

Нокдаун *NUDT16L1* (TIRR) повышает эффективность геномного редактирования

Анучина А.А., Смирнихина С.А., Зайнитдинова М.И., Демченко А.Г., Мишина О.С., Лавров А.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1

Введение. Эффективная точная коррекция мутаций очень важна для внедрения CRISPR-Cas в качестве инструмента для потенциальной генной терапии. Механизм направленной гомологичной репарации (НГР), активируемый после внесения нуклеазой двунитевого разрыва, позволяет корректировать все существующие типы мутаций. Однако НГР не является доминирующим механизмом в клетке, что ограничивает ее эффективность. В нашем исследовании впервые описано, как фактор репарации *NUDT16L1* может контролировать эффективность НГР при редактировании с помощью CRISPR-Cas.

Цель: исследовать влияние нокдауна и гиперэкспрессии *NUDT16L1* на эффективность НГР.

Методы. Исследование проводили на клеточной культуре HEK293T. Систему CRISPR-Cas в плазмиде, а также вектор для гиперэкспрессии *NUDT16L1* доставляли путём липофекции. Для нокдауна гена *NUDT16L1* использовали малые interfering RNAs.

Результаты. Нокдаун *NUDT16L1* повышает уровень НГР в плазмидном и геномном локусах, что проявляется повышением доли GFP-позитивных клеток в 1,8–3,6 раз.

Заключение. Нокдаун гена *NUDT16L1* может быть использован для повышения эффективности исправления патогенных вариантов ДНК методом геномного редактирования.

Ключевые слова: CRISPR-Cas, НГР, TIRR, *NUDT16L1*, геномное редактирование, коррекция мутации.

Для цитирования: Анучина А.А., Смирнихина С.А., Зайнитдинова М.И., Демченко А.Г., Мишина О.С., Лавров А.В. Нокдаун *NUDT16L1* (TIRR) повышает эффективность геномного редактирования. *Медицинская генетика* 2021; 20(8): 3-10.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.08.3-10

Автор для корреспонденции: Анучина А.А., e-mail: arinate@mail.ru

Финансирование. Раздел «Гиперэкспрессия *NUDT16L1* негативно влияет на НГР в геномном локусе eGFP» был поддержан грантом Российского фонда фундаментальных исследований (19-34-90130), раздел «Нокдаун *NUDT16L1* повышает эффективность точной коррекции eGFP как в плазмидном, так и в геномном локусе» был выполнен в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 30.07.2021.

NUDT16L1 (TIRR) knockdown increases genome editing efficacy

Anuchina A.A., Smirnikhina S.A., Zaynitdinova M.I., Demchenko A.G., Mishina O.S., Lavrov A.V.

Research Centre for Medical Genetics
1 Moskvorechie st., Moscow, 115522, Russian Federation

Introduction. Effective precise knock-in is crucial for implementing CRISPR-Cas9 system as an efficient instrument for potential gene therapy. Homology directed repair (HDR) pathway allows correction of all types of existing mutations. However, HDR is not a major repair pathway of the cell that limits its efficiency. In our study, we present for the first time how repair factors *NUDT16L1* controls HDR efficiency.

Aim: to study an influence of *NUDT16L1* knockdown and overexpression on the HDR efficacy.

Methods. HEK293T culture was used to perform the research. Plasmid CRISPR-Cas system along with *NUDT16L1* overexpression vector were delivered with lipofection. For *NUDT16L1* knockdown small interfering RNAs were used.

Results. We discovered that knockdown of *NUDT16L1* enhances HDR both in the plasmid and genomic loci increasing eGFP signal from 1.8 to 3.6 times in HEK293T cells.

Conclusion. *NUDT16L1* knockdown could be used for enhancing of the pathogenic mutations correction through genome editing.

Keywords: CRISPR-Cas, HDR, TIRR, *NUDT16L1*, genome editing, mutation correction.

For citation: Anuchina A.A., Smirnikhina S.A., Zaynitdinova M.I., Demchenko A.G., Mishina O.S., Lavrov A.V. *NUDT16L1* (TIRR) knockdown increases genome editing efficacy. *Meditsinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(8): 3-10. (In Russ.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.08.3-10

Corresponding author: A.A. Anuchina; **e-mail:** arinate@mail.ru

Funding. The part of the study "Overexpression of *NUDT16L1* negatively affects HDR in the genomic *eGFP* locus" was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (19-34-90130). The part of the study "*NUDT16L1* knockdown increases the efficiency of accurate *eGFP* correction in both the plasmid and genomic locus" was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Research Centre for Medical Genetics.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 30.07.2021.

