

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ НУКЛЕОМА НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ CRISPR–CAS9: ОТ *IN VITRO* К *IN VIVO*

©2023 г.

Л. Г. МАЛОШЕНОК^{1,2},
Г. А. АБУШИНОВА^{1,2}, А. Ю. РЯЗАНОВА¹,
С. А. БРУСКИН^{1,2}, В. В. ЖЕРДЕВА¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

I. Введение. II. Системы CRISPR–Cas: история открытия, классификация, применение. III. Современные подходы к изучению 3D-структуры генома *in vitro* и *in vivo*. IV. Доставка CRISPR–Cas-компонентов в целевые клетки. V. Молекулярный имиджинг нуклеома с использованием CRISPR–Cas9. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Для понимания того, как функционирует геном любого организма, необходимо установить не только линейный порядок расположения генов и их регуляторных элементов на хромосомах, но и пространственную (3D) организацию хроматина, а также изменения этой

Принятые сокращения: 3D – трехмерный, пространственный; 3C – chromosome conformation capture («замораживание» конформации хромосом); AAV – аденоассоциированные вирусы; ADME – абсорбция, распределение, метаболизм и экскреция; AV – аденовирусы; *cas* – CRISPR-associated genes (гены, прилегающие к CRISPR-кассете); CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats (кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными спейсерами); crRNA – CRISPR-РНК; dCas9 – dead Cas9 (мутантная форма белка Cas9, лишенная каталитической активности); FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*; FLIM – fluorescence lifetime imaging (имиджинг, основанный на времени жизни флуоресценции); FP – fluorescent proteins (флуоресцентные белки); FRET – Förster resonance energy transfer (Фёрстеровский резонансный перенос энергии); eGFP – enhanced green fluorescent protein (улучшенный зеленый флуоресцентный белок); LTR – long terminal repeat (длинный концевой повтор); NGS – next generation sequencing (секвенирование нового поколения); PAM – protospacer adjacent motifs (мотивы, расположенные рядом с протоспейсерами); sgRNA – single guide RNA (единая направляющая, или гидовая, РНК); TAD – topologically associating domain (топологически ассоциированный домен); TALE – transcription activator-like effector (эффектор, подобный активатору транскрипции); tracrRNA – trans-activating CRISPR RNA (транс-активирующая РНК); VSV-G – поверхностный гликопротеин вируса везикулярного стоматита; ZFN – zinc finger (домен «цинковых пальцев»); ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ЛНЧ – липидные наночастицы; МРТ – магнитно-резонансная томография; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Адрес для корреспонденции: vjerdeva@inbi.ras.ru

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, соглашение № 22-14-00205.

организации во времени. Для подобных целей проводятся работы по картированию 4D-нуклеома, то есть трехмерного нуклеома на временной шкале. Такие работы являются одним из приоритетных направлений исследований всемирной программы и программы Национального института здравоохранения США (НИИ) по изучению нуклеома [1]. Проекты по картированию 4D-нуклеома сочетают в себе передовые технологии трехмерной геномики, секвенирование отдельных клеток и визуализацию с высоким разрешением для изучения того, как формируется, поддерживается и реорганизуется трехмерный нуклеом при разных условиях в различных типах клеток, в том числе в одиночных клетках. В 2022 году представлен Nucleome Browser (<http://www.nucleome.org>) – интерактивная мультимодальная платформа визуализации, включающая 2292 геномных трека и 732 набора нуклеомных изображений [2].

Система CRISPR–Cas9 принадлежит к тем открытиям, которые всколыхнули научный мир. Всемирное признание к CRISPR пришло в 2012 году после опубликования работы Эммануэль Шарпантье и Дженнифер Даудны в журнале Science [3]. В 2020 году их работа была отмечена Нобелевской премией (<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>). На сегодняшний день на основе системы CRISPR–Cas9 разработаны различные технологии редактирования генома и даже начаты работы по их доклинической и клинической апробации [4]. Прижизненное флуоресцентное мечение нуклеома в клетках – еще одно большое направление, реализуемое с помощью системы CRISPR–Cas9 [5]. Переход к визуализации внутриядерной организации нуклеома на уровне живого организма является весьма заманчивым. Кроме того, прижизненная визуализация на основе CRISPR–Cas9 может помочь интенсифицировать поиск мишеней для терапии как моногенных, так и полигенных заболеваний [4, 6]. Имеющийся в распоряжении исследователей арсенал методов молекулярного имиджинга мог бы помочь в продвижении данного направления на уровень *in vivo*, связав визуализацию геномных локусов с определенной морфологической структурой ткани и/или органа.

В данном обзоре нам представлялось интересным обратить внимание на разработку различных способов мечения нуклеома на основе системы CRISPR–Cas9, включающей также и другие метки, перспективные с точки зрения визуализации трехмерного нуклеома в живом организме в режиме реального времени.

II. СИСТЕМЫ CRISPR–CAS: ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ, ПРИМЕНЕНИЕ

Впервые система CRISPR–Cas была обнаружена в 80-х годах прошлого века у *Escherichia coli* [7], а чуть позже – у архей [8], хотя понимание ее роли как системы приобретенного иммунитета у бактерий пришло значительно позже [9, 10]. На данный момент системы CRISPR–Cas обнаружены в геномах большинства архей и почти половины бактерий [11]. Помимо этого, системы CRISPR–Cas или их отдельные компоненты широко распространены в мобильных генетических элементах (вирусах, транспозонах, плазидах) и часто распространяются путем горизонтального переноса [12].

CRISPR-кассета – это набор повторяющихся последовательностей ДНК, называемых короткими палиндромными кластерными повторами, или CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Локусы CRISPR разделены спейсерами – отличающимися друг от друга фрагментами ДНК, которые соответствуют частям геномов вирусов, когда-либо заражавших данную бактерию. Благодаря встраиванию в геном бактерии, эти участки вирусных геномов передаются дочерним клеткам при делении. К CRISPR-кассете всегда прилегает однотипная группа генов, названных *cas* (CRISPR-associated genes) [13].

Изначально некоторые исследователи предполагали, что белки Cas участвуют в репарации ДНК [14]. Но открытие того факта, что спейсерные последовательности соответствуют чужеродным генетическим элементам, привело к появлению гипотезы, что CRISPR–Cas – это иммунная система, защищающая микроорганизм от вторжения мобильных генетических элементов [15–17]. Вскоре данная гипотеза была подтверждена экспериментально [18]. Впоследствии было показано, что системы CRISPR–Cas также участвуют в регуляции многих физиологических процессов бактерий и архей, связанных с передачей сигналов, репарацией ДНК, программируемой клеточной смертью. В некоторых случаях они влияют на вирулентность болезнетворного микроорганизма [19].

В самом общем виде механизм иммунной защиты, опосредованной CRISPR–Cas, выглядит следующим образом. Происходит транскрипция CRISPR-касеты, и образуется длинная РНК, в которой уникальные последовательности спейсеров разделены шпильками, образовавшимися из палиндромных повторов. Такая РНК-предшественник подвергается процессингу: из нее образуются короткие CRISPR-РНК (crRNA), содержащие отдельные спейсеры. Один или несколько белков Cas связываются с crRNA,

образуя так называемый эффекторный комплекс. Этот комплекс связывается с протоспейсером – участком чужеродной ДНК или РНК, комплементарным спейсеру *crRNA*. Затем происходит расщепление чужеродной ДНК или РНК – или за счет собственной активности белка Cas, или с привлечением дополнительных нуклеаз [9].

Для того чтобы расщеплению подвергался именно чужеродный генетический материал, необходимо отличать спейсеры, вошедшие в собственную систему CRISPR–Cas, от протоспейсеров в составе чужеродной ДНК. Для этого системы CRISPR–Cas распознают короткие нуклеотидные последовательности, расположенные рядом с протоспейсерами (*protospacer adjacent motifs*, PAM). Длина PAM составляет 2–5 пар нуклеотидов; они располагаются в чужеродной ДНК рядом с протоспейсерами, а в спейсерах отсутствуют [20]. Белки Cas сканируют длинные участки ДНК в поисках PAM, а при нахождении PAM расплетают смежный с ним участок двойной спирали. Одноцепочечный участок ДНК становится доступным для гибридизации со спейсером *crRNA*. Образующаяся при этом структура, состоящая из гетеродуплекса ДНК/РНК и одноцепочечной ДНК, называется R-петлей. Те системы CRISPR–Cas, которые узнают чужеродную РНК, не требуют наличия PAM [20].

Несмотря на значительное структурное разнообразие, защитное действие любой системы CRISPR–Cas можно подразделить на три функциональных этапа: 1 – адаптация (приобретение новых спейсеров), 2 – экспрессия (биогенез *crRNA*) и 3 – интерференция (уничтожение чужеродного генетического материала) [11]. Адаптационный модуль включает интегразу Cas1 (ключевой фермент, необходимый для инсерции новых спейсеров) и структурный белок Cas2. Также в этот модуль могут входить другие белки, такие как нуклеаза Cas4 (в зависимости от типа системы). Экспрессионный модуль отвечает за процессинг предшественника *crRNA*; в большинстве систем он представлен ферментом Cas6, хотя встречаются и другие варианты (см. далее). Интерференционный модуль – это эффекторный комплекс, узнающий последовательность-мишень и разрезающий чужеродную ДНК или РНК. Устройство эффекторного комплекса – это один из основных признаков, учитываемых при построении классификации систем CRISPR–Cas. В некоторых системах встречается также вспомогательный модуль – дополнительные гены, функции которых зачастую неизвестны, но которые расположены рядом с основными генами системы CRISPR–Cas [21].

Среди генов *cas* нет ни одного такого, который бы присутствовал во всех системах CRISPR–Cas без исключения, что делает задачу классификации этих систем довольно сложной [21, 22]. Наиболее

современный вариант классификации систем CRISPR–Cas содержит 2 класса, 6 типов и 33 подтипа [21]. Этот вариант основан на сложной вычислительной стратегии, которая учитывает наиболее характерные (сигнатурные) гены для каждого типа и подтипа, включает сравнение наборов генов и организации геномных локусов, а также подразумевает построение филогенетического древа на основе сходства последовательностей тех генов, которые являются консервативными внутри каждого из подтипов.

К классу 1 относят те системы CRISPR–Cas, в которых эффекторный комплекс содержит несколько белков Cas. Системы класса 1 широко распространены и подразделяются на типы I, III и IV в зависимости от того, в каких комбинациях в эффекторном комплексе присутствуют следующие белки: Cas3 (иногда слитый с Cas2), Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas10 и Cas11 [21].

В системах типа I эффекторный комплекс называется Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defense) [23, 24]. После того, как Cascade связывается с последовательностью-мишенью в ДНК, участок комплементарной цепи ДНК остается в одноцепочечном состоянии и расщепляется белком Cas3 [25, 26]. Фактически, Cas3 – это естественная химера хеликазы и нуклеазы, в которой хеликазная активность является АТФ-зависимой и проявляется в отношении дуплексов ДНК/ДНК и РНК/ДНК, а нуклеазная активность не требует АТФ [25, 26]. Cas3 является характерным белком систем CRISPR–Cas типа I [22].

Системы CRISPR–Cas типа III уникальны тем, что узнают и уничтожают транскрипционно активный чужеродный генетический материал. Эффекторный комплекс узнает последовательность-мишень в чужеродной мРНК во время транскрипции, что приводит к расположению комплекса в транскрипционном пузырьке и последующей деградации одноцепочечной ДНК. Разрезание РНК производит белок Cas7, гидролиз одноцепочечной ДНК – Cas10 [27–29]. Характерным белком системы CRISPR–Cas типа III является многодоменный белок Cas10 [22]. Для систем типа III типично наличие генов вспомогательного модуля [21].

Системы CRISPR–Cas типа IV отличаются минимализмом: в них зачастую отсутствуют как белки адаптационного модуля, так и нуклеазы интерференционного модуля. Только белки Cas5 и Cas7 легко обнаруживаются за счет сходства их аминокислотных последовательностей с аналогами в системах CRISPR–Cas других типов. Системы типа IV обнаруживаются почти исключительно в плаزمиде и профагах [21].

К классу 2 относят те системы CRISPR–Cas, в которых эффекторный комплекс содержит один многодоменный белок – Cas9, Cas12 или Cas13. Они встречаются на порядок реже, чем системы класса 1 [30]. Класс 2 подразделяют на типы II, V и VI. Целенаправленный поиск систем CRISPR–Cas с помощью вычислительных технологий в последнее время привел к открытию многочисленных новых подтипов класса 2 [21].

В системах типа II характерным является белок Cas9, имеющий 2 нуклеазных домена: HNH и RuvC, причем аминокислотная последовательность домена HNH разбивает на части последовательность домена RuvC [21]. Белки Cas9 узнают G-богатую PAM-последовательность и расщепляют ДНК-мишень, образуя тупые концы или же липкие концы длиной 1 нуклеотид [31]. Для выполнения функций как адаптационного, так и интерференционного модуля в системах этого типа требуется дополнительная некодирующая РНК – трансактивирующая РНК (trans-activating CRISPR RNA, tracrRNA). Она комплементарна повторам CRISPR и потому формирует РНК-дуплекс с каждым из повторов в предшественнике crRNA. Связывание с белком Cas9 стабилизирует эти РНК-дуплексы; затем они подвергаются расщеплению ферментом, не входящим в систему CRISPR–Cas, – бактериальной РНКазой III [32, 33]. Закодирована tracrRNA рядом с генами локуса CRISPR–Cas или между ними [34].

Среди белков Cas9 первым был охарактеризован биохимически Cas9 из бактерии *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9), и потому он используется в большинстве работ по генетической инженерии с помощью систем CRISPR–Cas [35]. Этот крупный белок (1368 аминокислотных остатка) имеет форму полумесяца размером примерно $100 \text{ \AA} \times 100 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$ [36]. Структурно он состоит из двух долей: узнающей (REC) и нуклеазной (NUC). Доли соединены двумя линкерами, один из которых представляет собой спираль, богатую остатками аргинина, а другой неупорядочен. Узнающая доля состоит из трех альфа-спиральных доменов (REC1, REC2 и REC3) и отвечает за связывание гидовой РНК и ДНК. В составе нуклеазной доли домен HNH обеспечивает расщепление той цепи ДНК, которая комплементарна гидовой РНК, а домен RuvC – некомплементарной цепи ДНК. Домены RuvC и HNH не гомологичны друг другу; их активные центры находятся на расстоянии около 25 \AA друг от друга, причем в случае домена HNH активный центр является неструктурированным в отсутствие нуклеиновых кислот [36]. В С-концевой области нуклеазной доли располагается домен, обуславливающий взаимодействие с PAM-последовательностью

(PI-домен) [37]. Белок SруCas9 узнает PAM-последовательность 5'-NGG-3' (или, с меньшей вероятностью, 5'-NAG-3') [3, 32].

В системах CRISPR–Cas типа V характерным является белок Cas12. Это многодоменный белок, в структуре которого выделяют узнающую и нуклеазную доли по аналогии с Cas9. Характерная черта Cas12 – наличие нуклеазного домена RuvC, способного вносить двухцепочечные разрывы в чужеродную ДНК, при отсутствии домена HNH. Требования к наличию дополнительных РНК варьируют в зависимости от подтипа системы. Эффекторный комплекс, состоящий из белка Cas12a и crRNA, полностью функционален без каких-либо дополнительных РНК. Белку Cas12b, наподобие Cas9, требуется tracrRNA для созревания crRNA и расщепления ДНК-мишени [38]. В случае белков Cas12c и Cas12d как для процессинга предшественника crRNA, так и для гидролиза ДНК-мишени необходима молекула коротко-комплементарной нетранслируемой РНК (short-complementarity untranslated RNA, scoutRNA) – недавно открытый третий вариант короткой РНК, закодированной в системе CRISPR–Cas [39]. В большинстве случаев белки Cas12 узнают Т-богатую PAM-последовательность и расщепляют ДНК-мишень, образуя 5'-липкие концы длиной 5 нуклеотидов (в случае Cas12a), 7 нуклеотидов (в случае Cas12b) или 9 нуклеотидов (в случае Cas12d) [31, 39]. Мишенями систем CRISPR–Cas типа V могут быть двухцепочечные ДНК, одноцепочечные ДНК или РНК в зависимости от подтипа системы [21].

В системах CRISPR–Cas типа VI характерным является белок Cas13, а в качестве мишени выступают РНК-транскрипты чужеродного генома [21]. Cas13 выполняет функции как экспрессионного, так и интерференционного модулей: участвует как в процессинге crRNA, так и в гидролизе РНК-мишени. Интересно, что эти две функции основаны на двух разных рибонуклеазных активностях: для гидролиза одноцепочечной РНК-мишени требуется взаимодействие доменов HEPN1 и HEPN2 внутри молекулы Cas13, а для процессинга crRNA необходимо взаимодействие доменов HEPN2 и Helical-1 [40].

Способность систем CRISPR–Cas с высокой специфичностью узнавать заданную нуклеотидную последовательность в протяженной геномной ДНК – это свойство, значение которого для биотехнологии и медицины сложно переоценить. Системы CRISPR–Cas были положены в основу технологии точного редактирования генома эукариот [3, 41]. Для удобства использования crRNA и tracrRNA могут быть слиты в одну молекулу – единую направляющую, или гидовую, РНК (single guide RNA – sgRNA) [3]. Таким образом, минимальная система для редактирования генома состоит всего из двух частей:

многодоменного белка Cas9 и химерной sgRNA. Участок-мишень в ДНК задается с помощью последовательности спейсера в sgRNA. Выбор мишени несколько ограничен тем, что рядом с ней должна располагаться PAM-последовательность, узнаваемая Cas9. Белки Cas из разных систем CRISPR–Cas и разных организмов узнают разные PAM-последовательности. Однако сродство белка Cas к определенной PAM-последовательности можно изменить с помощью мутагенеза [42].

