
171. Wulfridge, P., Yan, Q., Rell, N., Doherty, J., Jacobson, S., Offley, S., Deliard, S., Feng, K., Phillips-Cremins, J. E., Gardini, A., & Sarma, K. (2023). G-quadruplexes associated with R-loops promote CTCF binding. *Molecular Cell*, 83(17), 3064-3079.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.07.009>

172. Wutz, G., Várnai, C., Nagasaka, K., Cisneros, D. A., Stocsits, R. R., Tang, W., Schoenfelder, S., Jessberger, G., Muhar, M., Hossain, M. J., Walther, N., Koch, B., Kueblbeck, M., Ellenberg, J., Zuber, J., Fraser, P., & Peters, J. (2017). Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. *The EMBO Journal*, 36(24), 3573-3599. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201798004>;WEBSITE:WEBSITE:EMBO-SITE;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER
173. Xu, J., Ma, H., Jin, J., Uttam, S., Fu, R., Huang, Y., & Liu, Y. (2018). Super-Resolution Imaging of Higher-Order Chromatin Structures at Different Epigenomic States in Single Mammalian Cells. *Cell Reports*, 24(4), 873-882. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.06.085>
174. Yamazaki, T., Souquere, S., Chujo, T., Kobelke, S., Chong, Y. S., Fox, A. H., Bond, C. S., Nakagawa, S., Pierron, G., & Hirose, T. (2018). Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation. *Molecular Cell*, 70(6), 1038-1053.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.019>
175. Yang, B., Kim, S., Jung, W. J., Kim, K., Kim, S., Kim, Y. J., Kim, T. G., Lee, E. C., Joo, J. S., Park, C. G., Oh, S., Yoo, K. H., & Kim, H. P. (2023). CTCF controls three-dimensional enhancer network underlying the inflammatory response of bone marrow-derived dendritic cells. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-023-36948-5>
176. Yang, J., Horton, J. R., Liu, B., Corces, V. G., Blumenthal, R. M., Zhang, X., & Cheng, X. (2023b). Structures of CTCF-DNA complexes including all 11 zinc fingers. *Nucleic Acids Research*, 51(16), 8447-8462. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD594>
177. Yang, L. Z., Min, Y. H., Liu, Y. X., Gao, B. Q., Liu, X. Q., Huang, Y., Wang, H., Yang, L., Liu, Z. J., & Chen, L. L. (2024). CRISPR-array-mediated imaging of non-repetitive and multiplex genomic loci in living cells. *Nature Methods* 2024 21:9, 21(9), 1646-1657. <https://doi.org/10.1038/s41592-024-02333-3>
178. Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., & Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotechnology*, 21(2), 183-186. <https://doi.org/10.1038/NBT780>

179. Zhang, X. O., Wang, H. Bin, Zhang, Y., Lu, X., Chen, L. L., & Yang, L. (2014). Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*, 159(1), 134-147. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.001>
180. Zhao, L., Wang, S., Cao, Z., Ouyang, W., Zhang, Q., Xie, L., Zheng, R., Guo, M., Ma, M., Hu, Z., Sung, W. K., Zhang, Q., Li, G., & Li, X. (2019). Chromatin loops associated with active genes and heterochromatin shape rice genome architecture for transcriptional regulation. *Nature Communications*, 10(1), 3640. <https://doi.org/10.1038/S41467-019-11535-9>
181. Zhao, Z., Tavoosidana, G., Sjölander, M., Göndör, A., Mariano, P., Wang, S., Kanduri, C., Lezcano, M., Sandhu, K. S., Singh, U., Pant, V., Tiwari, V., Kurukuti, S., & Ohlsson, R. (2006). Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nature Genetics*, 38(11), 1341-1347. <https://doi.org/10.1038/NG1891>
182. Zink, D., Cremer, T., Saffrich, R., Fischer, R., Trendelenburg, M. F., Ansorge, W., & Stelzer, E. H. K. (1998). Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Human Genetics*, 102(2), 241-251. <https://doi.org/10.1007/S004390050686>
183. Zuin, J., Dixon, J. R., Van Der Reijden, M. I. J. A., Ye, Z., Kolovos, P., Brouwer, R. W. W., Van De Corput, M. P. C., Van De Werken, H. J. G., Knoch, T. A., Van Ijcken, W. F. J., Grosveld, F. G., Ren, B., & Wendt, K. S. (2014). Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), 996-1001. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1317788111>

PUBLIKACJE DOKTORANTKI

1. Dehingia B., **Milewska-Puchata M.**, Janowski M., Rafiee MR., Abbas M., Piotrowska A., Senge J., Blaut P., Walsh D., Severino J., Chaudhury D., Iqbal S., Montiel-Manriquez R., Jankowska S., Zare P., Huber W., Xu J., Casellas R., Zimmermann T., Dłotko P., Krijgsveld J., Pękowska A. RNA binding proteins mediate the maturation of chromatin topology during differentiation. *Nature Cell Biology* 2025
2. Dehingia B., **Milewska M.**, Janowski M. & Pękowska A. CTCF shapes chromatin structure and gene expression in health and disease. *EMBO Reports* (2022), e55146; <https://doi.org/10.15252/embr.202255146>.
3. Janowski M., **Milewska M.**, Zare P., & Pękowska A., Chromatin Alterations in Neurological Disorders and Strategies of (Epi) Genome Rescue. *Pharmaceuticals* 2021, 14(8), 765.
4. Długorz E., **Milewska M.**, Baska P., *Pathogens*, 2021, vol. 10, no. 8, pp. 1-15, Article number 949,