Введение

Редактирование генов с использованием системы CRISPR-Cas представляет собой перспективный способ терапии наследственных заболеваний. Одним из главных недостатков системы является низкая эффективность, что ограничивает использование технологии для терапии заболеваний, при которых для достижения терапевтического эффекта должны быть отредактированы гены в большой доле клеток [1].

Двунитевой разрыв (ДНР), вносимый Cas-нуклеазой, может быть репарирован несколькими способами, среди них есть два основных. Один из них, не-гомологичное соединение концов (НГСК), механизм, ведущий к возникновению мутаций, второй — направленная гомологичная репарация (НГР), которая осуществляет точную коррекцию мутации.

Эффективность точного редактирования мутаций, обусловленная уровнем НГР, является достаточно низкой [2–4]. Например, при редактировании генов культуры НЕК293Т максимальная доля GFP-позитивных клеток не превышала 2,39% [5], а при редактировании генов нескольких опухолевых клеточных линий доля GFP-позитивных клеток составила 1,49–2,59% [6]. В эмбриональных стволовых клетках человека уровень коррекции составил 2–3% [8]. В настоящее время используют различные методы повышения эффективности НГР [6, 9–12]. Описано большое количество факторов репарации и взаимодействий между ними, которые могут влиять на баланс НГР-НГСК и сдвигать его в ту или иную сторону. Эти данные используются при попытках повысить уровень НГР. Тем не менее, существует ряд новейших участников путей репарации, которые не использовали в экспериментах по редактированию генома. Одним из таких мало изученных факторов является недавно описанный как ключевой участник выбора путей репарации белок TIRR, кодируемый геном *NUDT16L1*.

TIRR (SDOS/*NUDT16L1*) — белок из семейства гидролаз, участвующий в распастивании клеток, организации цитоскелета и репарации ДНР [13–16]. TIRR связывается с доменом Tudor белка 53BP1 и предотвращает его привлечение к локусам ДНР [17]. Исследования выявили двунаправленное действие TIRR: показано,

что как гиперэкспрессия, так и нокдаун гена ингибируют механизм НГСК и восстанавливают НГР в BRCA1-дефицитных клетках [18,19]. Вследствие комплексной и не до конца изученной роли белка TIRR в процессах репарации в нашей работе тестировали влияние обоих подходов — гиперэкспрессии и нокдауна — на эффективность НГР гена *eGFP*.

Материалы и методы

Выбор миРНК для нокдауна

Две малые интерферирующие РНК (миРНК) были подобраны для изоформы NM_032349 гена *NUDT16L1*, состоящего из трех экзонов, кодирующих белок, состоящий из 211 аминокислотных остатков. Обе миРНК были подобраны на 3'-нетранслируемый регион гена. Последовательность миРНК_TIRR_1 содержала два дезокситимидиновых остатка на 3'-концах, миРНК_TIRR_2 имела два урациловых остатка вместо тимидиновых.

Плазмиды и олигонуклеотиды

Плазмида CBA-spCas9(1.1)-sgGFP#2 была получена путем клонирования последовательности направляющей РНК sgGFP#2 в eSpCas9(1.1) (получена от Фенга Жанга (<http://n2t.net/addgene:71814>; RRID:Addgene_71814)). Плазмида reGFP-C1(Clontech, США) была использована для создания с помощью сайт-направленного мутагенеза плазмиды reGFP-C1mut с мутацией c.337delG в кодирующей последовательности гена *eGFP*, в векторе reGFP-C1 содержится последовательность *eGFP* дикого типа. Кодирующая последовательность гена *NUDT16L1* (NM_032349) была клонирована в вектор pcDNA3.1+ для получения вектора pcDNA3.1+*NUDT16L1*. Плазмиды pR8.91, pMD.G были получены от Дидье Троно [20] (<http://tronolab.epfl.ch>). Плазмида pLVT_turboRFP635-eGFPmut была получена путем клонирования в вектор plvt (Addgene, США) кодирующей последовательности гена дальнекрасного флуоресцентного белка *turboRFP-635* и кодирующей последовательности *eGFPmut*, соединенных линкером T2A.