На данный момент для точного редактирования генома эукариот широко используются системы CRISPR–Cas9 и CRISPR–Cas12a [43, 44]. Они вносят в ДНК двухцепочечные разрывы, которые затем репарируются в клетке путем гомологичной рекомбинации или нехомологичного соединения концов ДНК [45]. Многие исследовательские группы работают над усовершенствованием систем CRISPR–Cas для еще большего повышения их специфичности [46]. Редактирование генома производят не только в медицинских целях [47]. Также выполняют редактирование генома у микроорганизмов [48], у растений в сельском хозяйстве и садоводстве [49–54]. Появляются первые работы, в которых для редактирования генома эукариот используют системы CRISPR–Cas типа I [55–57].

Помимо этого, системы CRISPR–Cas используются в различных аналитических методах для детекции ДНК [58, 59], в том числе для диагностики SARS-CoV-2 [60]. Стоит подчеркнуть, что для диагностики инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами, используется система CRISPR–Cas13, узнающая РНК [61]. С точки зрения молекулярной диагностики системы CRISPR–Cas обладают несколькими существенными преимуществами: высокой специфичностью, высокой чувствительностью, простотой и низкой стоимостью. Уже созданные методы позволяют детектировать следующие патогены: с помощью Cas9 – вирус Зика, с помощью Cas12 – туберкулез, папилломавирус человека, ВИЧ-1, вирусы гепатита В и SARS-CoV-2, с помощью Cas13 – вирусы SARS-CoV-2, денге и Зика; причем временные затраты на такую диагностику не превышают 3 часов [62]. Возможно построение на основе CRISPR–Cas биосенсоров для детекции молекул, не являющихся нуклеиновыми кислотами [63, 64].

Точечные мутации, уничтожающие способность белка Cas9 гидролизовать ДНК (D10A в домене RuvC и H840A в домене HNH), не нарушают связывания этого белка с последовательностью-мишенью [65]. Такой каталитически неактивный белок получил название dCas9 (dead Cas9). Аналогичные каталитически неактивные варианты были получены и для других белков Cas: dCas12a [66], dCas12b [67] и

dCas13 [68]. Это открытие существенно расширило области применения систем CRISPR–Cas: любой функционально активный домен, слитый с dCas, может быть доставлен к заданным геномным локусам. В качестве таких функционально активных доменов могут быть регуляторы транскрипции, факторы ремоделирования хроматина, ферменты, модифицирующие гетероциклические основания, флуоресцентные метки и др. [69]. Таким образом, стало возможным говорить о редактировании эпигенома [70, 71].

Системы CRISPR–Cas типа I тоже возможно использовать с целью программируемой репрессии генов, а не редактирования генома. Для этого требуется удалить ген, кодирующий нуклеазу Cas3 [72]. Однако тот факт, что комплекс Cascade в системах типа I состоит из нескольких белков, существенно ограничивает его применение.

Поскольку Cas9 и dCas9 являются очень крупными белками, а значит, кодируются длинными генами, проводятся работы по уменьшению их размера для облегчения их доставки в клетки. Показано, что dCas9 из *Streptococcus pyogenes* сохраняет свою ДНК-узнающую активность *in vitro* and *in vivo* даже после удаления примерно трети своей аминокислотной последовательности (4 участка в доменах REC2, REC3, HNH и RuvC) [73]. С точки зрения удобства доставки перспективными также являются миниатюрные белки из недавно открытой группы Cas12f, способные расщеплять двухцепочечную ДНК в РАМ-зависимой манере, несмотря на то, что их длина составляет всего лишь 422–603 аминокислотных остатков [74, 75].

Ортологи dCas9 из разных организмов узнают различные РАМ-последовательности, а потому могут быть использованы для работы с несколькими ДНК-мишенями одновременно. Такие dCas9 также отличаются друг от друга по размеру, что может способствовать их доставке в клетки. Известно, что узнаваемую определённым ортологом РАМ-последовательность можно изменить с помощью внесения модификаций в аминокислотный состав РI-домена dCas9, а также что узнавание РАМ-последовательности не всегда бывает строгим и потому специфичность связывания может меняться в зависимости от выбранного переменного нуклеотида в РАМ-последовательности. Благодаря таким свойствам ортологи dCas9 используются для одновременного мечения различных локусов хроматина в одной клетке [76].

III. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ 3D-СТРУКТУРЫ ГЕНОМА *IN VITRO* И *IN VIVO*

Существующие на сегодняшний день подходы к изучению 3D-структуры генома и визуализации локусов хроматина можно разделить на две большие группы. Обе группы развивались независимо друг от друга и не применялись одновременно, несмотря на фактически общие цели. К первой группе относятся подходы, при проведении которых производится фиксация клеток: 1) 2D- и 3D-FISH; 2) методы, основанные на 3C (3C, 4C, 5C, Hi-C); 3) CASFISH. Ко второй группе относятся подходы, в которых работа ведётся с живыми клетками, в основном за счет белков, входящих в системы редактирования генома и имеющих возможность связываться с ДНК без внесения в неё разрывов. Таковыми являются: 1) белковые домены TALE или ZFN, слитые с флуоресцентными белками (FP); 2) белок dCas9, слитый с FP; 3) белок dCas9, слитый с полипептидом SunTag; 4) химерные sgRNA, в состав которых включены РНК-аптамеры, связывающие FP; 5) система Casilio; 6) фрагменты FP, обеспечивающие комплементацию флуоресценции. В то время как подходы из второй группы являются ответвлением от методов редактирования генома, подходы из первой группы, основанные на работе с фиксированными клетками, были разработаны и применялись в исследованиях раньше, а потому хорошо изучены и имеют больший спектр фактического применения [77].

МЕЧЕНИЕ ХРОМАТИНА В ФИКСИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH)

Современные успехи в изучении структуры хроматина на разных уровнях были бы невозможны без классических методов цитогенетики. Поэтому рассмотрение этих подходов стоит начать с метода FISH, который может гордиться более чем полувековой историей и имеет множество применений [78]. Несмотря на то, что FISH позволяет метить лишь несколько геномных локусов одновременно, этот метод позволил сделать такие открытия, как обнаружение хромосомных территорий и динамическое изменение положения геномных локусов относительно ядерных компартментов во время дифференцировки клеток [77].

На данный момент существует несколько модификаций метода FISH. Все они требуют фиксации клеток, денатурации ДНК с использованием специальных реагентов и гибридизации (отжига) ДНК с флуоресцентными зондами для дальнейшей визуализации с помощью флуоресцентного микроскопа. При 2D-FISH производят спредирование ядер, для чего добиваются набухания клеток в гипо-

тоническом растворе, а затем проводят фиксацию в метаноле и уксусной кислоте. Как следствие, данный метод ограничен мечением локусов хроматина лишь в двух измерениях; он позволяет оценить пространственное расположение локусов на поверхности распластанного ядра. При 3D-FISH проводят фиксацию клеток формальдегидом, что позволяет сохранить их форму. Поэтому 3D-FISH позволяет измерять расстояния между несколькими геномными локусами, а также определять вариативность этих расстояний в популяции клеток [79, 80].

Хотя метод 3D-FISH сложнее в исполнении, чем 2D-FISH, он имеет большое значение для подтверждения результатов, полученных другими методами (например, основанными на 3C – см. следующий раздел), так как при этом исследуются препараты, в которых состояние ядер приближено к нативному. Нельзя сказать, что сопоставлять результаты этих методов в полной мере корректно, однако 3D-FISH имеет неоспоримые сильные стороны: использование нескольких различных флуорофоров позволяет не только визуализировать локусы ДНК, но и привязать их расположение к морфологии хроматина или ядра.

Недавно разработана технология мультиплексной последовательной гибридизации *in situ*, позволяющая визуализировать сотни геномных локусов и получать изображение с высоким разрешением для целой хромосомы [81]. В той же работе описана технология мультиплексной флуоресцентной гибридизации *in situ*, устойчивой к ошибкам (MERFISH – multiplexed error-robust FISH). Она позволяет одновременно визуализировать более тысячи геномных локусов и рождающихся РНК-транскриптов. С помощью MERFISH возможно характеризовать домены хроматина, ядерные компартменты, взаимодействия между разными хромосомами и процессы транскрипции в единичных клетках *in situ*.

Методы семейства 3C

Методы, основанные на «замораживании» конформации хромосом (3C – chromosome conformation capture), используются для самых разных целей [82–84]. Они подразумевают фиксацию клеток (чаще всего – формальдегидом), фрагментацию генома эндонуклеазами рестрикции и лигирование сближенных в пространстве фрагментов ДНК между собой. Дальнейшие шаги различаются в зависимости от вида методики. Таким путем возможно обнаруживать контакты как одного хромосомного локуса с другим, так и одного локуса со всем геномом или даже многих локусов друг с другом в целом геноме.

В случае метода 3С [85] после фиксации хроматина проводят расщепление ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции, оставляющих липкие концы. Затем полученные фрагменты ДНК лигируют по липким концам, причем для этой реакции смесь фрагментов ДНК разбавляют, чтобы проходило преимущественно внутримолекулярное лигирование (внутри ковалентно сшитых фрагментов) [86]. Далее проводят полимеразную цепную реакцию (ПЦР), используя праймеры, комплементарные к последовательностям, находящимся в заданных участках генома. Продукты амплификации анализируют с помощью гель-электрофореза. Сравнивая эффективность амплификации для разных пар праймеров, узнают частоту лигирования соответствующих пар участков ДНК, что отражает частоту взаимодействия этих участков в геноме [86]. Необходимость использования праймеров является недостатком, из-за которого метод 3С можно использовать для обнаружения взаимного расположения только заранее заданных последовательностей ДНК. Таким образом, производительность метода 3С можно описать как «один к одному», что ограничивает его применение. Кроме того, 3С может обнаруживать контакт только в ограниченном диапазоне, не превышающем нескольких сотен килобаз. Для получения данных о взаимодействиях внутри хроматина с более высокой пропускной способностью были разработаны несколько методов, производных от 3С [82].

Метод 4С (circular chromosome conformation capture) [87] подразумевает создание маленьких кольцевых молекул ДНК. Для этого ДНК-матрицы, полученные лигированием в рамках метода 3С, расщепляют второй эндонуклеазой рестрикции и проводят повторное лигирование. Затем применяют инвертированную ПЦР, используя праймеры к заданной последовательности, для амплификации любых взаимодействующих фрагментов. Полученные фрагменты ДНК анализируют, используя микрочипы, или с помощью секвенирования нуклеотидной последовательности нового поколения (NGS). Такой усовершенствованный метод позволяет оценить взаимодействия между одним заданным геномным локусом и всеми другими геномными локусами («один против всех») [86, 88].

В методе 5С (chromosome conformation capture carbon copy) [89] проводят гибридизацию ДНК-матриц, полученных методом 3С, со смесью олигонуклеотидов, каждый из которых частично перекрывается с определенным сайтом рестрикции в заданном локусе. Те пары олигонуклеотидов, которые соответствуют взаимодействующим участкам генома, после отжига на ДНК-матрицах оказываются рядом друг с другом и потому могут быть лигированы. Каждый из этих олигонуклеотидов несет на 5'-конце один из двух вариантов допол-

нительной универсальной последовательности. Это позволяет амплифицировать одновременно все продукты лигирования с помощью мультиплексной ПЦР. Полученные фрагменты ДНК анализируют с помощью микрочипов или секвенирования [86]. Метод 5C реализует принцип «многие против многих», позволяющий одновременно обнаруживать миллионы взаимодействий за счет использования тысяч праймеров в одном анализе. Большим достижением метода 5C является открытие топологически ассоциированных доменов (TAD) – участков генома с повышенной частотой контактов внутри самих себя [90].

Метод Hi-C (high-throughput chromosome conformation capture) [91] отличается от 3C тем, что после расщепления эндонуклеазой рестрикции липкие концы достраивают нуклеотидами, меченными биотином. После этого смесь разбавляют и проводят лигирование тупых концов, причем места лигирования оказываются помечены биотином. Полученную ДНК разрезают и выделяют биотинилированные фрагменты с помощью стрептавидина; затем их анализируют путем NGS. Подобная стратегия реализует принцип «все против всех» [77, 86].

Еще один метод, близкий к вышеперечисленным, но не входящий в семейство 3C, называется ChIA-PET (chromatin interaction analysis by paired-end tag) [92]. Хроматин фиксируют формальдегидом, фрагментируют ультразвуком и с помощью антител к изучаемому белку осаждают те фрагменты, в которых этот белок находится. Сближенные в пространстве концы ДНК лигируют, продукты лигирования анализируют секвенированием. Таким образом, в методе ChIA-PET изучают только те взаимодействия хроматина, которые обусловлены определенным ДНК-связывающим белком [86].

Когда встает вопрос о том, в какой степени можно сравнивать результаты, полученные с помощью FISH и методов, основанных на 3C, нужно учитывать их сходства и различия. Обе группы методов основаны на химическом сшивании формальдегидом, которое способствует белок-белковым взаимодействиям (за счет остатков лизина, триптофана и цистеина) в гораздо большей степени, чем ДНК-белковым. Хотя реакция сшивания происходит в диапазоне 2–3 Å, более удаленные локусы ДНК также пришиваются за счет создания белок-белковых сетей. Обе группы методов требуют того, чтобы ядра клеток были проницаемыми и хроматин был доступен флуоресцентным зондам или эндонуклеазам рестрикции. Особенность метода 3D-FISH в том, что сшитый хроматин должен быть слегка денатурирован, чтобы стала возможной гибридизация зонда и целевой ДНК. Этого достигают путём нагревания образца в присутствии формамида, снижающего температуру плавления двухцепочечной ДНК, поскольку

«обычная» тепловая денатурация могла бы привести к изменению в организации ядра и хроматина. Особенность методов, основанных на 3С, состоит в необходимости дробления генома эндонуклеазами рестрикции. Основная сложность в сравнении результатов этих методов заключается в том, что определение 3D-расстояний в случае FISH происходит с помощью микроскопии, а в случае Hi-C – путем анализа результатов секвенирования. Кроме того, неизвестен диапазон, в котором два геномных локуса могут быть сшиты формальдегидом, что также является проблемой при сравнении результатов, полученных с помощью этих методов. Однако на данный момент нет более действенного метода подтверждения результатов, полученных с помощью Hi-C, чем FISH [93].

Поскольку и FISH, и методы, основанные на 3С, подразумевают образование ковалентных сшивок, все эти методы имеют общий существенный недостаток: они не позволяют оценить временную динамику, которая лежит в основе изменчивости конформации хромосом.

Метод CASFISH

Перспективным является метод CASFISH – модификация FISH, в которой проводят мечение заданных последовательностей ДНК с помощью каталитически неактивного белка dCas9 [94]. Фиксацию клеток проводят смесью метанола и уксусной кислоты, что не вызывает денатурации геномной ДНК, но позволяет вносить в ядро белково-нуклеиновые зонды. Такой зонд представляет собой комплекс белка dCas9, меченного флуоресцентным красителем через Halo-тэг, и sgRNA, меченной флуоресцентным красителем другого цвета.

Метод CASFISH имеет несколько серьезных преимуществ по сравнению с описанными выше методами. Во-первых, процедура мечения CASFISH, основанная на белково-нуклеиновых зондах, более оптимизирована и занимает гораздо меньше времени, чем мечение FISH, основанное только на нуклеиновых зондах. Во-вторых, мягкие условия CASFISH могут лучше сохранять морфологию клеток и структуру ДНК. Следовательно, CASFISH является полезным инструментом для изучения организации генома в сочетании с визуализацией одиночных молекул со сверхвысоким разрешением. В-третьих, двухкомпонентная природа зондов CASFISH обеспечивает большой потенциал для мультиплексирования – одновременного использования нескольких флуоресцентных меток. Однако у этого метода есть и минусы: можно метить лишь ограниченное количество локусов генома и нельзя изучать поведение локусов хроматина в динамике [94].

МЕЧЕНИЕ ХРОМАТИНА В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ

*Использование доменов ZFN и TALE
для мечения локусов хроматина*

Первые эндонуклеазы, использованные для редактирования генома, содержали домен «цинковых пальцев» (ZFN), слитый с эндонуклеазным доменом [95]. Домен ZFN состоит из нескольких мотивов «цинковых пальцев» – фрагментов длиной около 30 аминокислотных остатков, связывающих ион цинка. Существует несколько типов таких мотивов [96]. Для геномного редактирования используют «классический» тип Cys_2-His_2 , который состоит из альфа-спирали и бета-шпильки и в котором ион цинка координируют два остатка цистеина и два остатка гистидина [96]. Каждый такой «цинковый палец» контактирует с 3–4 парами оснований в большой бороздке ДНК. Можно сконструировать домен, состоящий из нескольких таких мотивов и специфически распознающий более длинную последовательность ДНК, что обеспечивает желаемую специфичность в отношении ДНК-мишени [97].

В то время как домен ZFN отвечает за специфичность слитого белка, гидролиз ДНК обеспечивает каталитический домен, взятый из эндонуклеазы рестрикции FokI [98]. Особенность этой нуклеазы состоит в том, что способность узнавать определенную последовательность ДНК и способность гидролизовать двухцепочечную ДНК обеспечиваются разными структурными доменами. Если эти домены разъединить путем протеолиза, изолированный каталитический домен FokI будет расщеплять ДНК неспецифически [99]. Первая генно-инженерная химерная эндонуклеаза была сконструирована путем слияния каталитического домена FokI с гомеодоменом Ultrabithorax дрозофилы [100]. Вскоре были созданы химеры каталитического домена FokI с узнающими доменами ZFN [98, 101]. Каталитический домен FokI проявляет свою активность только после димеризации [102], и химерные белки на основе этого домена обладают тем же свойством. Поэтому расщепление двухцепочечной ДНК происходит только в сайтах связывания двух доменов ZFN с противоположными цепями ДНК, что естественным образом ограничивает нецелевые эффекты.

Другой вид нуклеаз, используемых для редактирования генома, представляет собой химеру бактериального белка TALE (transcription activator-like effector) и каталитического домена эндонуклеазы FokI; он носит название TALEN (transcription activator-like effector nuclease). Аналогично доменам ZFN, домен TALE состоит из повторяющихся блоков. Каждый блок – это фрагмент длиной 33–35 аминокислотных остатков, узнающий одну пару оснований в ДНК,

причем специфичность узнавания определяется двумя гипервариабельными аминокислотными остатками [97, 103]. Активность каждого блока не влияет на специфичность связывания соседних блоков, что значительно упрощает конструирование TALEN по сравнению с ZFN-нуклеазами [97].