миРНК к гену *NUDT16L1* были подобраны с помощью программы siRNAfit (внутреннее программное обе-

спечение). Одноцепочечный олигонуклеотид (ssODN, 120 п.н.) и sgRNA (20 п.н.) были подобраны с помощью программы Benchling [21] (<https://www.benchling.com/>). миРНК и ssODN были синтезированы компанией ДНК-Синтез (Москва, Россия). Последовательности ssODN, миРНК, sgRNA и использованных в работе праймеров приведены в **таблице**.

Клеточные культуры и трансфекция

Исследования проводили на клеточных культурах HEK293T (редактирование плазмидного локуса *eGFPmut*) и HEK293T-*eGFPmut* (редактирование геномного локуса *eGFPmut*).

Для создания клеточной культуры HEK293T-*eGFPmut* с геном *eGFPmut* в геноме лентивирусные частицы с геном *eGFPmut* собирали в клетках HEK293T путем трансфекции упаковочных плазмид pR8.91 и pMD.G, а также плазмиды со вставкой pLVT_

turboRFP635-eGFPmut. Среду с вирусными частицами использовали для заражения культуры HEK293T. Клетки с интегрированной в геном конструкцией отбирали с помощью клеточной сортировки по красному свечению белка turboRFP635.

Клетки HEK293T культивировали в среде с 10% FBS (fetal bovine serum), 1 mM L-глутамин, пенициллином-стрептомицином и 1 g/L глюкозы. За 24 часа до трансфекции клетки пересаживали в 12-луночный планшет. Для трансфекции плазмид использовали Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) в количестве 4 мкл на лунку 12-луночного планшета. Для трансфекции миРНК использовали реагент TurboFect™ Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) в количестве 4 мкл на лунку 12-луночного планшета. миРНК и pcDNA3.1+NUDT16L1 трансфицировали за 24 часа до трансфекции системы CRISPR-Cas. Далее в клетки трансфицировали

Таблица

Олигонуклеотиды, используемые в исследовании

Типы олигонуклеотидов	Описание	Последовательность
Праймеры	Для секвенирования локуса <i>eGFP</i>	F 5'-ACGTAAACGGCCACAAGTTCA-3' R 5'-CTGCCGTCCTCGATGTTGT-3'
	Для гена <i>NUDT16L1</i>	F 5' CCGGAGCTGAAGCAGATCA 3' R 5' GAAACGCATCTGCATCAGCA 3'
	Для референсного гена <i>TFRC</i>	F 5'-TCCTTGCAATTCTGGAATCCC-3' R 5'-ATCACGAACTGACCAGCG-3'
	Для референсного гена <i>TBP</i>	F 5'-CGGAGAGTTCTGGGATTGTAC-3' R 5'-GTGGTTCGTGGCTCTCTTATC-3'
	Для референсного гена <i>B2M</i>	F 5'-CTGCCGTGTGAACCATGTGA-3' R 5'-CAATCCAAATGCGGCATCTTC-3'
	Для сборки вектора для гиперэкспрессии <i>NUDT16L1</i> ; покрывают зону <i>cds</i> <i>NUDT16L1</i> ; прямой праймер содержит сайт рестрикции для эндонуклеазы EcoRI, обратный праймер содержит сайт рестрикции для XbaI	F 5' AAAAGAATTCCAAGATGTCGACGGCGGC 3' R 5' AAAATCTAGATCAAGAGGAGGCCGGGAGCA 3'
sgRNA (sgGFP#2)	Единая направляющая РНК к последовательности <i>eGFP</i> с мутацией с.337delG	5'-TGTCGCCCTCGAACTTCACT-3' 3'-ACAGCGGGAGCTTGAAGTGA-5'
ssODN	Одноцепочечный олигонуклеотид для направленной гомологичной репарации	5'-TTCTTTAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTCGGG-3'
миРНК	миРНК_TIRR_1	5'GGAGAAGACAUAUAAGUCGdTdT3' 3'dTdTCCUCUUCUGUUAUUUCAGC 5'
	миРНК_TIRR_2	5-GCUGUCGAAGGAGAAGACAUU3' 3'UUCGACAGCUUCCUCUUCUGU5'
	миРНК_контроль	5'FAM -AGGUCGAACUACGGGUCAAdTdC-3' 3'-dGdAUCCAGCUUGAUGCCCAGUU-FAM5'

плазмиду CBA-spCas9(1.1)-sgGFP#2, матрицу для репарации в виде ssODN. В клетки HEK293T дополнительно вводили reGFP-C1mut для редактирования локуса *eGFPmut* в плазмиде. После внесения компонентов системы клетки инкубировали 72 часа при 5% CO₂. Затем проводили измерение доли GFP-позитивных клеток, выделение нуклеиновых кислот, анализ экспрессии, секвенирование редактируемого локуса и анализ доли отредактированных аллелей с помощью TIDER.

Иммуноцитохимическое окрашивание

Клетки анализировали спустя 24 часа после трансфекции миРНК или через 48 часов после трансфекции плазмиды pcDNA3.1+NUDT16L1. Клетки промывали раствором Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), затем снимали с помощью трипсин-ЭДТА и переносили в микроцентрифужную пробирку объемом 1,7 мл. Клетки фиксировали 4% раствором формальдегида. Пермеабилзация проводилась с помощью 0,25% Triton X100 в PBS, далее клетки блокировали с помощью 1% BSA в PBST. Затем клетки инкубировали 30 минут при комнатной температуре с антителом (Anti-NUDT16L1 antibody produced in rabbit [HPA044186], Sigma-Aldrich, USA; 1:200). Клетки промывали DPBS, затем инкубировали 30 минут при комнатной температуре с вторичным антителом (Alexa Fluor594 goat anti-rabbit IgG (H+L), Invitrogen, USA; 1:150), после промывки раствором DBPS клетки анализировали методом проточной цитометрии.

Выделение нуклеиновых кислот

Геномная ДНК была выделена с помощью набора Quick-gDNA™ MiniPrep kit (Zymo Research, США). Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kit (Zymo Research, США). Плазмиды верифицировали методом секвенирования по Сэнгеру. Тотальная РНК была выделена с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия), в соответствии с протоколом производителя. Концентрации ДНК и РНК измеряли на флуорометре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция

Для проведения обратной транскрипции было использовано 2 мкг полученной РНК из каждого образца. кДНК получали с помощью набора MMLV RT kit (Евроген, Россия). Затем образцы кДНК использовали для количественной ПЦР в реальном времени. Реагенты для ПЦР (Евроген, Россия) и интеркалирующий

краситель SYBR Green I (ДНК-Синтез, Москва, Россия) были использованы для приготовления реакционной смеси. Последовательности праймеров приведены в таблице. Для анализа экспрессии гена *NUDT16L1* нормализацию проводили на три гена домашнего хозяйства (*TFRC*, *TBP*, *B2M*).

Проточная цитометрия

Проточная цитометрия была использована для оценки эффективности трансфекции и уровня НГР, выраженного в доле GFP-позитивных клеток. Измерения проводили на цитометре CyFlow Space (Sysmex-Partec, Germany). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Flomax software (Sysmex-Partec, Germany). Уровень НГР был нормализован на эффективность трансфекции.

Детекция доли восстановленных аллелей

Для оценки уровня НГР после редактирования проводили секвенирование локуса *eGFPmut*. Полученные хроматограммы использовали для определения доли отредактированных аллелей в программе TIDER (Tracking of Insertion, Deletions and Recombination events, <https://tider.nki.nl>).

Статистический анализ

Для анализа различий между группами значений использовали Microsoft Excel 2016 (Microsoft, США), программу STATISTICA 12.0 (StatSoft, США) и статистические тесты Манна-Уитни и Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В качестве модели для оценки эффективности редактирования использовали локус *eGFPmut* как в плазмиде, так и в геноме для исключения возможного влияния геномного окружения и кольцевого строения небольшого фрагмента ДНК в плазмиде на эффективность НГР. Последовательность *eGFPmut* содержит делецию с.337delG, приводящую к возникновению преждевременного стоп-кодона. Для коррекции мутации использовали CRISPR-Cas9 и ssODN с последовательностью без делеции в качестве матрицы для НГР. Восстановление рамки считывания в гене определяли по появлению зеленой флуоресценции и подтверждали секвенированием ДНК.