Поскольку для мечения геномных локусов не требуется вносить разрывы в ДНК, для этих целей создают химерные белки, в которых к ДНК-узнающим доменам ZFN и TALE присоединены флуоресцентные белки, а не эндонуклеазный домен. Такие конструкции с успехом используют для мечения повторяющихся последовательностей ДНК [104–108]. В некоторых случаях белки TALE формируют агрегаты. Использование флуоресцентно меченного белка TALE, дополнительно слитого с тиоредоксином, позволяет избежать агрегации и существенно увеличить контрастность при визуализации в живых клетках [109].

*Мечение хроматиновых локусов в живых клетках
с помощью системы CRISPR–Cas9*

Открытие каталитически неактивного белка dCas9 стимулировало разработку основанных на CRISPR–dCas9 методов для неинвазивной визуализации геномных локусов в живых клетках. Стоит подчеркнуть, что флуоресцентная метка может быть введена как в белковый, так и в нуклеиновый компонент зонда, состоящего из dCas9 и sgRNA.

В случае белка dCas9, слитого с каким-либо флуоресцентным белком, сигнал от одиночных молекул слишком слаб, поэтому успешная визуализация возможна при условии, что мишенью являются повторяющиеся последовательности ДНК – например, в теломерах [110]. Для усиления флуоресцентного сигнала была разработана система SunTag [111]. Она подразумевает совместную экспрессию антитела, слитого с флуоресцентным белком, и полипептида, содержащего многочисленные повторы эпитопа, узнаваемого данным антителом. Если белок dCas9 экспрессируют в форме слитого белка с таким полипептидом, достигается существенное усиление флуоресцентного сигнала: комплекс dCas9–sgRNA узнает уникальную последовательность-мишень в геномной ДНК, а пришитый к нему полипептид SunTag обеспечивает связывание многочисленных флуоресцентно меченных антител с одной молекулой dCas9 [111, 112].

В качестве альтернативы химерным белкам dCas9-FP возможна визуализация геномных локусов с использованием модифицированных sgRNA, которые могут рекрутировать слитые с FP белки, специфичные для взятой последовательности РНК. Примером

может служить химерная sgRNA, которая содержит множественные повторы уникального РНК-аптамера, способного специфически связывать флуоресцентно меченный белок-эффектор [113–115]. Наиболее широко используемым аптамером является MS2 – петля РНК, полученная из РНК бактериофага MS2, которая может связываться с белком оболочки бактериофага MS2 (MCP) с высокой специфичностью и аффинностью [116]. При совместной экспрессии подобной химерной sgRNA с белками dCas9 и MCP-FP каждый комплекс dCas9–sgRNA может быть помечен множеством молекул FP за счет взаимодействий аптамера MS2 с белком MCP. За счет быстрой смены молекул белков-эффекторов, связываемых аптамером, при таком подходе меньше проявляется фотообесцвечивание, чем при обычном мечении с помощью CRISPR–Cas9 [113].

Другой подход, названный Casilio [117], использует РНК-связывающий домен белка семейства мРНК-связывающего фактора Pumilio/Fem3 (PUF), который может быть запрограммирован на связывание с уникальной 8-нуклеотидной последовательностью РНК (PUF-связывающей последовательностью). Будучи слитым с FP, домен PUF сохраняет специфичность узнавания своей РНК-мишени. Использование sgRNA, содержащей tandemные повторы PUF-связывающей последовательности, позволяет метить комплекс dCas9–sgRNA с помощью нескольких химерных белков PUF-FP.

Еще один подход – это бимолекулярная комплементация флуоресценции (BIFC) [118]. В этом случае используют два фрагмента желтого флуоресцентного белка Venus, которые при взаимодействии формируют полноразмерный флуоресцирующий белок. Совместно экспрессируют белок dCas9, слитый с С-концевым фрагментом белка Venus, белок MCP, слитый с N-концевым фрагментом белка Venus, и химерную sgRNA, содержащую аптамер MS2. Сборка комплекса dCas9–sgRNA и связывание белка MCP с аптамером MS2 приводят к сближению двух фрагментов, из которых формируется флуоресцирующий белок Venus. Отношение сигнала к шуму можно существенно улучшить, если в описанную систему добавить усиление сигнала с помощью SunTag: проводят совместную экспрессию белка dCas9-SunTag с узнающим SunTag антителом, слитым с С-концевым фрагментом белка Venus, а также с белком MCP, слитым с N-концевым фрагментом белка Venus, и с химерной sgRNA, содержащей аптамер MS2 [118]. Аналогичная система комплементации флуоресценции может быть создана на основе другого флуорофора – зеленого флуоресцентного белка (GFP), разделенного на три фрагмента [119].

Основные характеристики методов изучения 3D-структуры генома и визуализации локусов хроматина перечислены в таблице 1. Стоит подчеркнуть, что для прижизненной визуализации геномных локусов в неповреждённом ядре с сохранением его 3D-структуры не подходят методы с фиксацией клеток, спредированием и денатурацией ДНК, несмотря на их высокое разрешение и специфичность. Для систем, основанных на доменах TALE и ZFN, основным недостатком является трудоемкость конструирования, так как для каждого нового геномного сайта необходимо заново создавать ДНК-узнающий белковый домен. Напротив, технология CRISPR–Cas9 не требует сложного конструирования, так как специфичность достигается за счет комплементарности РНК-компонента системы и определенной последовательности нуклеотидов в геномной ДНК, что существенно облегчает создание эффекторного комплекса. Учитывая всё вышесказанное, оптимальным для мечения локусов хроматина в живых клетках можно считать метод, основанный на системе CRISPR–Cas9 с химерным белком dCas9-FP.

Проблемы использования систем CRISPR–Cas9 и пути их решения

На данный момент неизвестно, как специфичность мечения локусов хроматина, а также локализация и транспорт химерного белка dCas9-FP зависят от конкретного сочетания ортолога dCas9 и флуоресцентного белка. Отмечают определенные минусы этой системы: наличие фонового сигнала и задержку химерного белка в различных компартментах клетки [120]. Ниже перечислены основные проблемы, с которыми сталкивались исследователи при попытках мечения участков генома с помощью dCas9-FP, и возможные пути их преодоления.

1. Нецелевое связывание. Наиболее часто используемый для мечения хроматиновых локусов ортолог dCas9 из *Streptococcus pyogenes* имеет короткую РАМ-последовательность (5'-NGG-3'). Это даёт большую свободу в выборе последовательности ДНК-мишени, однако вызывает частое связывание с нецелевыми сайтами, что может приводить к ложноположительным сигналам при визуализации [120]. Для решения данной проблемы можно использовать ортологи dCas9 из других видов бактерий с различными РАМ-последовательностями. Предпочтительнее были бы ортологи, узнающие длинные РАМ-последовательности, что ограничивает как выбор сайта-мишени, так и нецелевое связывание [121]. Кроме того, разработаны варианты ортолога Cas9 из *Streptococcus pyogenes*, отличающиеся большей

Таблица 1. Сравнение методов изучения 3D-структуры генома и визуализации локусов хроматина

	2D FISH	3D FISH	Методы, основанные на 3C	CASFISH	ZFN+FP и TALEN+FP	Методы с использованием CRISPR-Cas9
Работа с живыми клетками	–	–	–	–	+	+
Соблюдение специфичности	+/- (нарушение специфичности из-за белок-белковых взаимодействий, возникающих из-за денатурации)			+	+	+
Сохранение 3D-структуры хроматина	– (из-за спредирования)	+/- (происходит денатурация)	+/- (происходит денатурация)	+	+	+
Сложность методики	низкая	средняя	высокая	средняя	высокая (сложность конструирования компонентов системы)	средняя

специфичностью, а также вариант с увеличенным PAM (xCas9) [122], которые могут быть модифицированы для визуализации геномных локусов с большей специфичностью. Для AT-богатых PAM-последовательностей может быть использован другой белок – Cas12a.

2. Доступность сайта-мишени. Некоторые участки ДНК покрыты ДНК-связывающими белками (например, белками центромер или теломер – шелтеринами) и потому недоступны для посадки комплекса dCas9–sgRNA. Кроме того, существуют области ДНК с высоким уровнем топологической недоступности, что тоже препятствует посадке на них комплекса dCas9–sgRNA. Чтобы улучшить выбор мишени, необходимо использовать другие методы, такие как ChIP-seq [123] и 3C.

3. Избирательность связывания с мишенью. При использовании системы Cas9–sgRNA последовательность спейсера и его длина могут влиять на эффективность связывания с сайтом-мишенью. Например, связывание sgRNA с нетранскрибируемой цепью ДНК более эффективно, чем с транскрибируемой цепью. Это может затруднить визуализацию геномных локусов, содержащих недостаточное количество PAM-последовательностей в нетранскрибируемой цепи. Кроме того, имеет место избирательное связывание Cas9 с sgRNA: белок предпоч-

тительнее связывается с теми гидовыми РНК, в которых последними четырьмя нуклеотидами спейсера являются пуриновые основания. Небольшое количество динуклеотидов GC в гидовой РНК также влияет на эффективность связывания с мишенью [124].

4. Фоновая флуоресценция. Такая проблема существует во всех методиках, использующих флуоресцентную микроскопию. Один из способов улучшить соотношение сигнал/фон – это использование описанного выше подхода с комплементацией флуоресценции [118, 119].

5. Визуализация неповторяющихся последовательностей. В то время как для визуализации повторяющихся элементов ДНК требуется только одна sgRNA, для визуализации неповторяющихся элементов нужны несколько уникальных sgRNA. Использование оптимизированных условий трансфекции с несколькими sgRNA, клонированными в единую плазмиду, сконструированную с помощью подхода Golden Gate [125], упрощает процедуру трансфекции и увеличивает её эффективность. Несмотря на эти достижения, одновременная экспрессия нескольких разных sgRNA в одной клетке может быть не синхронизирована, поскольку скорость транскрипции разных РНК зачастую неодинакова. Чтобы справиться с этой проблемой, была разработана стратегия, в которой экспрессионная плазида кодирует различные sgRNA в одном транскрипте, причем каждые две sgRNA связаны субстратом, который может быть вырезан с помощью рибонуклеаз. Даже в случае успешной одновременной экспрессии нескольких sgRNA визуализация неповторяющихся областей может быть сложной задачей, поскольку разные sgRNA могут конкурировать друг с другом за связывание с dCas9. Для снижения конкуренции между различными sgRNA можно использовать несколько ортологов dCas9 [120].

На данный момент наиболее распространённым подходом является экспрессия белка dCas9 из *Streptococcus pyogenes*, слитого с улучшенным зеленым флуоресцентным белком (eGFP), в сочетании с одной или несколькими sgRNA [110]. Также используется метод мечения sgRNA флуоресцентными молекулами [126, 127]. Однако оба подхода имеют свои минусы, описанные выше. Метод с флуоресцентным мечением РНК позволяет метить до шести локусов ДНК одновременно без использования различных ортологов dCas9 [127], в то время как первый метод ограничен числом имеющихся химер ортологов dCas9-FP, хотя и даёт меньшую фоновую флуоресценцию [94]. Лишь в единичных работах встречается использование таких химер с разными ортологами dCas9 (NmdCas9 и StdCas9) и флуоресцентными белками [128], причем нигде не была проведена оптимизация таких

химер путём сочетания различных ортологов и флуоресцентных белков. В одной из работ для увеличения соотношения сигнал/фон была разработана конструкция, несущая dCas9-FP, слитый с последовательностями-мишенями для соответствующих sgRNA, помеченных флуоресцентным пептидом [129]. Практически во всех проведённых с помощью таких методов работах проверка полученных результатов проводилась с помощью метода FISH [110]. В большинстве имеющихся работ в качестве мишеней для повторяющихся последовательностей были выбраны теломеры [128] или центромеры [94], а в качестве неповторяющихся локусов – последовательности генов MUC1 и MUC4 [110].

IV. ДОСТАВКА CRISPR–CAS-КОМПОНЕНТОВ В ЦЕЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Для правильной работы системы CRISPR–Cas9, чьи компоненты нестабильны, подвержены деградации и тяжело проникают в клетки, необходимо подобрать оптимальный способ их доставки в клетки-мишени. На сегодняшний день используют три основных метода доставки: физические методы, вирусные и невирусные векторы.

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Физические методы используются часто, поскольку они просты и эффективны. Их можно разделить на два классических и два новых. Такие методы применяют в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*.

Микроинъекция представляет собой введение определённых молекул в клетки или их компартменты (например, ядро) через микрокапиллярную пипетку. Основное преимущество этого метода заключается в том, что его можно использовать для любых клеток, поскольку механизм введения от типа клеток не зависит. Микроинъекции компонентов CRISPR-системы в ядра одиночных быстро-деляющихся клеток использовали для получения нокаутных и трансгенных животных. Хотя такой метод очень эффективен, он имеет существенный недостаток: микроинъекцию необходимо проводить в каждой клетке [130].

При электропорации приложение высокого напряжения вызывает образование пор в клеточных мембранах, через которые в клетку могут проникнуть путем трансфекции необходимые молекулы (как *ex vivo*, так и *in vivo*). Этот метод был использован для получения В-клеток, экспрессирующих терапевтические белки после дифференцировки [131]. Электропорация является токсичной, поскольку возможно

существенное повреждение клеточной мембраны, приводящее к её постоянной пермеабиллизации.

При трансмембранной интернализации с помощью мембранной фильтрации (TRIAMF) клетки выдавливают через мембрану, поры которой меньше диаметра самой клетки, из-за чего в клеточной мембране временно образуются поры. Этот метод позволяет доставлять рибонуклеопротеины в гемопоэтические стволовые клетки (HSPC), которые, как правило, слабо поглощают экзогенные молекулы и требуют более прямых методов трансфекции. Эффективность TRIAMF сравнима с электропорацией, а цитотоксичность – меньше [132].

В случае индуцированной трансдукции осмоцитозом и пропан-бетаином (iTOP) к клеткам добавляют гипертонический раствор хлорида натрия с пропан-бетаином, и эти компоненты вызывают образование эндосом за счет макропиноцитоза. Это обеспечивает как поглощение белков, так и их высвобождение посредством разрушения эндосомальной мембраны [133].

ВИРУСНЫЕ МЕТОДЫ

Процесс переноса ДНК между клетками при помощи вирусов называется трансдукцией. Вирусные векторы являлись одним из первых методов доставки компонентов системы редактирования CRISPR–Cas, поскольку они способны обеспечить высокую специфичность и минимальную цитотоксичность. Вирусные векторы должны соответствовать определённому перечню требований:

1) вектор должен быть репликативно дефектным (способным только на один цикл инфекции и интеграции в геном);

2) интегрировавшийся вирусный геном должен быть способен экспрессировать чужеродный ген, но не способен образовывать новые вирусные частицы, которые далее инфицируют другие клетки;

3) необходимо разделение цис- и транс-действующих элементов генома. Транс-активирующие элементы генома (т.н. вспомогательные гены или белки) удаляют и заменяют их трансгеном. Транс-факторы доставляют при помощи транс-комплементирующих векторов или с помощью вирусных частиц, продуцируемых упаковывающими клетками.

На данный момент существуют три основных вида вирусных векторов доставки: ретровирусные, аденовирусные и на основе аденоассоциированных вирусов. Их характеристики представлены в таблице 2 (по [134]).

Исторически первыми были использованы вирусные частицы на основе вируса лейкоза мышей (MLV), который относится к гамма-

Таблица 2. Характеристика вирусных векторов

Характеристика	Ретровирусы	Аденовирусы	Аденоассоциированные вирусы
Размер частицы, нм	100	80–120	20–30
Геном	РНК	Двунитевая ДНК	Однонитевая ДНК
Максимальный размер вставки, т.п.о.	8	20	4,5–5,0
Клетки-мишени	Делящиеся	Большинство	Большинство
Эффективность трансдукции	Низкая	Высокая	Высокая
Иммуногенность	Низкая	Высокая	Низкая
Интеграция с ДНК реципиента	Да	Нет	Низкая вероятность, иногда интегрирует в геном в качестве про-вируса
Продолжительность экспрессии	Длительная	Короткая	Длительная

ретровирусам. Их главный минус состоит в том, что они обладают мутагенным эффектом, встраиваясь в совершенно произвольные точки генома.

Переход к векторам на основе лентивирусов был обусловлен тем, что они, в отличие от гаммаретровирусов, могут заражать неделящиеся клетки. Выбору лентивирусов для доставки компонентов системы редактирования генома также способствует тот факт, что они не используют клеточные онкогены для стимуляции деления, так как способны проникать в ядро и без этого процесса. Однако у лентивирусов есть следующие минусы: они могут мутировать как собственные нуклеиновые кислоты, так и трансгенные, а при наличии в трансгене того, что может мешать репликации, трансген будет недостаточно представлен в целевых клетках.

В основе лентивирусных векторов лежит вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1). Основными генами, необходимыми для выживания и функционирования ретровирусов, являются гены *gag*, *pol* и *env*; *gag* кодирует структурные белки, *pol* – ферменты, необходимые для обратной транскрипции и интеграции в геном клетки-хозяина, *env* – гликопротеин оболочки вируса. На данный момент известны лентивирусные векторы трёх поколений, при разработке которых увеличивалась безопасность системы, но сохранялась высокая эффективность доставки генетического материала (трансгена) в целевые клетки.

Первое поколение лентивирусных векторов представляет собой три независимых плазмиды: вектор оболочки (несущий ген гликопротеина *env*), пакующий плазмидный вектор (несущий гены *gag-pol*, *rev* и *rre* вместе со всеми генами, кодирующими вспомогательные белки) и трансферный вектор (несущий трансген). Для сборки лентивирусных частиц все три компонента системы временно котрансфицируют в клетки эмбриональных почек человека линии HEK-293T.

Вначале для увеличения безопасности данного метода в оболочечной плазмиде оставили лишь часть, кодирующую гликопротеин g120, но такие частицы стали хуже инфицировать клетки. Использование гетерологичных генов, кодирующих гликопротеины наружной мембраны других вирусов, позволило не только увеличить безопасность системы, но и повысить эффективность и селективность доставки конструкции в целевые клетки. В лентивирусных частицах второго и третьего поколения в векторах оболочки ген *env* заменён на ген *vsv-g*, кодирующий поверхностный гликопротеин вируса везикулярного стоматита (VSV-G). Этот гликопротеин может встраиваться в мембрану любого вируса и облегчает проникновение вектора в клетку путём эндоцитоза, тем самым уменьшая потребность во вспомогательных белках оболочки [135]. Использование VSV-G позволило увеличить тропизм лентивирусных частиц и сделало возможной трансдукцию практически всех видов клеток.

Оптимизация как пакующего плазмидного вектора, так и вектора оболочки проходила в несколько этапов. В первом поколении пакующий плазмидный вектор содержал все гены ВИЧ-1 (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *gag*, *pol*, *tat*, *rev*), кроме генов *env* и *rre*, а также 5'-концевой основной донорный сайт сплайсинга. Вирусный длинный 5'-концевой повтор (5'-LTR) был заменен на гетерологичный промотор типа конститутивного энхансера/промотора генов цитомегаловируса человека или промотор из LTR вируса саркомы Рауса, а 3'-концевой повтор (3'-LTR) – на сигнал полиаденилирования вируса SV-40 либо поли-А сигнал гена *ins* человека. Сигнал упаковки вирусной РНК и сайт связывания праймеров были полностью удалены.

Второе поколение паковочных плазмид уже не имело генов, кодирующих вспомогательные белки NEF, VIF, VPR и VPU, которые ответственны за вирулентность, цитотоксичность и репликацию вирусов *in vitro*, что повысило безопасность использования лентивирусных векторов. Дальнейшая модификация паковочной плазмиды путём удаления гена *tat* и выноса гена *rev* в отдельную независимую плазмиду привели к созданию паковочной плазмиды третьего поколения, которая считается наиболее безопасной.

Оптимизация трансферного вектора проходила параллельно с изменениями пакующего плазмидного вектора. Первое поколение плазмиды, несущей трансген, содержало интактные 5'- и 3'-LTR и было зависимо от Tat-контролируемой транскрипции. Для достижения большей безопасности в дальнейшем использовали лентивирусные векторы доставки, где в структуре 3'-LTR удален элемент U3 (Δ U3). В этом случае невозможно восстановление элемента U3 в 5'-LTR во время создания ДНК на матрице полноразмерной векторной РНК. Следовательно, после встраивания провируса в хромосомную ДНК целевой клетки не происходит мобилизации вектора, т.е. образования новых полноразмерных молекул векторной РНК и вирусных частиц в трансдуцированных клетках при суперинфекции диким типом ВИЧ-1. Такие векторы получили название самоинактивирующихся (SIN) векторов второго поколения.

Третье поколение лентивирусных векторов доставки уже содержало 5'-LTR, в котором элемент U3 был заменен на сильный гетерологичный конститутивный промотор цитомегаловируса человека. Так как в паковочных плаزمидах третьего поколения ген *tat* был удалён, такой гибридный 5'-LTR стал Tat-независимым [136].

Так как исходным материалом для создания лентивирусных векторов являлся ВИЧ-1, существовало три потенциальных источника опасности: появление в препаратах вируса дикого типа, мобилизация вектора в трансдуцированной клетке в случае инфекции вируса ВИЧ-1 дикого типа и инсерционный мутагенез. Первая проблема была решена путем создания лентивирусного вектора третьего поколения, вторая – решена не полностью, а третья на сегодняшний день решения не имеет.

Продолжительная экспрессия белка Cas считается неблагоприятной для соотношения целевых и нецелевых эффектов при редактировании генома. Для получения временной экспрессии белка Cas9 используют не только самоинактивирующийся вектор, но и систему самоинактивирующегося трансгена: кроме гена, кодирующего Cas9, в лентивирусном векторе имеются гены, кодирующие две sgRNA (одна направлена на мишень в геноме, вторая – на ген, кодирующий Cas9) [137].

Аденовирусные векторы (AV) могут легко включать в себя все элементы системы редактирования генома в одной плазмиде благодаря их высокой упаковочной способности. Они могут доставлять в клетки не только гены, кодирующие элементы системы редактирования генома, но и совместно с ними большие участки донорной ДНК для обеспечения направленной гомологичной репарации. Преимущество

доставки с помощью AV заключается в том, что sgRNA и белок Cas постоянно экспрессируются в одной и той же клетке в фиксированном соотношении. Поскольку AV не интегрируются, экспрессия Cas в делящихся клетках является временной. AV были успешно использованы для редактирования генома мышей *in vivo*, хотя наблюдалась токсичность, связанная с иммуногенностью [138].

Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (AAV) широко используются для доставки генетических конструкций благодаря следующим свойствам: низкая иммуногенность, низкая токсичность, высокая эффективность трансдукции, длительная экспрессия встроеного гена, способность встраиваться в делящиеся и в покоящиеся клетки. Кроме того, AAV способны интегрировать целевой ген в определенное место генома, что предотвращает нежелательные мутации [139]. Основным недостатком AAV – это небольшая емкость вектора, в котором максимальный размер вставки должен быть не более 5 тысяч пар оснований, что существенно ограничивает его использование для доставки больших молекул. В случае системы CRISPR–Cas емкость кассеты AAV недостаточна для доставки химерных белков на основе Cas9: сама нуклеотидная последовательность химер составляет примерно 5 тысяч пар оснований. Эта проблема может быть решена путем разделения Cas9 из *Streptococcus pyogenes* на два фрагмента, способные рекомбинировать внутри клетки так, что укороченные гены будут соответствовать вектору AAV. Однако такой подход снижает эффективность доставки, а также разрезания ДНК-мишени [140].

НЕВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ

Основные особенности невирусных векторов следующие: они обладают большей ёмкостью, более просты в сборке и более безопасны. Однако их главным недостатком является низкая эффективность доставки. Современные невирусные векторы представлены в основном липосомами, полимерами и наночастицами. Вероятно, их дальнейшее развитие приведет к повышению эффективности доставки [141, 142].

Липидные векторы относятся к наиболее широко используемым невирусным векторам. Введение в клетки молекул с помощью липидов называется трансфекцией. Липидные частицы могут быть как нейтральными, так и катионными – для слияния с мембраной клетки и переноса нуклеиновых кислот. Нейтральные липиды чаще всего используются как вспомогательные для повышения трансфекционной активности липосом. Недавнее развитие липосомальных систем привело к появлению липидных наночастиц (ЛНЧ) на основе

ионизируемых катионных липидов, у которых за счет третичной аминогруппы положительный заряд возникает при пониженном pH, характерном для поздних эндосом. Показано, что с помощью биоразлагаемых катионных ЛНЧ можно доставлять комплекс Cas–sgRNA в клетки и индуцировать эффективный нокаут гена [143]. Наличие дисульфидной связи в липиде может действовать как механизм высвобождения, приводя к деградации частицы в клетках.

Частицы на основе полимеров можно использовать для доставки CRISPR–Cas так же, как и липиды. Такими материалами могут служить полиэтиленимин (PEI) и полиамидамин (PAMAM), чаще всего используемые для трансфекции. Катионные полимеры (PEI) могут образовывать комплексы с нуклеиновыми кислотами, индуцируя эпизомальное поглощение и высвобождение, подобно катионным липидам. В то же время дендритные структуры (PAMAM) состоят из ядра, от которого ответвляется полимер, и имеют на своей поверхности катионные первичные амины, которые могут образовывать комплексы с нуклеиновыми кислотами. Показана высокая эффективность и низкая цитотоксичность трансфекции с помощью PAMAM [144].

Также для доставки РНК и ДНК в клетки используют модифицированные наночастицы – как вирусоподобные, так и магнитные. Их собирают на основе ЛНЧ, но с определёнными модификациями. В случае вирусоподобных частиц проводят включение белков и гликопротеинов вирусной мембраны в липидную структуру частицы. Такая частица может направленно доставлять нуклеиновые кислоты в клетки-мишени, взаимодействуя с рецепторами на клеточной мембране. Таким образом, у ЛНЧ появляется специфичность к определённому виду клеток. В случае магнитных наночастиц вирусную частицу, которая по каким-то причинам не может быть доставлена в клеткам через среду организма, покрывают тонким слоем наночастиц железа, и тонкий луч магнитного поля направляет ее к клетке-мишени. В качестве примера можно привести бакуловирусный вектор, очень удобный в использовании, но подавляемый системой комплемента в крови. Будучи покрыт магнитными наночастицами, бакуловирусный вектор успешно минует систему комплемента и попадает в нужную ткань, после чего проникает в клетку-мишень и переносит в неё генетический материал [145]. Высокая безопасность такой системы обусловлена тем, что бакуловирусы не способны самостоятельно реплицироваться в клетках млекопитающих.

V. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИМИДЖИНГ НУКЛЕОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CRISPR–CAS9. ТРЕБОВАНИЯ К ВИЗУАЛИЗАЦИИ *IN VIVO*

Регуляция многих функций генома происходит на уровне трехмерной упаковки хроматина, которую также называют «организацией хроматина высокого порядка». Это понятие включает в себя хромосомные территории (СТ), которые в свою очередь подразделяются на компартменты А/В, топологически ассоциированные домены (TAD) и петли хроматина, опосредованные СССТС-связывающим фактором (CTCF). Организация хроматина высокого порядка варьируется в разных клетках, тканях и у разных видов организмов в зависимости от стадии развития и/или условий окружающей среды. Изучение этих процессов в пространстве и времени является предметом 4D-геномики [146]. Также в литературе используют термин «4D-нуклеом», охватывающий общую организацию внутриядерного пространства клетки [147].

Визуализация хроматина в реальном времени отвечает на фундаментальный вопрос о том, какие механизмы вовлечены в пространственную организацию генома [148]. Многие исследования указывают на то, что изменение пространственной организации нуклеома напрямую связано с развитием заболеваний у человека. Например, показано, что топологически ассоциированные домены влияют на локальные взаимодействия энхансера с промотором, что приводит к изменениям экспрессии генов, в том числе к активации онкогенов [149, 150].

Для визуализации белков и хроматина в клетках с использованием микроскопии высокого разрешения часто используют термин «имиджинг» (imaging). В традиционном же понимании термин «молекулярный имиджинг» включает в себя набор многочисленных методов визуализации молекулярных событий в режиме реального времени в живом организме [151]. В данном обзоре термины «молекулярный имиджинг» и просто «имиджинг» будут использованы применительно к прижизненной визуализации (*in vivo*), а также к визуализации *in situ* на уровне целого организма.

Важность использования прижизненного имиджинга для исследования нуклеома можно продемонстрировать на следующем примере. До сегодняшнего дня нет единого мнения касательно способа укладки нуклеосом: вопрос заключается в том, существует ли укладка волокна ДНК диаметром 10 нм (типа «бусинки на нитке») в волокно диаметром 30 нм *in vivo*, или же это наблюдается только *in vitro* [152]. Ответ на такой вопрос должен дать как раз молекулярный имиджинг.

Имеющиеся подходы по визуализации генома, успешно работающие на клетках, еще не превратились в технологии визуализации генома у животных. Особое внимание уделяют модульности и мультиплексности используемых методов, что позволяет быстро включать новые целевые участки при минимальной замене компонентов системы мечения. Поскольку требования к используемым меткам и методам визуализации формулируют, исходя из биологической задачи, метки должны иметь низкую токсичность и соответствовать требованиям биологической безопасности. От методов флуоресцентной визуализации требуется достаточная чувствительность, сочетанные технологии имиджинга должны обеспечить «привязку» флуоресцентного сигнала к участку ткани или органа.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ МЕЧЕННЫХ ЛОКУСОВ ХРОМАТИНА

Методы сверхразрешающей микроскопии являются основой для получения новых данных по трехмерному расположению флуоресцентно меченных участков хроматина [153]. Чтобы установить структуру хроматина более высокого порядка *in vivo*, методы микроскопии дополняют биохимическими подходами и методами, основанными на 3С [92]. Для наблюдения за трехмерной структурой генома с начала 2000-х годов используют комбинацию микроскопии высокого разрешения с различными FISH-зондами [154]. Локализационную микроскопию высокого разрешения использовали для наноструктурного анализа доменов хроматина, меченных методом FISH (средняя точность локализации 20 нм) [155]. Метод оптической реконструкции архитектуры хроматина (ORCA) позволил провести визуализацию хроматина в пределах небольших областей (длиной 100–700 килобаз) и отразить взаимодействия между регуляторными элементами у дрозофил (геномное разрешение до 2 килобаз) [156]. Комбинация FISH-окрашивания и интерферометрической фотоактивируемой локализационной микроскопии (iPALM) со специальным алгоритмом реконструкции позволили получить изображение CTCF-опосредованной петли хроматина в лимфобластоидных клетках человека с точностью локализации олигонуклеотида 2–22 нм [152]. К настоящему времени получены новые данные в области визуализации динамики хроматина, изучается роль репликационного стресса, а также роль потери функций ключевых регуляторов динамики гистонов в развитии глобальных эпигенетических изменений, в том числе в развитии предраковых состояний [157–159].

Основные трудности, с которыми приходится сталкиваться при визуализации организации хроматина высокого порядка *in situ*, связаны с проблемой специфического мечения ДНК и ограниченным разрешением микроскопии [153]. Кроме того, некоторые сложности обусловлены оптическими свойствами биологических тканей: так, автофлуоресценция тканей увеличивает фоновый сигнал. Помимо этого, могут возникать артефакты из-за рассеянного света, фотообесцвечивания, неравномерного освещения образца, длины светового пути или изменения интенсивности возбуждения [160]. В меньшей степени эти ограничения действуют при измерении времени жизни флуоресценции (FLIM – fluorescence lifetime imaging) [160]. Основное преимущество FLIM состоит в том, что время жизни флуоресценции является абсолютной величиной, то есть не зависит от концентрации флуорофора, и может быть воспроизведено при разных настройках прибора (интенсивности возбуждения, чувствительности детектора, длине оптического пути и т.д.) [161].

Существует ряд модификаций метода FLIM, предоставляющих детальную информацию о фотофизических явлениях, которые трудно или невозможно наблюдать при измерении интенсивности флуоресценции. Так, степень уплотнения хроматина можно рассчитать на основе обратных квадратичных соотношений между временем жизни флуоресценции зондов, встроенных в ДНК, и их локальным показателем преломления, изменяющимся при уплотнении структуры ДНК [162, 163].

Наиболее распространенная в биологии модификация FLIM использует Фёрстеровский резонансный перенос энергии (FRET), при котором происходит безызлучательный перенос энергии от донора флуоресценции к акцептору. Для этого оба флуорофора должны находиться в непосредственной близости друг от друга (менее 10 нм), вызывая депопуляцию возбужденных электронных состояний донора. В результате время жизни флуоресценции у донора уменьшается, а у акцептора увеличивается, что позволяет обнаружить пространственную ассоциацию между флуорофорами [160, 164]. FRET зарекомендовал себя как метод изучения структурных и динамических изменений нуклеосом как на уровне ансамбля, так и на уровне отдельных молекул [165]. С использованием FLIM-FRET была продемонстрирована существенная разница в компактизации эухроматина и гетерохроматина [163]. При экспрессии в клетках HeLa гистонов H2B, слитых с флуоресцентными белками eGFP и mCherry, с использованием FLIM-FRET удалось оценить динамику уплотнения хроматина на уровне нуклеосом во время ответа на повреждение ДНК [166].

Необходимо подчеркнуть преимущество имиджинга на основе генетически кодируемых флуоресцентных белков, вклад которых в изучение молекулярных взаимодействий в биологии и биомедицине неочевиден [167, 168]. Большое разнообразие сенсоров для визуализации сконструировано на основе FRET-пар цветных флуоресцентных белков [159, 169].

Данный подход был успешно реализован нами ранее для визуализации активности каспазы-3 в опухолевых клетках и подкожных ксенографтах опухолей человека на мышах линии nude с помощью FRET-сенсора. Сенсор каспазы был сконструирован на основе пары цветных белков: TagRFP выступал в качестве донора флуоресценции, а хромопротеин KFP – в качестве акцептора. Мониторинг активации каспазы-3 *in vivo* в ответ на противоопухолевую терапию проводили неинвазивно в течение длительного срока (порядка 30 дней) [170–172].

Для визуализации флуоресцентно меченных генетически кодируемых CRISPR-Cas9 применимы те же подходы, что и для визуализации FRET-пар. При подключении математических расчетов метод FLIM-FRET также позволяет оценивать расстояние между молекулами [161].

При измерении времени жизни флуоресценции основные недостатки включают длительное время сбора данных, которое может помешать визуализации быстрых событий, а также высокие требования к точности измерения отклика прибора. Кроме того, время жизни флуоресценции чувствительно к изменениям температуры, pH и вязкости, что усложняет интерпретацию данных. Ряд работ предлагает FLIM с повышенной производительностью, пригодный для визуализации быстрых молекулярных процессов в динамике [173–175]. Для того чтобы снизить автофлуоресценцию тканей и увеличить глубину проникновения, возможно использовать электромагнитное излучение в красном и ближнем инфракрасном (NIR) диапазоне спектра, поскольку фотоны соответствующих энергий (как возбуждающие флуоресценцию, так и испускаемые) слабо поглощаются живыми тканями [176, 177].

Сочетание флуоресцентного имиджинга с другими техниками визуализации (в том числе с магнитно-резонансной томографией) обеспечит привязку обнаруженного флуоресцентного сигнала к определенному морфологическому участку ткани или органа. Различные методы имиджинга могут удачно дополнять друг друга при решении тех или иных задач.

МУЛЬТИМОДАЛЬНЫЙ ИМИДЖИНГ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ НУКЛЕОМА

Технологии молекулярной визуализации, помимо оптического имиджинга, включают однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (ОФЭКТ), позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), магнитно-резонансную томографию (МРТ), рентгеновскую компьютерную томографию (КТ), ультразвуковую томографию. Однако эти методы сильно различаются по своей чувствительности и стоимости [178, 179]. КТ, МРТ и оптические методы хорошо дополняют друг друга. Такие мультимодальные подходы успешно реализуются в области доклинических исследований [180]. Использование сочетанных МРТ-оптических меток позволяет получить макроскопическое МРТ-изображение с пространственным разрешением ~50 мкм [179]. Флуоресцентная визуализация *in vitro* может отображать подробную микроскопическую информацию на субклеточном уровне, а контрастное вещество для МРТ может быть непосредственно помечено флуоресцентными красителями, обеспечивая бимодальную визуализацию [181]. Разнообразие МРТ-меток представляет собой линейку от низкомолекулярных T1- и T2-контрастных агентов до бимодальных зондов и многофункциональных наночастиц на основе композитных наноматериалов [182, 183].