Нокдаун или оверэкспрессию гена *NUDT16L1* проводили за 24 часа до редактирования. В случае редактирования геномного локуса в клетки HEK293T-eGFPmut котрансфицировали CRISPR-Cas9 и ssODN, а для редактирования плазмидного локуса в клетки

HEK293T котрансфицировали CRISPR-Cas9, ssODN и плазмиду reGFP-C1mut.

Гиперэкспрессия *NUDT16L1* снижает эффективность НГР

Для гиперэкспрессии *NUDT16L1* был разработан вектор pcDNA3.1+*NUDT16L1*, трансфекция которого вызывала повышение уровня мРНК *NUDT16L1* в 400–800 раз (рис. 1, в). Гиперэкспрессия *NUDT16L1* снизила эффективность НГР, что отразилось в снижении доли GFP-позитивных клеток в 2,3 раза ($p=0,0096$) при редактировании геномного локуса *eGFP* и в 1,9 раз ($p=0,07$) при редактировании плазмидного локуса (рис. 1, а). При анализе секвенограмм редактируемых локусов программой TIDER также выявлено снижение доли отредактированных аллелей в 1,6 раза при редактировании плазмидного локуса ($p=0,053$) (рис. 1, б). Таким образом, гиперэкспрессия *NUDT16L1* незначительно снижает эффективность НГР при репара-

ции двухцепочечных разрывов в геномном контексте и слабо влияет или не влияет на эффективность НГР при репарации разрывов плазмидной ДНК.

Нокдаун *NUDT16L1* повышает эффективность НГР

Для нокдауна гена *NUDT16L1* использовали миРНК к кодирующей последовательности, трансфекция которой снижала экспрессию *NUDT16L1* в 2,6–6,3 раз (рис. 2, в). Нокдаун *NUDT16L1* повысил эффективность НГР, что выразилось в резком увеличении доли GFP-позитивных клеток – в 6 раз ($p=0,000001$) при редактировании плазмиды и в 2 раза ($p=0,0006$) при редактировании генома (рис. 2, а). Анализ секвенограмм ДНК редактируемых локусов подтвердил увеличение доли исправленных аллелей: в 1,8 раз ($p=0,0002$) при редактировании плазмид и в 3,6 раз ($p=0,02$) при редактировании генома (рис. 2, б). Таким образом, снижение экспрессии *NUDT16L1* повышает эффективность