Высококонтрастные изображения с высоким пространственным разрешением в режиме реального времени и локализация молекулярных событий могут быть получены путем сочетания активируемой флуоресценции (за счет флуорогенной реакции) и активируемой МРТ (посредством самосборки *in situ*). Так, зонд P-CyFF-Gd активировался эндогенной щелочной фосфатазой, сверхэкспрессируемой на клеточных мембранах; при этом в мембране собирались наночастицы, которые непосредственно визуализировались в живых клетках и в организме мышей [184]. Такая стратегия может быть применена при разработке других активируемых зондов для бимодальной визуализации, в том числе для визуализации CRISPR-Cas9.

Ценной находкой является тот факт, что некоторые низкомолекулярные вещества, зарегистрированные как рентгенконтрастные или магнито-резонансные контрастные препараты, способны давать эффект оптического просветления, а также усиливать флуоресценцию глубоких молекулярных маркеров, экспрессируемых *in vivo*.

МЕТОДЫ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ

Детекция флуоресценции низкой интенсивности в живых тканях представляет непростую задачу. Длительная экспозиция не решает данную проблему, так как приводит к пропорциональному увеличению

соотношения сигнал/фон. В этом случае простым, но эффективным средством повышения контраста флуоресцентного изображения является использование оптического просветления.

Большинство биологических тканей являются оптически непрозрачными, поскольку поглощают и рассеивают свет. Основные зоны поглощения в УФ-диапазоне таковы: 200 и 230 нм (белки), 260 нм (ДНК и РНК), 275 и 345 нм (окисленный гемоглобин), 275 и 360 нм (восстановленный гемоглобин) [185]. Хотя одним из стандартных методов измерения концентрации очищенных белков является спектрофотометрия при 280 нм (что обусловлено поглощением остатков триптофана, тирозина и фенилаланина), поглощение белков значительно выше в области 200–230 нм за счет пептидной связи. Поэтому именно эта область считается «белковой» в контексте оптической прозрачности тканей. Основные зоны поглощения биологических тканей в видимом и ИК-диапазоне следующие: 970, 1180, 1450, 1775, 1930 и 1975 нм (вода), примерно 760, 830, 920, 1040, 1210, 1430, 1730, 1760 и 1900–2600 нм (липиды), 420 и 550 нм (восстановленный гемоглобин), 410, 540 и 575 нм (окисленный гемоглобин) [185]. Между указанными зонами высокого поглощения находятся пять «окон»: 350–400 нм (I), 625–975 нм (II), 1100–1350 нм (III), 1600–1870 нм (IV) и 2100–2300 нм (V) [186].

В то время как поглощение света является неизбежным следствием биохимического состава ткани, рассеяние света в биологических образцах можно уменьшить. Для этого применяются методы оптического просветления. В их основе лежат три основных механизма [187, 188]: снижение разницы между показателями преломления у разных компонентов изучаемой ткани, дегидратация ткани под действием просветляющего агента и изменение структуры коллагеновых волокон. Наиболее простым способом просветления является помещение тонкого среза ткани в иммерсию, имеющую высокий показатель преломления. Известно много веществ, способных выступать в роли просветляющих агентов, в том числе формамид, глицерин, глюкоза, сахароза, диметилсульфоксид (ДМСО), различные полиэтиленгликоли. Так, обработка мышечной ткани 60 %-ным водным раствором глицерина позволяет добавить к вышеперечисленным оптическим «окнам» еще два: при 230 и 300 нм [185].

Большинство работ по оптическому просветлению выполнено *ex vivo* – на образцах тканей, полученных от убитых животных или из человеческого биопсийного материала. Однако наиболее перспективными являются исследования *in vivo*, позволяющие проводить прижизненную визуализацию изучаемых тканей и органов. Для таких работ требуются нетоксичные просветляющие агенты, оказы-

вающие лишь временное воздействие на живые ткани и создающие минимальные долговременные эффекты.

Среди низкомолекулярных веществ, зарегистрированных в качестве медицинских препаратов для контрастирования, некоторые способны давать эффект оптического просветления. Это йогексол (препарат Омнипак) и йодиксанол (препарат Визипак) – рентгеноконтрастные средства; гадобутрол (препарат Гадовист), гадопентетовая кислота (препарат Магневист), гадотеровая кислота (препарат Дотарем) – магнитно-резонансные контрастные средства [189–191]. Такие препараты позволяют получать оптическое изображение повышенной контрастности и синхронизировать его с МРТ-изображением того же участка ткани или органа. Обычный способ применения подразумевает нанесение таких средств на поверхность кожи на 10–15 мин. Но эффект просветления реализуется и при внутривенном введении подобных препаратов, как это недавно показано для Гадовиста [192]. Таким образом, расширяются возможности мультимодального исследования опухолей: лазерная флуоресценция и оптическая когерентная томография могут совмещаться с магнитно-резонансной и компьютерной томографией [191].

Стоит отметить, что флуоресценция очень чувствительна к микроокружению флуорофора, в том числе к полярности растворителя. Поэтому просветление тканей может существенно изменять свойства флуорофоров. Например, для DAPI и флуорофоров из группы Alexa Fluor показано, что просветление с помощью смеси бензилового спирта и бензилбензоата не только изменяет интенсивность флуоресценции, но и сдвигает положение максимумов на спектрах поглощения и испускания вплоть до нескольких десятков нм [193]. Этот эффект необходимо учитывать при подборе оптических фильтров для работы с биологическими образцами, чтобы избежать смешения сигналов. Та же смесь бензилового спирта и бензилбензоата приводит к тушению флуоресценции eGFP до уровня фона [193]. Напротив, просветление с помощью гадобутрола увеличивает интенсивность флуоресценции красного флуоресцентного белка (TagRFP) вплоть до 1,5 раз [194].

Еще одна деталь, которую необходимо учесть при работе с просветляющими агентами, состоит в том, что снижение рассеяния не только способствует проникновению в изучаемую ткань возбуждающих фотонов, но и облегчает вылет испускаемых фотонов из этой ткани. По этой причине чрезмерное просветление, полученное за счет слишком высокой концентрации вещества или слишком длительной обработки, приводит к падению регистрируемого сигнала [188].

Все это необходимо учитывать при разработке сочетанных подходов прижизненной визуализации.

ТРЕБОВАНИЯ ПО ОТСУТСТВИЮ ТОКСИЧНОСТИ.
БИОБЕЗОПАСНОСТЬ

Кроме упомянутых выше требований к имиджингу хромосомных локусов, как то: чувствительность на молекулярном уровне, привязка к морфологической структуре, – возникают требования по низкой токсичности компонентов системы, а также по характеристикам ADME.

ADME (A – adsorbtion, D – distribution, M – metabolism, E – excretion) расшифровывается как «абсорбция, распределение, метаболизм и экскреция». Классические параметры ADME обычно используют для характеристики фармацевтических продуктов. Однако в случае препаратов для генной терапии подобная оценка должна быть расширена, поскольку классические параметры ADME применимы лишь для дополнительных компонентов генно-модифицированных тканей и клеток, например, для флуорогенных субстратов или меток. Аналогично требованиям к векторам, переносящим гены в рамках генной терапии [195], стандарты ADME требуют расширения трактовки и в случае стабильных систем экспрессии генно-инженерных продуктов в клетках млекопитающих. Информация по ADME компонентов вирусных векторов, важных для надлежащей оценки рисков, представлена в ряде фундаментальных исследований, а также в испытаниях методов генной терапии человека [196]. Так, в свое время было проведено исследование [197] по изучению потенциального выделения вирусных векторов подопытными животными после внутривенного введения им таких векторов. В экспериментах оценивали предел обнаружения лентивируса третьего поколения, рекомбинантного аденоассоциированного вируса и аденовируса с делецией E1, тестируемых непосредственно из стада и после нанесения на пластиковые клетки и подстилку. Признаков амплификации вирусов не было обнаружено нигде: ни в крови, ни в моче, ни в экскрементах, ни в местах инъекций, ни на подстилке. Наиболее безопасным вектором оказался рекомбинантный аденоассоциированный вирус, не обладающий известной патогенностью для человека. Был сделан вывод, что обычно используемые вирусные векторы с дефицитом репликации представляют минимальный риск заражения через 72 часа после инокуляции. Меры предосторожности на уровне биобезопасности животных 2 оправданы во время первоначального введения, но после смены клетки может быть достаточно мер безопасности уровня 1.

РАЗРАБОТКА ПРИЖИЗНЕННЫХ СИСТЕМ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
НА ОСНОВЕ CRISPR–CAS9: ОТ *IN VITRO* К *IN VIVO*

Для применения в живых организмах наиболее предпочтительны так называемые тераностические (одновременно диагностические и терапевтические) зонды. К ним можно причислить систему CRISPR–Cas9: с одной стороны, она подразумевает адресную доставку к последовательности-мишени, с другой стороны, она обеспечивает терапевтический ответ, проявляющийся в генетическом редактировании ДНК [4, 179]. Система CRISPR–Cas9 наиболее эффективна при лечении моногенных заболеваний, таких как болезнь Хантингтона, муковисцидоз, талассемия и серповидноклеточная анемия. Однако в числе потенциальных мишеней CRISPR–Cas9 находятся и многофакторные заболевания, такие как рак, диабет и сердечно-сосудистые заболевания [4, 6, 198]. На сегодняшний день препараты на основе компонентов системы CRISPR–Cas9 уже проходят доклинические и клинические испытания. Так, в 2021 году исследователи сообщили об успешном применении нового лекарственного комплекса NTLA-2001, представляющего собой липидные наночастицы с включенной мРНК Cas9 из *Streptococcus pyogenes* и sgRNA CRISPR, у шести пациентов, страдающих от транстретинового амилоидоза с полинейропатией [199].

Другое направление в использовании системы CRISPR–Cas9 связано с усовершенствованием комплекса для мечения и визуализации генома и нуклеома. К 2013 году был разработан способ доставки молекулярного комплекса CRISPR–Cas9, успешно продемонстрированный в культуре человеческих клеток [200]. Данной технологии присвоили аббревиатуру RGEN (RNA-guided endonuclease), и благодаря ряду преимуществ она заняла лидирующее место в линейке таких методов, как ZFN и TALEN. Методика RGEN отличается более простым дизайном: выбор целевого сайта определяется исключительно комплементарностью его гетероциклических оснований к спейсеру sgRNA, не требуется повторное конструирование белка для каждого нового целевого сайта. Немаловажным преимуществом данной технологии является возможность мультиплексирования – сочетания экспрессии Cas9 с доставкой нескольких sgRNA. В 2013 году было показано, как можно использовать систему для визуализации работы теломер и внутриядерной локализации локусов гена мембранного муцина (MUC4) [110]. В пионерской работе [5] были протестированы варианты dCas9 с использованием sgRNA, специфичных для теломерных последовательностей. Было показано, что различные флуоресцентно меченные изоформы dCas9 эффективно направляются на

правильную последовательность-мишень. Авторы смогли пометить две разные пары хромосом, используя sgRNA, специфичные для последовательностей на хромосомах 9 и 13. Затем они обратили внимание на картирование пар внутрихромосомных локусов. Были определены локусы с расстояниями 75 и 2 мегабаз, при этом рассчитанные флуоресцентные расстояния коррелировали с ранее установленной физической картой. Сравнивая пары мишеней на расстоянии ~2 мегабазы друг от друга, они заметили, что могут оценить степень уплотнения хроматина даже на этом небольшом расстоянии. Эта работа представляет собой первое картирование внутрихромосомных локусов.

Использование системы CRISPR–Cas9 в комбинации с микроскопией сверхвысокого разрешения может улучшить разрешение, однако не решает проблем наличия фонового сигнала и низкой чувствительности метода. Одним из возможных решений является использование SunTag [111] – полипептидного каркаса, с которым одновременно связывается много молекул флуоресцентного белка. По оценкам авторов, для получения детектируемого сигнала необходимо как минимум 150–200 молекул флуоресцентного белка. Уровень сигнала увеличивается на порядки, что позволяет снизить мощность облучения при визуализации, уменьшая таким образом фотообесцвечивание и фототоксичность.

Прижизненная визуализация продемонстрирована на сегодняшний день с помощью метода LiveFISH (флуоресцентная гибридизация живых клеток CRISPR *in situ*, с использованием флуоресцентных олигонуклеотидов) [201]. Химически синтезированные флуоресцентные sgRNA в комплексе с белками dCas могут способствовать быстрому, надежному и масштабируемому отслеживанию геномной ДНК и визуализации РНК в живых клетках, включая первичные клетки (изолированные из организма с ограниченной продолжительностью жизни).

Рассмотрим основные типы молекул и наиболее перспективные с нашей точки зрения подходы, с помощью которых можно проводить прижизненную визуализацию хроматина *in vivo*. Еще раз подчеркнем, что интерес представляют те подходы, которые могут обеспечить мультиплексность, универсальность (быстрые конструктивные замены одной или двух компонент системы мечения) и возможность мультимодальной визуализации, а также обладают низкой токсичностью и характеризуются хорошей фармакокинетикой и фармакодинамикой низкомолекулярных компонентов систем CRISPR–Cas9, например, флуорогенных субстратов.

Наиболее часто используемое и, на первый взгляд, простое решение – это внутриклеточная экспрессия химер ДНК-связывающих белков (например, dCas9) с флуоресцентными белками (dCas9-FP) в сочетании с соответствующими sgRNA. Такие конструкции включают два основных компонента, ранее оптимизированные для транскрипции в клетках животных. Они снабжены пептидными сигналами для транспорта в ядро (белки Cas исходно являются прокариотическими) и несут на себе различные наборы и количества копий флуоресцентных белков. Подобные конструкции ранее доставляли в клетки с применением трансфекции соответствующих векторов, в условиях нерегулируемой конститутивной экспрессии белковых продуктов [5, 126, 201, 202]. Фолдинг флуоресцентных белков в клетках эукариот происходит быстро (20–150 мин), и, как правило, этого достаточно для решения определенных задач. Однако несмотря на то, что токсичность самих флуоресцентных белков в культуре клеток и *in vivo* низка [203, 204], химерные конструкции с флуоресцентными белками способны накапливаться в цитоплазме, что может вызывать стресс эндоплазматического ретикулума [205–207]. Это ограничивает возможности проведения долгосрочных экспериментов на живых клетках и тканях.

Для двуцветного или полихроматического мечения структур внутри ядер животных клеток было предложено использовать ДНК/РНК-связывающие белки на основе нескольких ортологов dCas9 из разных видов микроорганизмов. С одной стороны, применение ортологов увеличивает число возможных РАМ-последовательностей при выборе сайта-мишени. С другой стороны, оно дает возможность для мультиплексирования: позволяет создавать химеры разных ортологов с различными флуоресцентными белками [5, 127]. Тем не менее, для визуализации взаимного расположения ДНК-связанных белков одного только эффекта полихроматической флуоресценции недостаточно. Необходима работа над инженерией зондов и оптимизацией пары флуоресцентных белков [208, 209]. При правильном подборе FRET-пары можно судить о расстоянии между флуоресцентными зондами, связанными с пространственно сближенными элементами в составе петель хроматина.

В то время как флуоресцентные белки способны флуоресцировать сразу после созревания/фолдинга независимо от локализации в клетке, альтернативой им могут служить химеры dCas9 с ферментами-метчиками, каталитическую активность которых в ядре можно обнаруживать с помощью специальных флуоресцентных (квази) субстратов. Добавление флуоресцентных (квази) субстратов трех ферментов-метчиков (Halo, SNAP и CLIP) позволяет метить белки

в живых клетках благодаря проницаемости клеточных мембран для данных субстратов [210]. Субстраты фермента-метчика SNAP (продукт мутагенеза Об-метилгуанозинтрансферазы человека) и CLIP (O2-бензилцитозинтрансферазы), являющегося продуктом мутагенеза SNAP, коммерчески доступны, причем реакция с участием SNAP идет со скоростью, на порядок превышающей скорость реакции с участием CLIP. Несмотря на это, сочетание экспрессии парных химер SNAP/Halo или SNAP/CLIP дает возможность наблюдения за двумя продуктами реакции мечения флуоресцентными субстратами. Иными словами, ферментативные реакции, катализируемые этими парами ферментов-метчиков взаимоортологичны: способны протекать одновременно и независимо друг от друга.

Известно, что эндонуклеазы Cas9 и их каталитически неактивные мутанты dCas9 способны образовывать функционально полноценные химеры с флуоресцентными белками [5, 127, 211], ферментами редактирования оснований (например, деаминазой APOBEC) [212], а также аскорбатпероксидазой, способной биотинилировать ДНК-связанные белки [213]. Тем не менее, использование ферментов-метчиков для получения флуоресцирующих пар ортологов dCas9 с целью прямого ферментативного мечения с помощью флуоресцентных субстратов до сих пор не было исследовано. Единственное упоминание химеры Cas9 с ферментом SNAP встречается в работе [214] при получении ковалентных комплексов Cas9 и олигонуклеотидов, чтобы увеличить вероятность репарации инсерций и делеций в ДНК путем гомологичной рекомбинации в клетках животных.

Наконец, перспективным подходом в разработке прижизненных систем визуализации является создание sgRNA с включением в их последовательность коротких аптамеров, способных специфически связывать молекулы, которые флуоресцируют только после их связывания с аптамером. Получение и, в особенности, доставка подобных флуоресцентных зондов в живые клетки представляет собой сложную задачу, поскольку до сих пор в качестве лигандов аптамеров использовали олигонуклеотиды, несущие пару, состоящую из тушителя флуоресценции и флуорофора [215, 216]. Необходимость трансфекции клеток для доставки подобных олигонуклеотидов представляет собой препятствие для работы с животными.

Применение нефлуоресцирующих молекул в качестве лигандов, флуоресценция которых разгорается после связывания с аптамерами, представляет наибольший интерес при работе с тканями живых организмов. Исходные флуорогенные РНК-аптамеры были получены для определения красителя малахитового зеленого в растворах и живых тканях [217, 218]. Однако они непригодны для работы *in*

in vivo из-за высокой фототоксичности малахитового зеленого для живых клеток. В дальнейшем отбор аптамеров на основе их связывания с лигандами в сочетании с клеточной сортировкой позволил получить аптамер **tBroccoli**. Несмотря на невысокую аффинность ($K_D \sim 360$ нМ) к своему лиганду (замещенному гидроксibenзилденону, например, DFHBI-1T), tBroccoli создает уникальное окружение в области связывания нефлуоресцирующих молекул, сходных по структуре с флуорофорами зеленого флуоресцентного белка, причем коэффициент экстинкции у комплекса tBroccoli с лигандом составляет $29600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, что сравнимо с коэффициентами экстинкции флуоресцентных белков. Таким образом, комплекс tBroccoli с DFHBI-1T демонстрирует повышенную флуоресценцию по сравнению с другими РНК-аптамерами (Spinach2) [219].

Особенностью нового поколения флуорогенных РНК-аптамеров является их способность к фолдингу после образования химер слияния с 3'-концом любой малой РНК и образование флуоресцирующих комплексов с лигандами типа DFHBI-1T при физиологических условиях и в присутствии низких концентраций магния. После фолдинга этих коротких аптамеров (длина 49 н.о.) при связывании с флуорофорами они активируют флуоресцентные свойства DFHBI1T из-за изменения микроокружения, которое стабилизирует возбужденное состояние флуорофора. Это увеличивает квантовый выход флуоресценции DFHBI-1T в 1000 раз [219].

Недавняя работа с G-квадруплексобразующими аптамерами позволила обнаружить семейство коротких РНК (Mango I – Mango IV), которые способны с высокой аффинностью связывать производные индоцианинового красителя тиазолового оранжевого (ТО) с удлиненным карбометиновым мостиком (ТО3) [220, 221]. Можно создавать рекомбинантные молекулы РНК, в которых к исходным клеточным РНК присоединены РНК-аптамеры. При экспрессии подобных рекомбинантных РНК комплекс аптамера Mango IV с ТО3 легко обнаруживается в клетках млекопитающих. ТО3 флуоресцирует в красной области спектра в результате bathochromного сдвига пика спектра поглощения и флуоресценции ТО [222]. Данный подход используется как для выделения рибонуклеопротеинов [223], так и для оптического имиджинга живых клеток, поскольку производные ТО нетоксичны, проникают через биологические мембраны и практически не флуоресцируют в свободном (не связанном с РНК) состоянии [224]. Комплекс аптамера типа tBroccoli (или его димерной формы) с DFHBI-1T может образовывать FRET-пару, в которой акцептором служит комплекс Mango IV–ТО3 [221].

Несмотря на важность картирования генома в контексте его редактирования, вышеописанные подходы на сегодняшний день не апробированы для визуализации близких взаимодействий пары рибонуклеопротеиновых зондов в экспериментах *in vivo*. Можно предположить, что одним из наиболее перспективных подходов имиджинга CRISPR–Cas9 *in vivo* является использование флуорогенных РНК-аптамеров и нетоксичных низкомолекулярных флуорогенных лигандов, которые, в свою очередь, могут быть связаны с парамагнитной меткой (контрастным веществом для МРТ) [181].

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Один из новейших способов применения флуоресцентно меченного белка Cas9 в современной молекулярной биологии – это многоцветное мечение нескольких геномных локусов в живых клетках с помощью системы CRISPR–Cas9, разработанное в лаборатории Тору Педерсона [5]. Оно приближает нас к картированию 4D-нуклеома, а также к пониманию того, как ядерная организация меняется в течение жизни клетки в норме и патологии. Современные методы оптической визуализации (в частности, микроскопии клеток) в состоянии обеспечить визуализацию явлений на уровне компактизации (физического уплотнения) структуры хроматина в отдельной клетке. Они также позволяют вести наблюдение за взаимодействиями хроматин-связывающих белков в ядрах живых клеток.

Получение и анализ изображений, отражающих взаимное пространственное расположение отдельных элементов генома, является важным направлением исследований как с точки зрения фундаментальных научных проблем функциональной геномики и молекулярной биофизики, так и для практических целей, связанных с необходимостью вести редактирование геномов соматических клеток в естественном микроокружении ткани. Важность прижизненного исследования подтверждается рядом последних работ, в которых данные по укладке нуклеома *in vitro* отличаются от таковых при обращении к прижизненному наблюдению.

Благодарности. Авторы выражают благодарность профессору Богданову А.А. мл. (Медицинский факультет Массачусетского университета, Вустер) за ценные советы и критические замечания при подготовке обзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dekker, J., Belmont, A.S., Guttman, M., Leshyk, V.O., Lis, J.T., Lomvardas, S., Mirny, L.A., O'Shea, C.C., Park, P.J., Ren, B., Politz, J.C.R., Shendure, J., Zhong, S. 4D Nucleome Network. (2017) The 4D nucleome project, *Nature*, **549**, 219–226.
2. Zhu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Tian, D., Belmont, A.S., Swedlow, J.R., Ma, J. (2022) Nucleome Browser: an integrative and multimodal data navigation platform for 4D Nucleome, *Nature Methods*, **19**, 911–913.
3. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, **337**, 816–821.
4. Kotagama, O.W., Jayasinghe, C.D., Abeysinghe, T. (2019) Era of genomic medicine: a narrative review on CRISPR technology as a potential therapeutic tool for human diseases, *BioMed research international*, **2019**, 1369682.
5. Ma, H., Naseri, A., Reyes-Gutierrez, P., Wolfe, S.A., Zhang, S., Pederson, T. (2015) Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 3002–3007.
6. Xu, X., Hulshoff, M.S., Tan, X., Zeisberg, M., Zeisberg, E.M. (2020) CRISPR/Cas derivatives as novel gene modulating tools: possibilities and *in vivo* applications, *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 3038.
7. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A. (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product, *Journal of Bacteriology*, **169**, 5429–5433.
8. Mojica, F.J., Juez, G., Rodríguez-Valera, F. (1993) Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites, *Molecular Microbiology*, **9**, 613–621.
9. Sorek, R., Lawrence, C.M., Wiedenheft, B. (2013) CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea, *Annual review of Biochemistry*, **82**, 237–266.
10. Lander, E.S. (2016) The Heroes of CRISPR, *Cell*, **164**, 18–28.
11. Mohanraju, P., Makarova, K.S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V., van der Oost, J. (2016) Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems, *Science*, **353**, aad5147.
12. Koonin, E.V., Makarova, K.S. (2017) Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-Cas systems: all the way there and back, *Genome Biology and Evolution*, **9**, 2812–2825.
13. Jansen, R., Embden, J.D., Gaastra, W., Schouls, L.M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Molecular Microbiology*, **43**, 1565–1575.
14. Makarova, K.S., Aravind, L., Grishin, N.V., Rogozin, I.B., Koonin, E.V. (2002) A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis, *Nucleic Acids Research*, **30**, 482–496.
15. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., Ehrlich, S.D. (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin, *Microbiology (Reading)*, **151**, 2551–2561.
16. Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements,

- Journal of Molecular Evolution*, **60**, 174–182.
17. Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action, *Biology Direct*, **1**, 7.
 18. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science*, **315**, 1709–1712.
 19. Faure, G., Makarova, K.S., Koonin, E.V. (2019) CRISPR-Cas: Complex functional networks and multiple roles beyond adaptive immunity, *Journal of Molecular Biology*, **431**, 3–20.
 20. Gleditzsch, D., Pausch, P., Müller-Esparza, H., Özcan, A., Guo, X., Bange, G., Randau, L. (2019) PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures, *RNA Biology*, **16**, 504–517.
 21. Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Scott, D., Shah, S.A., Siksnys, V., Terns, M.P., Venclovas, Č., White, M.F., Yakunin, A.F., Yan, W., Zhang, F., Garrett, R.A., Backofen, R., van der Oost, J., Barrangou, R., Koonin, E.V. (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants, *Nature reviews. Microbiology*, **18**, 67–83.
 22. Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S.A., Saunders, S.J., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Terns, R.M., Terns, M.P., White, M.F., Yakunin, A.F., Garrett, R.A., van der Oost, J., Backofen, R., Koonin, E.V. (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems, *Nature Reviews. Microbiology*, **13**, 722–736.
 23. Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., van der Oost, J. (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes, *Science*, **321**, 960–964.
 24. Jore, M.M., Lundgren, M., van Duijn, E., Bultema, J.B., Westra, E.R., Waghmare, S.P., Wiedenheft, B., Pul, U., Wurm, R., Wagner, R., Beijer, M.R., Barendregt, A., Zhou, K., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Doudna, J.A., Boekema, E.J., Heck, A.J., van der Oost, J., Brouns, S.J. (2011) Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nature structural and molecular biology*, **18**, 529–536.
 25. Sinkunas, T., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. (2011) Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system, *The EMBO Journal*, **30**, 1335–1342.
 26. Xiao, Y., Luo, M., Dolan, A.E., Liao, M., Ke, A. (2018) Structure basis for RNA-guided DNA degradation by Cascade and Cas3, *Science*, **361**, eaat0839.
 27. Taylor, D.W., Zhu, Y., Staals, R.H., Kornfeld, J.E., Shinkai, A., van der Oost, J., Nogales, E., Doudna, J.A. (2015) Structural biology. Structures of the CRISPR-Cmr complex reveal mode of RNA target positioning, *Science*, **348**, 581–585.
 28. Mogila, I., Kazlauskienė, M., Valinskyte, S., Tamulaitiene, G., Tamulaitis, G., Siksnys, V. (2019) Genetic dissection of the type III-A CRISPR-Cas system Csm complex reveals roles of individual subunits, *Cell reports*, **26**, 2753–2765.e4.

29. You, L., Ma, J., Wang, J., Artamonova, D., Wang, M., Liu, L., Xiang, H., Severinov, K., Zhang, X., Wang, Y. (2019) Structure studies of the CRISPR-Csm complex reveal mechanism of co-transcriptional interference, *Cell*, **176**, 239-253.e16.
30. Crawley, A.B., Henriksen, J.R., Barrangou, R. (2018) CRISPRdisco: an automated pipeline for the discovery and analysis of CRISPR-Cas systems, *The CRISPR Journal*, **1**, 171-181.
31. Garcia-Doval, C., Jinek, M. (2017) Molecular architectures and mechanisms of Class 2 CRISPR-associated nucleases, *Current Opinion in Structural Biology*, **47**, 157-166.
32. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., Charpentier, E. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III, *Nature*, **471**, 602-607.
33. Chylinski, K., Le Rhun, A., Charpentier, E. (2013) The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biology*, **10**, 726-737.
34. Nethery, M.A., Barrangou, R. (2019) Predicting and visualizing features of CRISPR-Cas systems, *Methods in Enzymology*, **616**, 1-25.
35. Mali, P., Esvelt, K.M., Church, G.M. (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology, *Nature Methods*, **10**, 957-963.
36. Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A.T., Charpentier, E., Nogales, E., Doudna, J.A. (2014) Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation, *Science*, **343**, 1247997.
37. Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O. (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA, *Cell*, **156**, 935-949.
38. Shmakov, S., Abudayyeh, O.O., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Gootenberg, J.S., Semenova, E., Minakhin, L., Joung, J., Konermann, S., Severinov, K., Zhang, F., Koonin, E.V. (2015) Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas systems, *Molecular Cell*, **60**, 385-397.
39. Harrington, L.B., Ma, E., Chen, J.S., Witte, I.P., Gertz, D., Paez-Espino, D., Al-Shayeb, B., Kyrpides, N.C., Burstein, D., Banfield, J.F., Doudna, J.A. (2020) A scoutRNA is required for some type V CRISPR-Cas systems, *Molecular Cell*, **79**, 416-424.e5.
40. O'Connell, M.R. (2019) Molecular Mechanisms of RNA Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas Systems, *Journal of Molecular Biology*, **431**, 66-87.
41. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, E2579-E2586.
42. Leenay, R.T., Beisel, C.L. (2017) Deciphering, communicating, and engineering the CRISPR PAM, *Journal of Molecular Biology*, **429**, 177-191.
43. Swarts, D.C., Jinek, M. (2018) Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure-function comparisons and implications for genome editing, *Wiley interdisciplinary reviews. Ribonucleic Acid*, **9**, e1481.
44. Khan, S., Sallard, E. (2022) Current and prospective applications of CRISPR-Cas12a in pluricellular organisms, *Molecular biotechnology*, doi: 10.1007/s12033-022-00538-5. Online ahead of print.

45. Feng, Y., Liu, S., Chen, R., Xie, A. (2021) Target binding and residence: a new determinant of DNA double-strand break repair pathway choice in CRISPR/Cas9 genome editing, *Journal of Zhejiang University. Science. B*, **22**, 73–86.
46. Huang, X., Yang, D., Zhang, J., Xu, J., Chen, Y.E. (2022) Recent advances in improving gene-editing specificity through CRISPR-Cas9 nuclease engineering, *Cells*, **11**, 2186.
47. Zhou, W., Yang, J., Zhang, Y., Hu, X., Wang, W. (2020) Current landscape of gene-editing technology in biomedicine: Applications, advantages, challenges, and perspectives, *Medicine Communications*, **3**, e155.
48. Ramachandran, G., Bikard, D. (2019) Editing the microbiome the CRISPR way. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **374**, 20180103.
49. Sirohi, U., Kumar, M., Sharma, V.R., Teotia, S., Singh, D., Chaudhary, V., Priya, Yadav, M.K. (2022) CRISPR/Cas9 system: A potential tool for genetic improvement in floricultural crops, *Molecular Biotechnology*, **64**, 1303–1318. doi: 10.1007/s12033-022-00523-y.
50. Negi, C., Vasistha, N.K., Singh, D., Vyas, P., Dhaliwal, H.S. (2022) Application of CRISPR-mediated gene editing for crop improvement, *Molecular Biotechnology*, **64**, 1198–1217, doi: 10.1007/s12033-022-00507-y.
51. Rasheed, A., Barqawi, A.A., Mahmood, A., Nawaz, M., Shah, A.N., Bay, D.H., Alahdal, M.A., Hassan, M.U., Qari, S.H. (2022) CRISPR/Cas9 is a powerful tool for precise genome editing of legume crops: a review, *Molecular Biology Reports*, **49**, 5595–5609.
52. Chaudhary, M., Mukherjee, T.K., Singh, R., Gupta, M., Goyal, S., Singhal, P., Kumar, R., Bhusal, N., Sharma, P. (2022) CRISPR/Cas technology for improving nutritional values in the agricultural sector: an update, *Molecular Biology Reports*, **49**, 7101–7110.
53. Zegeye, W.A., Tsegaw, M., Zhang, Y., Cao, L. (2022) CRISPR-based genome editing: advancements and opportunities for rice improvement, *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 4454.
54. Kumar, D., Yadav, A., Ahmad, R., Dwivedi, U.N., Yadav, K. (2022) CRISPR-based genome editing for nutrient enrichment in crops: a promising approach toward global food security, *Frontiers in Genetics*, **13**, 932859.
55. Osakabe, K., Wada, N., Murakami, E., Miyashita, N., Osakabe, Y. (2021) Genome editing in mammalian cells using the CRISPR type I-D nuclease, *Nucleic Acids Research*, **49**, 6347–6363.
56. Hou, Z., Hu, C., Ke, A., Zhang, Y. (2022) Introducing large genomic deletions in human pluripotent stem cells using CRISPR-Cas3, *Current Protocols*, **2**, e361.
57. Tan, R., Krueger, R.K., Gramelspacher, M.J., Zhou, X., Xiao, Y., Ke, A., Hou, Z., Zhang, Y. (2022) Cas11 enables genome engineering in human cells with compact CRISPR-Cas3 systems, *Molecular cell*, **82**, 852–867.e5.
58. Bonini, A., Poma, N., Vivaldi, F., Kirchhain, A., Salvo, P., Bottai, D., Tavanti, A., Di Francesco, F. (2021) Advances in biosensing: the CRISPR/Cas system as a new powerful tool for the detection of nucleic acids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, **192**, 113645.
59. Fapohunda, F.O., Qiao, S., Pan, Y., Wang, H., Liu, Y., Chen, Q., Lü, P. (2022) CRISPR Cas system: a strategic approach in detection of nucleic acids, *Microbiological Research*, **259**, 127000.
60. Li, X., Zhang, H., Zhang, J., Song, Y., Shi, X., Zhao, C., Wang, J. (2022) Diagnostic accuracy of CRISPR technology for detecting SARS-