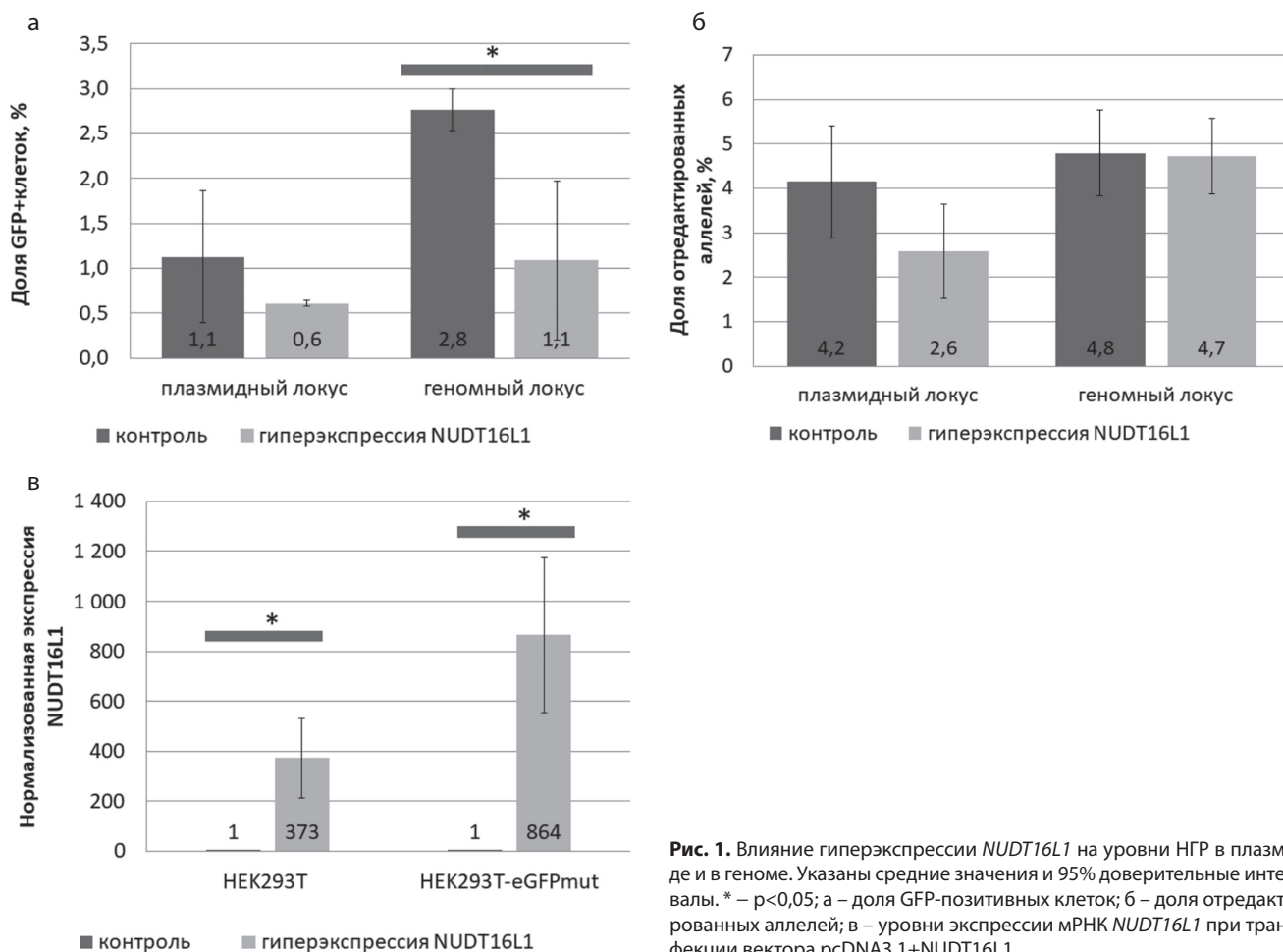


Рис. 1. Влияние гиперэкспрессии *NUDT16L1* на уровни НГР в плазмиде и в геноме. Указаны средние значения и 95% доверительные интервалы. * – $p < 0,05$; а – доля GFP-позитивных клеток; б – доля отредактированных аллелей; в – уровни экспрессии мРНК *NUDT16L1* при трансфекции вектора pcDNA3.1+*NUDT16L1*.

НГР при репарации двухцепочечных разрывов ДНК как в геноме, так и в свободной плазмидной ДНК.

Обсуждение

Эффективная точная коррекция мутаций — это ключевое условие для терапии большого количества наследственных заболеваний путём редактирования генома. Для повышения эффективности НГР используют различные методы. Уровень коррекции может зависеть от типа донорной молекулы, способа доставки CRISPR-Cas, типа молекулы Cas, фазы клеточного цикла и т.д. [22–26]. Комбинация известных методов может обеспечивать больший эффект, чем использование их по отдельности. Например, использование двойной sgRNA, синхронизации с клеточным циклом и асимметричного ssODN повышает НГР в 10 раз с 3,9–5,4% до 39% [27]. Комбинация Cas9 с транскрипционным фактором и одновременное использование малой молекулы валнему-

лина повышает уровень GFP-позитивных клеток в 4 раза (до 17,5%) [28]. Использование малых молекул NU7441 и SCR7 в комбинации с синхронизацией клеточного цикла позволяет достичь 1,7-кратного увеличения НГР в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках [29]. Как было описано выше, как снижение, так и повышение экспрессии *NUDT16L1* оказывает негативное воздействие на главный белок НГСК 53BP1. В 2017 г. было показано, что гиперэкспрессия *NUDT16L1* в клетках U2OS нарушает формирование фокусов 53BP1 и способствует возникновению устойчивости к олапарибу в клетках MEF с гипоморфными аллелями *Brcal-Δ11*. Более того, отсутствие *NUDT16L1* снижает белковые уровни 53BP1, а также усиливает ассоциацию белка с другими молекулами-партнерами [17]. В другом исследовании установили снижение экспрессии 53BP1 в ответ на потерю *NUDT16L1* в клетках HeLa, а также нарушение привлечения 53BP1 к локусам ДНР при гиперэкспрессии *NUDT16L1* [18].

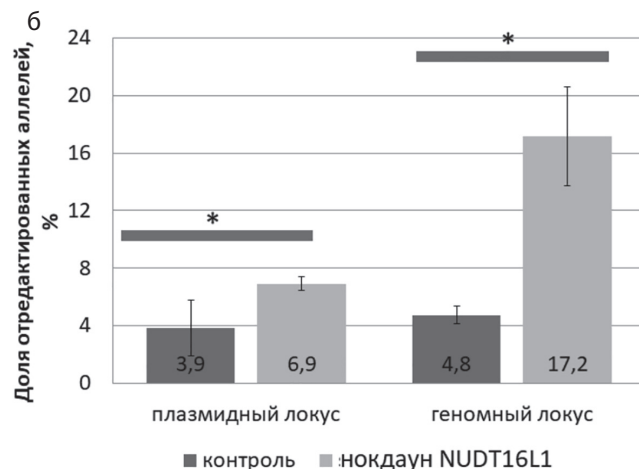
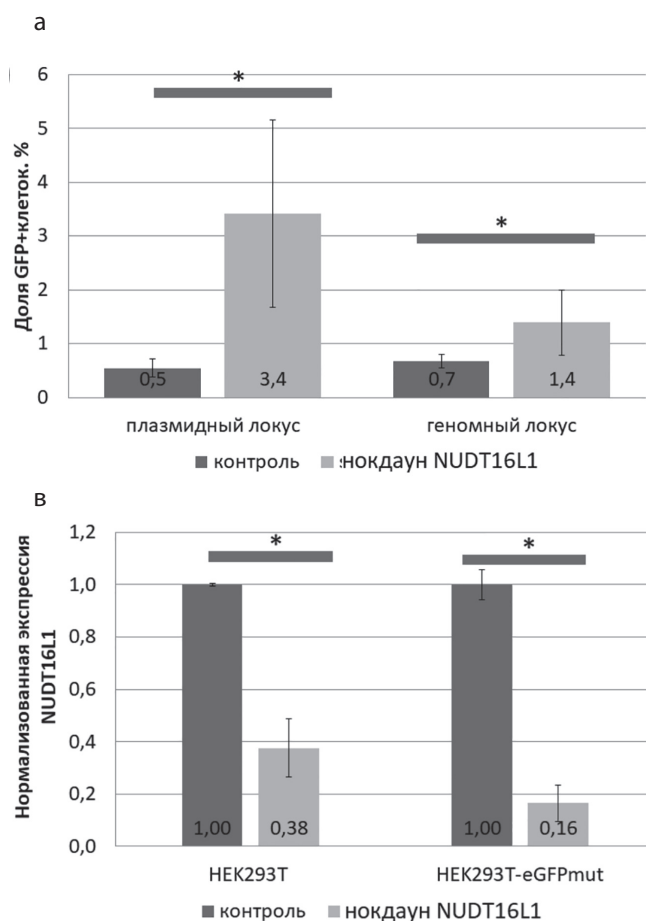


Рис. 2. Нокдаун *NUDT16L1* повышает уровень НГР. Приведены средние значения, 95% доверительный интервал; * — $p < 0,05$; а — доля GFP-позитивных клеток, б — доля отредактированных аллелей, в — уровни экспрессии *NUDT16L1* при нокдауне с помощью миРНК.

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что взаимодействие *NUDT16L1*-53BP1 защищает 53BP1 от деградации, однако комплекс *NUDT16L1*-53BP1 не способен участвовать в процессах репарации ДНК [30,31]. Мы использовали как гиперэкспрессию, так и нокдаун *NUDT16L1*, чтобы установить, как это повлияет на эффективность НГР. Было показано, что гиперэкспрессия *NUDT16L1* снижает уровень НГР в геномном локусе *eGFP* с 2,86% до 1,09%. Нокдаун *NUDT16L1* повышает эффективность НГР как в плазмидном, так и в геномном локусе.

Можно заключить, что потеря защиты 53BP1 от деградации вследствие снижения экспрессии *NUDT16L1* оказывает на путь НГСК большее влияние, чем предотвращение локализации 53BP1 в локусах ДНР при гиперэкспрессии *NUDT16L1* [32].