- CoV-2: a systematic review and meta-analysis, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **22**, 655–663, doi: 10.1080/14737159.2022.2107425.
61. Xue, Y., Chen, Z., Zhang, W., Zhang, J. (2022) Engineering CRISPR/Cas13 system against RNA viruses: from diagnostics to therapeutics, *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, **9**, 291.
 62. Lou, J., Wang, B., Li, J., Ni, P., Jin, Y., Chen, S., Xi, Y., Zhang, R., Duan, G. (2022) The CRISPR-Cas system as a tool for diagnosing and treating infectious diseases, *Molecular Biology Reports*, doi: 10.1007/s11033-022-07752-z. Online ahead of print.
 63. Xie, S., Ji, Z., Suo, T., Li, B., Zhang, X. (2021) Advancing sensing technology with CRISPR: From the detection of nucleic acids to a broad range of analytes – A review, *Analytica Chimica Acta*, **1185**, 338848.
 64. Cheng, X., Li, Y., Kou, J., Liao, D., Zhang, W., Yin, L., Man, S., Ma, L. (2022) Novel non-nucleic acid targets detection strategies based on CRISPR/Cas toolboxes: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, **215**, 114559.
 65. Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., Lim, W.A. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression, *Cell*, **152**, 1173–1183.
 66. Xu, X., Qi, L.S. (2019) A CRISPR-dCas toolbox for genetic engineering and synthetic biology, *Journal of Molecular Biology*, **431**, 34–47.
 67. Pan, C., Wu, X., Markel, K., Malzahn, A.A., Kundagrami, N., Sretenovic, S., Zhang, Y., Cheng, Y., Shih, P.M., Qi, Y. (2021) CRISPR-Act3.0 for highly efficient multiplexed gene activation in plants, *Nature plants*, **7**, 942–953.
 68. Singh, V., Jain, M. (2022) Recent advancements in CRISPR-Cas toolbox for imaging applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, **42**, 508–531.
 69. Brezgin, S., Kostyusheva, A., Kostyushev, D., Chulanov, V. (2019) Dead Cas systems: types, principles, and applications, *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 6041.
 70. Enríquez, P. (2016) CRISPR-mediated epigenome editing, *The Yale Journal of Biology and Medicine*, **89**, 471–486.
 71. Xie, N., Zhou, Y., Sun, Q., Tang, B. (2018) Novel epigenetic techniques provided by the CRISPR/Cas9 system, *Stem Cells International*, **2018**, 7834175.
 72. Luo, M.L., Mullis, A.S., Leenay, R.T., Beisel, C.L. (2015) Repurposing endogenous type I CRISPR-Cas systems for programmable gene repression, *Nucleic Acids Research*, **43**, 674–681.
 73. Shams, A., Higgins, S.A., Fellmann, C., Laughlin, T.G., Oakes, B.L., Lew, R., Kim, S., Lukarska, M., Arnold, M., Staahl, B.T., Doudna, J.A., Savage, D.F. (2021) Comprehensive deletion landscape of CRISPR-Cas9 identifies minimal RNA-guided DNA-binding modules, *Nature Communications*, **12**, 5664.
 74. Karvelis, T., Bigelyte, G., Young, J.K., Hou, Z., Zedaveinyte, R., Budre, K., Paulraj, S., Djukanovic, V., Gasiior, S., Silanskas, A., Venclovas, Č., Siksnyš, V. (2020) PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage, *Nucleic Acids Research*, **48**, 5016–5023.
 75. Bigelyte, G., Young, J.K., Karvelis, T., Budre, K., Zedaveinyte, R., Djukanovic, V., Van Ginkel, E., Paulraj, S., Gasiior, S., Jones, S., Feigenbutz, L., Clair, G.S., Barone, P., Bohn, J., Acharya, A., Zastrow-Hayes, G., Henkel-Heinecke, S., Silanskas, A., Seidel, R., Siksnyš, V. (2021) Miniature type V-F CRISPR-Cas nucleases enable targeted DNA modification in

- cells, *Nature Communications*, **12**, 6191.
76. Ribeiro, L.F., Ribeiro, L.F.C., Barreto, M.Q., Ward, R.J. (2018) Protein engineering strategies to expand CRISPR-Cas9 applications, *International Journal of Genomics*, **2018**, 1652567.
77. Kempfer, R., Pombo, A. (2020) Methods for mapping 3D chromosome architecture, *Nature Reviews. Genetics*, **21**, 207–226.
78. de Jong, H. (2003) Visualizing DNA domains and sequences by microscopy: a fifty-year history of molecular cytogenetics. *Genome*, **46**, 943–946.
79. Cui, C., Shu, W., Li, P. (2016) Fluorescence *in situ* hybridization: cell-based genetic diagnostic and research applications, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **4**, 89.
80. Szabo, Q., Cavalli, G., Bantignies, F. (2021) Higher-order chromatin organization using 3D DNA fluorescent *in situ* hybridization, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **2157**, 221–237.
81. 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**, 1641–1659.e26.
82. Goel, V.Y., Hansen, A.S. (2021) The macro and micro of chromosome conformation capture, *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, **10**, e395.
83. Mohanta, T.K., Mishra, A.K., Al-Harrasi, A. (2021) The 3D genome: from structure to function, *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 11585.
84. Bouwman, B.A.M., Crosetto, N., Bienko, M. (2022) The era of 3D and spatial genomics, *Trends in genetics*, **38**, 1062–1075, doi: 10.1016/j.tig.2022.05.010.
85. Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., Kleckner, N. (2002) Capturing chromosome conformation, *Science*, **295**, 1306–1311.
86. de Wit, E., de Laat, W. (2012) A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization, *Genes and Development*, **26**, 11–24.
87. 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**, 1341–1347.
88. Giorgetti, L., Heard, E. (2016) Closing the loop: 3C versus DNA FISH, *Genome Biology*, **17**, 215.
89. Dostie, J., Richmond, T.A., Arnaout, R.A., Selzer, R.R., Lee, W.L., Honan, T.A., Rubio, E.D., Krumm, A., Lamb, J., Nusbaum, C., Green, R.D., Dekker, J. (2006) Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements, *Genome Research*, **16**, 1299–1309.
90. Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., Ren, B. (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions, *Nature*, **485**, 376–380.
91. 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. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome, *Science*, **326**, 289–293.

92. Fullwood, M.J., Liu, M.H., Pan, Y.F., Liu, J., Xu, H., Mohamed, Y.B., Orlov, Y.L., Velkov, S., Ho, A., Mei, P.H., Chew, E.G., Huang, P.Y., Welboren, W.J., Han, Y., Ooi, H. S., Ariyaratne, P.N., Vega, V.B., Luo, Y., Tan, P.Y., Choy, P.Y., Ruan, Y. (2009) An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome, *Nature*, **462**, 58–64.
93. Kong, S, Zhang, Y. (2019) Deciphering Hi-C: from 3D genome to function. *Cell Biology and Toxicology*, **35**, 15–32.
94. Deng, W., Shi, X., Tjian, R., Lionnet, T., Singer, R.H. (2015) CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 11870–11875.
95. Harrison, P.T., Hart, S. (2018) A beginner's guide to gene editing, *Experimental Physiology*, **103**, 439–448.
96. Krishna, S.S., Majumdar, I., Grishin, N.V. (2003) Structural classification of zinc fingers: survey and summary, *Nucleic Acids Research*, **31**, 532–550.
97. Gaj, T., Gersbach, C.A., Barbas, C.F., 3rd (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, *Trends in Biotechnology*, **31**, 397–405.
98. Kim, Y.G., Cha, J., Chandrasegaran, S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 1156–1160.
99. Li, L., Wu, L.P., Chandrasegaran, S. (1992) Functional domains in Fok I restriction endonuclease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 4275–4279.
100. Kim, Y.G., Chandrasegaran, S. (1994) Chimeric restriction endonuclease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 883–887.
101. Huang, B., Schaeffer, C.J., Li, Q., Tsai, M.D. (1996) Splase: a new class IIS zinc-finger restriction endonuclease with specificity for Sp1 binding sites, *Journal of protein chemistry*, **15**, 481–489.
102. Bitinaite, J., Wah, D.A., Aggarwal, A.K., Schildkraut, I. (1998) FokI dimerization is required for DNA cleavage, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 10570–10575.
103. Moore, R., Chandrachud, A., Bleris, L. (2014) Transcription activator-like effectors: a toolkit for synthetic biology, *ACS Synthetic Biology*, **3**, 708–716.
104. Lindhout, B.I., Fransz, P., Tessadori, F., Meckel, T., Hooykaas, P.J., van der Zaal, B.J. (2007) Live cell imaging of repetitive DNA sequences via GFP-tagged polydactyl zinc finger proteins, *Nucleic Acids Research*, **35**, e107.
105. Ma, H., Reyes-Gutierrez, P., Pederson, T. (2013) Visualization of repetitive DNA sequences in human chromosomes with transcription activator-like effectors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 21048–21053.
106. Miyanari, Y., Ziegler-Birling, C., Torres-Padilla, M.E. (2013) Live visualization of chromatin dynamics with fluorescent TALEs, *Nature Structural and Molecular Biology*, **20**, 1321–1324.
107. Thanisch, K., Schneider, K., Morbitzer, R., Solovei, I., Lahaye, T., Bultmann, S., Leonhardt, H. (2014) Targeting and tracing of specific DNA sequences with dTALEs in living cells, *Nucleic Acids Research*, **42**, e38.
108. Fujimoto, S., Sugano, S.S., Kuwata, K., Osakabe, K., Matsunaga, S.

- (2016) Visualization of specific repetitive genomic sequences with fluorescent TALEs in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, **67**, 6101–6110.
109. Ren, R., Deng, L., Xue, Y., Suzuki, K., Zhang, W., Yu, Y., Wu, J., Sun, L., Gong, X., Luan, H., Yang, F., Ju, Z., Ren, X., Wang, S., Tang, H., Geng, L., Zhang, W., Li, J., Qiao, J., Xu, T., Liu, G.H. (2017) Visualization of aging-associated chromatin alterations with an engineered TALE system, *Cell Research*, **27**, 483–504.
110. Chen, B., Gilbert, L.A., Cimini, B.A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G. W., Park, J., Blackburn, E.H., Weissman, J.S., Qi, L.S., Huang, B. (2013) Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system, *Cell*, **155**, 1479–1491.
111. 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**, 635–646.
112. Ye, H., Rong, Z., Lin, Y. (2017) Live cell imaging of genomic loci using dCas9-SunTag system and a bright fluorescent protein, *Protein and Cell*, **8**, 853–855.
113. Shao, S., Zhang, W., Hu, H., Xue, B., Qin, J., Sun, C., Sun, Y., Wei, W., Sun, Y. (2016) Long-term dual-color tracking of genomic loci by modified sgRNAs of the CRISPR/Cas9 system, *Nucleic Acids Research*, **44**, e86.
114. Wang, S., Su, J.H., Zhang, F., Zhuang, X. (2016) An RNA-aptamer-based two-color CRISPR labeling system, *Scientific reports*, **6**, 26857.
115. Fu, Y., Rocha, P.P., Luo, V.M., Raviram, R., Deng, Y., Mazzoni, E.O., Skok, J.A. (2016) CRISPR-dCas9 and sgRNA scaffolds enable dual-colour live imaging of satellite sequences and repeat-enriched individual loci, *Nature Communications*, **7**, 11707.
116. Johansson, H.E., Liljas, L., Uhlenbeck, O.C. (1997) RNA recognition by the MS2 phage coat protein, *Seminars in Virology*, **8**, 176–185.
117. Cheng, A.W., Jillette, N., Lee, P., Plaskon, D., Fujiwara, Y., Wang, W., Taghbalout, A., Wang, H. (2016) Casilio: a versatile CRISPR-Cas9-Pumilio hybrid for gene regulation and genomic labeling, *Cell Research*, **26**, 254–257.
118. Hong, Y., Lu, G., Duan, J., Liu, W., Zhang, Y. (2018) Comparison and optimization of CRISPR/dCas9/gRNA genome-labeling systems for live cell imaging, *Genome Biology*, **19**, 39.
119. Chaudhary, N., Nho, S.H., Cho, H., Gantumur, N., Ra, J.S., Myung, K., Kim, H. (2020) Background-suppressed live visualization of genomic loci with an improved CRISPR system based on a split fluorophore, *Genome Research*, **30**, 1306–1316.
120. Wu, X., Mao, S., Ying, Y., Krueger, C.J., Chen, A.K. (2019) Progress and challenges for live-cell imaging of genomic loci using CRISPR-based platforms, *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, **17**, 119–128.
121. Lee, C.M., Cradick, T.J., Bao, G. (2016) The *Neisseria meningitidis* CRISPR-Cas9 system enables specific genome editing in mammalian cells, *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, **24**, 645–654.
122. Hu, J.H., Miller, S.M., Geurts, M.H., Tang, W., Chen, L., Sun, N., Zeina, C.M., Gao, X., Rees, H.A., Lin, Z., Liu, D.R. (2018) Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity, *Nature*, **556**, 57–63.

123. Kim, T.H., Dekker, J. (2018) ChIP-seq, *Cold Spring Harbor Protocols*, **2018**, 10.1101/pdb.prot082644.
124. Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., Lander, E.S. (2014) Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system, *Science (New York, N.Y.)*, **343**, 80–84.
125. Engler, C., Marillonnet, S. (2014) Golden Gate cloning, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **1116**, 119–131.
126. Chen, B., Huang, B. (2014) Imaging genomic elements in living cells using CRISPR/Cas9, *Methods in Enzymology*, **546**, 337–354.
127. 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**, 528–530.
128. Ma, D., Peng, S., Huang, W., Cai, Z., Xie, Z. (2018) Rational design of mini-Cas9 for transcriptional activation, *ACS Synthetic Biology*, **7**, 978–985.
129. Chen, B., Hu, J., Almeida, R., Liu, H., Balakrishnan, S., Covill-Cooke, C., Lim, W.A., Huang, B. (2016) Expanding the CRISPR imaging toolset with *Staphylococcus aureus* Cas9 for simultaneous imaging of multiple genomic loci, *Nucleic Acids Research*, **44**, e75.
130. Xu W. (2019) Microinjection and micromanipulation: a historical perspective, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **1874**, 1–16.
131. Hung, K.L., Meitlis, I., Hale, M., Chen, C.Y., Singh, S., Jackson, S.W., Miao, C.H., Khan, I.F., Rawlings, D.J., James, R.G. (2018) Engineering protein-secreting plasma cells by homology-directed repair in primary human B cells, *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, **26**, 456–467.
132. Yen, J., Fiorino, M., Liu, Y., Paula, S., Clarkson, S., Quinn, L., Tschantz, W.R., Klock, H., Guo, N., Russ, C., Yu, V., Mickanin, C., Stevenson, S.C., Lee, C., Yang, Y. (2018) TRIAMF: a new method for delivery of Cas9 ribonucleoprotein complex to human hematopoietic stem cells, *Scientific Reports*, **8**, 16304.
133. D'Astolfo, D.S., Pagliero, R.J., Pras, A., Karthaus, W.R., Clevers, H., Prasad, V., Lebbink, R.J., Rehmann, H., Geijsen, N. (2015) Efficient intracellular delivery of native proteins, *Cell*, **161**, 674–690.
134. Supotnitskiy, M.V. (2011) Gene therapeutic vector systems based on viruses, *Biopreparats (Biopharmaceuticals)*, **3**, 15–26.
135. Spirin, P.V., Vilgelm, A.E., Prassolov, V.S. (2008) Lentiviral vectors, *Molecular Biology*, **42**, 814–825.
136. Sakuma, T., Barry, M.A., Ikeda, Y. (2012) Lentiviral vectors: basic to translational, *The Biochemical Journal*, **443**, 603–618.
137. Merienne, N., Vachey, G., de Longprez, L., Meunier, C., Zimmer, V., Perriard, G., Canales, M., Mathias, A., Herrgott, L., Beltraminelli, T., Maulet, A., Dequesne, T., Pythoud, C., Rey, M., Pellerin, L., Brouillet, E., Perrier, A.L., du Pasquier, R., Déglon, N. (2017) The self-inactivating KamiCas9 system for the editing of CNS disease genes, *Cell Reports*, **20**, 2980–2991.
138. Zetsche, B., Volz, S.E., Zhang, F. (2015) A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation, *Nature Biotechnology*, **33**, 139–142.
139. Somia, N., Verma, I.M. (2000) Gene therapy: trials and tribulations, *Nature Reviews. Genetics*, **1**, 91–99.
140. Wang, Q., Chen, S., Xiao, Q., Liu, Z., Liu, S., Hou, P., Zhou, L., Hou, W., Ho, W., Li, C., Wu, L., Guo, D. (2017) Genome modification of CXCR4 by *Staphylococcus aureus*

- Cas9 renders cells resistance to HIV-1 infection, *Retrovirology*, **14**, 51.
141. Li, L., He, Z.Y., Wei, X.W., Gao, G.P., Wei, Y.Q. (2015) Challenges in CRISPR/CAS9 delivery: potential roles of nonviral vectors, *Human gene Therapy*, **26**, 452–462.
142. Li, L., Hu, S., Chen, X. (2018) Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: Challenges and opportunities, *Biomaterials*, **171**, 207–218.
143. Wang, M., Zuris, J.A., Meng, F., Rees, H., Sun, S., Deng, P., Han, Y., Gao, X., Pouli, D., Wu, Q., Georgakoudi, I., Liu, D.R., Xu, Q. (2016) Efficient delivery of genome-editing proteins using bio-reducible lipid nanoparticles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, 2868–2873.
144. Kretzmann, J.A., Ho, D., Evans, C.W., Plani-Lam, J., Garcia-Bloj, B., Mohamed, A.E., O'Mara, M.L., Ford, E., Tan, D., Lister, R., Blancafort, P., Norret, M., Iyer, K.S. (2017) Synthetically controlling dendrimer flexibility improves delivery of large plasmid DNA, *Chemical Science*, **8**, 2923–2930.
145. Zhu, H., Zhang, L., Tong, S., Lee, C.M., Deshmukh, H., Bao, G. (2019) Spatial control of in vivo CRISPR-Cas9 genome editing via nanomagnets, *Nature Biomedical Engineering*, **3**, 126–136.
146. Kumar, S., Kaur, S., Seem, K., Kumar, S., Mohapatra, T. (2021) Understanding 3D genome organization and its effect on transcriptional gene regulation under environmental stress in plant: a chromatin perspective, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, 774719.
147. Li, G. (2020) The 3D organization of genome in the nucleus: from the nucleosome to the 4D nucleome, *Science China. Life Sciences*, **63**, 791–794.
148. Park, T.L., Lee, Y., Cho, W.K. (2021) Visualization of chromatin higher-order structures and dynamics in live cells, *BMB Reports*, **54**, 489–496.
149. Hnisz, D., Weintraub, A.S., Day, D.S., Valton, A.L., Bak, R.O., Li, C.H., Goldmann, J., Lajoie, B.R., Fan, Z.P., Sigova, A.A., Reddy, J., Borges-Rivera, D., Lee, T.I., Jaenisch, R., Porteus, M.H., Dekker, J., Young, R.A. (2016) Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods, *Science (New York, N.Y.)*, **351**, 1454–1458.
150. 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., Spielmann, M., ... Mundlos, S. (2015) Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions, *Cell*, **161**, 1012–1025.
151. Weissleder, R., Pittet, M.J. (2008) Imaging in the era of molecular oncology, *Nature*, **452**, 580–589.
152. Parteka-Tojek, Z., Zhu, J.J., Lee, B., Jodkowska, K., Wang, P., Aaron, J., Chew, T.L., Banecki, K., Plewczynski, D., Ruan, Y. (2022) Super-resolution visualization of chromatin loop folding in human lymphoblastoid cells using interferometric photoactivated localization microscopy, *Scientific Reports*, **12**, 8582.
153. Boettiger, A., Murphy, S. (2020) Advances in chromatin imaging at kilobase-scale resolution, *Trends in Genetics*, **36**, 273–287.
154. Esa, A., Edelmann, P., Kreth, G., Trakhtenbrot, L., Amariglio, N., Rechavi, G., Hausmann, M., Cremer, C. (2000) Three-dimensional spectral precision distance

- microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome, *Journal of Microscopy*, **199**, 96–105.
155. Weiland, Y., Lemmer, P., Cremer, C. (2011) Combining FISH with localisation microscopy: Super-resolution imaging of nuclear genome nanostructures, *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary aspects of Chromosome biology*, **19**, 5–23.
156. Mateo, L.J., Murphy, S.E., Hafner, A., Cinquini, I.S., Walker, C.A., Boettiger, A.N. (2019) Visualizing DNA folding and RNA in embryos at single-cell resolution, *Nature*, **568**, 49–54.
157. Maxouri, S., Taraviras, S., Lygerou, Z. (2018) Visualizing the dynamics of histone variants in the S-phase nucleus, *Genome biology*, **19**, 182.
158. Clément, C., Orsi, G.A., Gatto, A., Boyarchuk, E., Forest, A., Hajj, B., Miné-Hattab, J., Garnier, M., Gurard-Levin, Z.A., Quivy, J.P., Almouzni, G. (2018) High-resolution visualization of H3 variants during replication reveals their controlled recycling, *Nature Communications*, **9**, 3181.
159. Stepanov, A.I., Besedovskaia, Z.V., Moshareva, M.A., Lukyanov, K.A., Putlyaeva, L.V. (2022) Studying chromatin epigenetics with fluorescence microscopy, *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 8988.
160. Becker W. (2015) *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*. Springer Berlin, Heidelberg. 401 p.
161. Datta, R., Heaster, T.M., Sharick, J.T., Gillette, A.A., Skala, M.C. (2020) Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications, *Journal of Biomedical Optics*, **25**, 1–43.
162. Pliss, A., Prasad, P.N. (2020) High resolution mapping of subcellular refractive index by Fluorescence Lifetime Imaging: a next frontier in quantitative cell science? *Methods and Applications in Fluorescence*, **8**, 032001.
163. Levchenko, S.M., Pliss, A., Peng, X., Prasad, P.N., Qu, J. (2021) Fluorescence lifetime imaging for studying DNA compaction and gene activities, *Light, Science and Applications*, **10**, 224.
164. Sherrard, A., Bishop, P., Panagi, M., Villagomez, M.B., Alibhai, D., Kaidi, A. (2018) Streamlined histone-based fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) for studying chromatin organization, *Biology Open*, **7**, bio031476.
165. Chanou, A., Hamperl, S. (2021) Single-molecule techniques to study chromatin, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, 699771.
166. Lou, J., Scipioni, L., Wright, B.K., Bartolec, T.K., Zhang, J., Masamsetti, V.P., Gaus, K., Gratton, E., Cesare, A.J., Hinde, E. (2019) Phasor histone FLIM-FRET microscopy quantifies spatiotemporal rearrangement of chromatin architecture during the DNA damage response, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**, 7323–7332.
167. Labas, Y.A., Gurskaya, N.G., Yanushkevich, Y.G., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A., Matz, M.V. (2002) Diversity and evolution of the green fluorescent protein family, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 4256–4261.
168. Chudakov, D.M., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A. (2005) Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo*

- imaging, *Trends in biotechnology*, **23**, 605–613.
169. Hochreiter, B., Garcia, A.P., Schmid, J.A. (2015) Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences, *Sensors (Basel)*, **15**, 26281–26314.
170. Rusanov, A.L., Ivashina, T.V., Vinokurov, L.M., Fiks, I.I., Orlova, A.G., Turchin, I.V., Meerovich, I.G., Zherdeva, V.V., Savitsky, A.P. (2010) Lifetime imaging of FRET between red fluorescent proteins, *Journal of Biophotonics*, **3**, 774–783.
171. Savitsky, A.P., Rusanov, A.L., Zherdeva, V.V., Gorodnicheva, T.V., Khrenova, M.G., Nemukhin, A.V. (2012) FLIM-FRET imaging of caspase-3 activity in live cells using pair of red fluorescent proteins, *Theranostics*, **2**, 215–226.
172. Zherdeva, V., Kazachkina, N.I., Shcheslavskiy, V., Savitsky, A.P. (2018) Long-term fluorescence lifetime imaging of a genetically encoded sensor for caspase-3 activity in mouse tumor xenografts, *Journal of Biomedical Optics*, **23**, 1–11.
173. Giacomelli, M.G., Sheikine, Y., Vardeh, H., Connolly, J.L., Fujimoto, J.G. (2015) Rapid imaging of surgical breast excisions using direct temporal sampling two photon fluorescent lifetime imaging, *Biomedical Optics Express*, **6**, 4317–4325.
174. Ryu, J., Kang, U., Kim, J., Kim, H., Kang, J.H., Kim, H., Sohn, D.K., Jeong, J.H., Yoo, H., Gweon, B. (2018) Real-time visualization of two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy using a wavelength-tunable femtosecond pulsed laser, *Biomedical Optics Express*, **9**, 3449–3463.
175. Bower, A.J., Li, J., Chaney, E.J., Marjanovic, M., Spillman, D.R., Jr, Boppart, S.A. (2018) High-speed imaging of transient metabolic dynamics using two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy, *Optica*, **5**, 1290–1296.
176. Nothdurft, R., Sarder, P., Bloch, S., Culver, J., Achilefu, S. (2012) Fluorescence lifetime imaging microscopy using near-infrared contrast agents, *Journal of Microscopy*, **247**, 202–207.
177. Qiao, H., Wu, J., Zhang, X., Luo, J., Wang, H., Ming, D. (2021) The advance of CRISPR-Cas9-based and NIR/CRISPR-Cas9-based imaging system, *Frontiers in Chemistry*, **9**, 786354.
178. Rätty, J.K., Liimatainen, T., Unelma Kaikkonen, M., Gröhn, O., Airene, K.J., Ylä-Herttuala, S. (2007) Non-invasive imaging in gene therapy, *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, **15**, 1579–1586.
179. Niu, G., Chen, X. (2009) The role of molecular imaging in drug delivery, *Drug Delivery (London, England. 2007)*, **3**, 109–113.
180. Auletta, L., Gramanzini, M., Gargiulo, S., Albanese, S., Salvatore, M., Greco, A. (2017) Advances in multimodal molecular imaging, *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **61**, 19–32.
181. Kircher, M.F., Mahmood, U., King, R.S., Weissleder, R., Josephson, L. (2003) A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation, *Cancer Research*, **63**, 8122–8125.
182. Pan, D., Caruthers, S.D., Chen, J., Winter, P.M., SenPan, A., Schmieler, A.H., Wickline, S.A., Lanza, G.M. (2010) Nanomedicine strategies for molecular targets with MRI and optical imaging, *Future medicinal chemistry*, **2**, 471–490.
183. Polimeni, J.R., Wald, L.L. (2018) Magnetic Resonance Imaging technology-bridging the gap between noninvasive human imaging and

- optical microscopy, *Current opinion in neurobiology*, **50**, 250–260.
184. Yan, R., Hu, Y., Liu, F., Wei, S., Fang, D., Shuhendler, A.J., Liu, H., Chen, H.Y., Ye, D. (2019) Activatable NIR fluorescence/MRI bimodal probes for *in vivo* imaging by enzyme-mediated fluorogenic reaction and self-assembly, *Journal of the American Chemical Society*, **141**, 10331–10341.
 185. Carneiro, I., Carvalho, S., Henrique, R., Oliveira, L., Tuchin, V. (2019) Moving tissue spectral window to the deep-ultraviolet via optical clearing, *Journal of Biophotonics*, **12**, e201900181.
 186. Bashkatov, A.N., Berezin, K.V., Dvoretzkiy, K.N., Chernavina, M.L., Genina, E.A., Genin, V.D., Kochubey, V.I., Lazareva, E.N., Pravdin, A.B., Shvachkina, M.E., Timoshina, P.A., Tuchina, D.K., Yakovlev, D.D., Yakovlev, D.A., Yanina, I.Y., Zhernovaya, O.S., Tuchin, V.V. (2018) Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing, *Journal of Biomedical Optics*, **23**, 1–31.
 187. Genina, E.A., Bashkatov, A.N., Tuchin, V.V. (2010) Tissue optical immersion clearing, *Expert Review of Medical Devices*, **7**, 825–842.
 188. Sdobnov, A.Y., Lademann, J., Darvin, M.E., Tuchin, V.V. (2019) Methods for optical skin clearing in molecular optical imaging in dermatology, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, S144–S158.
 189. Sdobnov, A.Y., Darvin, M.E., Schleusener, J., Lademann, J., Tuchin, V.V. (2019) Hydrogen bound water profiles in the skin influenced by optical clearing molecular agents-Quantitative analysis using confocal Raman microscopy, *Journal of Biophotonics*, **12**, e201800283.
 190. Tuchina, D.K., Meerovich, I.G., Sindeeva, O.A., Zherdeva, V.V., Savitsky, A.P., Bogdanov, A.A., Jr, Tuchin, V.V. (2020) Magnetic resonance contrast agents in optical clearing: Prospects for multimodal tissue imaging, *Journal of Biophotonics*, **13**, e201960249.
 191. Tuchina, D.K., Meerovich, I.G., Sindeeva, O.A., Zherdeva, V.V., Kazachkina, N.I., Solov'ev, I., Savitsky, A.P., Bogdanov, A.A., Tuchin, V.V. (2021) Prospects for multimodal visualisation of biological tissues using fluorescence imaging, *Quantum Electronics*, **51**, 104–117.
 192. Kazachkina, N.I., Zherdeva, V.V., Meerovich, I.G., Saydasheva, A.N., Solovyev, I.D., Tuchina, D.K., Savitsky, A.P., Tuchin, V.V., Bogdanov, A.A., Jr (2022) MR and fluorescence imaging of gadobutrol-induced optical clearing of red fluorescent protein signal in an *in vivo* cancer model, *NMR in Biomedicine*, **35**, e4708.
 193. Eliat, F., Sohn, R., Renner, H., Kagermeier, T., Volkery, S., Brinkmann, H., Kirschnick, N., Kiefer, F., Grabos, M., Becker, K., Bedzhov, I., Schöler, H.R., Bruder, J.M. (2022) Tissue clearing may alter emission and absorption properties of common fluorophores, *Scientific Reports*, **12**, 5551.
 194. Kazachkina, N.I., Zherdeva, V.V., Saydasheva, A.N., Meerovich, I.G., Tuchin, V.V., Savitsky, A.P., Bogdanov, A.A. Jr. (2021) Topical gadobutrol application causes fluorescence intensity change in RFP-expressing tumor-bearing mice, *Journal of Biomedical Photonics and Engineering*, **020301**, 1–7.
 195. Ylä-Herttuala S. (2017) The pharmacology of gene therapy, *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, **25**, 1731–1732.
 196. Collins, D.E., Reuter, J.D., Rush, H.G., Villano, J.S. (2017) Viral vector biosafety in laboratory ani-

- mal research, *Comparative Medicine*, **67**, 215–221.
197. Reuter, J.D., Fang, X., Ly, C.S., Suter, K.K., Gibbs, D. (2012) Assessment of hazard risk associated with the intravenous use of viral vectors in rodents, *Comparative Medicine*, **62**, 361–370.
198. Gunay, M.S., Ozer, A.Y., Chalon, S. (2016) Drug delivery systems for imaging and therapy of Parkinson's disease, *Current Neuropharmacology*, **14**, 376–391.
199. Gillmore, J.D., Gane, E., Taubel, J., Kao, J., Fontana, M., Maitland, M.L., Seitzer, J., O'Connell, D., Walsh, K.R., Wood, K., Phillips, J., Xu, Y., Amaral, A., Boyd, A.P., Cehelsky, J.E., McKee, M.D., Schiermeier, A., Harari, O., Murphy, A., Kyratsous, C.A., ... Lebowohl, D. (2021) CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis, *The New England Journal of Medicine*, **385**, 493–502.
200. Mussolino, C., Cathomen, T. (2013) RNA guides genome engineering, *Nature Biotechnology*, **31**, 208–209.
201. Wang, H., Nakamura, M., Abbott, T.R., Zhao, D., Luo, K., Yu, C., Nguyen, C.M., Lo, A., Daley, T.P., La Russa, M., Liu, Y., Qi, L.S. (2019) CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription, *Science (New York, N.Y.)*, **365**, 1301–1305.
202. 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**, 163–172.
203. Rex, T.S., Peet, J.A., Surace, E.M., Calvert, P.D., Nikonov, S.S., Lyubarsky, A.L., Bendo, E., Hughes, T., Pugh, E.N., Jr, Bennett, J. (2005) The distribution, concentration, and toxicity of enhanced green fluorescent protein in retinal cells after genomic or somatic (virus-mediated) gene transfer, *Molecular Vision*, **11**, 1236–1245.
204. Fink, D., Wohrer, S., Pfeffer, M., Tombe, T., Ong, C.J., Sorensen, P.H. (2010) Ubiquitous expression of the monomeric red fluorescent protein mCherry in transgenic mice, *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, **48**, 723–729.
205. Tamura, K., Yamada, K., Shimada, T., Hara-Nishimura, I. (2004) Endoplasmic reticulum-resident proteins are constitutively transported to vacuoles for degradation, *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, **39**, 393–402.
206. Liu, M., Hodish, I., Rhodes, C.J., Arvan, P. (2007) Proinsulin maturation, misfolding, and proteotoxicity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 15841–15846.
207. Tortorella, L.L., Pipalia, N.H., Mukherjee, S., Pastan, I., Fitzgerald, D., Maxfield, F.R. (2012) Efficiency of immunotoxin cytotoxicity is modulated by the intracellular itinerary, *PloS One*, **7**, e47320.
208. Lam, A.J., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J.D., Cranfill, P.J., Baird, M.A., McKeown, M.R., Wiedemann, J., Davidson, M.W., Schnitzer, M.J., Tsien, R.Y., Lin, M.Z. (2012) Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins, *Nature Methods*, **9**, 1005–1012.
209. Bajar, B.T., Wang, E.S., Lam, A.J., Kim, B.B., Jacobs, C.L., Howe, E.S., Davidson, M.W., Lin, M.Z., Chu, J. (2016) Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting, *Scientific Reports*, **6**, 20889.
210. Grimm, J.B., English, B.P., Chen, J., Slaughter, J.P., Zhang, Z., Re-

- vyakin, A., Patel, R., Macklin, J.J., Normanno, D., Singer, R.H., Lionnet, T., Lavis, L.D. (2015) A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy, *Nature Methods*, **12**, 244–250.
211. Maloshenok, L., Abushinova, G., Bogdanov, A., and Zherdeva, V. (2023) Tet-regulated expression and in vivo visualization of genetically encoded chimeric dCas9-FP, *Materials*, **16**, 940.
212. Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., Liu, D.R. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, *Nature*, **533**, 420–424.
213. Gao, X.D., Rodríguez, T.C., Sontheimer, E.J. (2019) Adapting dCas9-APEX2 for subnuclear proteomic profiling, *Methods in Enzymology*, **616**, 365–383.
214. Savić, N., Ringnalda, F.C., Berk, C., Bargsten, K., Hall, J., Jinek, M., Schwank, G. (2019) In vitro generation of CRISPR-Cas9 complexes with covalently bound repair templates for genome editing in mammalian cells, *Bio-protocol*, **9**, e3136.
215. Mao, S., Ying, Y., Wu, X., Krueger, C.J., Chen, A.K. (2019) CRISPR/dual-FRET molecular beacon for sensitive live-cell imaging of non-repetitive genomic loci, *Nucleic Acids Research*, **47**, e131.
216. Wu, X., Mao, S., Yang, Y., Rushdi, M.N., Krueger, C.J., Chen, A.K. (2018) A CRISPR/molecular beacon hybrid system for live-cell genomic imaging, *Nucleic Acids Research*, **46**, e80.
217. Baugh, C., Grate, D., Wilson, C. (2000) 2.8 Å crystal structure of the malachite green aptamer, *Journal of Molecular Biology*, **301**, 117–128.
218. Stojanovic, M.N., Kolpashchikov, D.M. (2004) Modular aptameric sensors, *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 9266–9270.
219. Filonov, G.S., Moon, J.D., Svensen, N., Jaffrey, S.R. (2014) Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution, *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 16299–16308.
220. Panchapakesan, S.S., Jeng, S.C., Unrau, P.J. (2015) RNA complex purification using high-affinity fluorescent RNA aptamer tags, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1341**, 149–155.
221. Trachman, R.J., 3rd, Cojocaru, R., Wu, D., Piszczek, G., Ryckelynck, M., Unrau, P.J., Ferré-D'Amaré, A.R. (2020) Structure-guided engineering of the homodimeric Mango-IV fluorescence turn-on aptamer yields an RNA FRET pair, *Structure (London, England: 1993)*, **28**, 776–785.e3.
222. Holzhauser, C., Rubner, M.M., Wagenknecht, H.A. (2013) Energy-transfer-based wavelength-shifting DNA probes with «clickable» cyanine dyes. *Photochemical and Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, **12**, 722–724.
223. Panchapakesan, S., Ferguson, M.L., Hayden, E.J., Chen, X., Hoskins, A.A., Unrau, P.J. (2017) Ribonucleoprotein purification and characterization using RNA Mango, *RNA (New York, N.Y.)*, **23**, 1592–1599.
224. Abdolazadeh, A., Dolgosheina, E.V., Unrau, P.J. (2019) RNA detection with high specificity and sensitivity using nested fluorogenic Mango NASBA, *RNA (New York, N.Y.)*, **25**, 1806–1813.