Основную потребность в редактировании генома испытывает медицинская генетика, где коррекция гена является единственной возможностью терапии заболеваний. Несмотря на то, что некоторые заболевания можно лечить с помощью трансплантации корректированных *ex vivo* аутологичных клеток, в большинстве случаев существует потребность исправлять мутацию в нескольких тканях или в сложных для трансплантации тканях, например, мышцах всего тела. В обоих случаях повышение эффективности НГР даже на несколько процентов может значительно приблизить исследователей к внедрению методов редактирования в клиническую практику. Важно отметить, что миРНК уже используют в клинических исследованиях, и мы надеемся, что использование миРНК к гену *NUDT16L1* может быть эффективным для повышения эффективности НГР как *in vitro*, так и *in vivo*.

Выводы

Факторы репарации ДНК могут быть использованы для контроля механизмов репарации и обеспечения эффективности НГР, необходимой для точного редактирования генома. Нокдаун гена *NUDT16L1* способствует повышению уровня НГР как при редактировании плазмидного, так и геномного локусов *eGFP*. Полученные данные могут быть использованы не только для улучшения эффективности коррекции, но и для исследований механизмов репарации ДНР ДНК.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Надежде Гурской, заведующей группой генодерматозов человека в Центре геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова,

за помощь в получении клеточной культуры НЕК293T_eGFPmut, а также Михаилу Скоблову, заведующей лабораторией функциональной геномики ФГБНУ «МГНЦ», за вклад в дизайн и анализ эксперимента.

Литература/References

1. Liu M., Rehman S., Tang X., Gu K., Fan Q., Chen D., et al. Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Front Genet* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jul 15];9(JAN). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30687381/>
2. Scully R., Panday A., Elango R., Willis N.A. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells [Internet]. Vol. 20, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2020 Jul 20]. p. 698–714. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41580-019-0152-0>
3. Panier S., Boulton S.J. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2014 Jan 11 [cited 2019 Feb 12];15(1):7–18. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrm3719>
4. Shibata A.. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* [Internet]. 2017 Oct [cited 2019 Feb 7];803–805:51–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28781144>
5. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* [Internet]. 2013 Feb 15 [cited 2021 Jul 15];339(6121):823. Available from: <http://pmc/articles/PMC3712628/>
6. He X., Tan C., Wang F., Wang Y., Zhou R., Cui D., et al. Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 May 19 [cited 2021 Jul 15];44(9):e85. Available from: <http://pmc/articles/PMC4872082/>
7. Cui X., Ji D., Fisher D., Wu Y., Briner D., Weinstein E. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2021 Jul 15];29(1):64–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21151125/>
8. Zhu Z., González F., Huangfu D. The iCRISPR platform for rapid genome editing in human Pluripotent Stem Cells. *Methods Enzymol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jul 15];546(C):215. Available from: <http://pmc/articles/PMC4418970/>
9. Canny M.D., Moatti N., Wan L.C.K., Fradet-Turcotte A., Krasner D., Mateos-Gomez P.A., et al. Inhibition of 53BP1 favors homology-dependent DNA repair and increases CRISPR–Cas9 genome-editing efficiency. *Nat Biotechnol*. 2017 Nov;36(1):95–102.
10. Charpentier M., Khedher A.H.Y., Menoret S., Brion A., Lamribet K., Dardillac E., et al. CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. *Nat Commun* 2018 91 [Internet]. 2018 Mar 19 [cited 2021 Jul 15];9(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-03475-7>
11. Hu Z., Shi Z., Guo X., Jiang B., Wang G., Luo D., et al. Ligase IV inhibitor SCR7 enhances gene editing directed by CRISPR–Cas9 and ssODN in human cancer cells. *Cell Biosci*. 2018 Dec;8(1):12.
12. Smirnikhina S.A., Anuchina A.A., Lavrov A.V. Ways of improving precise knock-in by genome-editing technologies. *Hum Genet* [Internet]. 2019 Jan 2 [cited 2019 Feb 5];138(1):1–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30390160>
13. Avolio R., Järvelin A.I., Mohammed S., Agliarulo I., Condelli V., Zoppoli P., et al. Protein Syndesmos is a novel RNA-binding protein that regulates primary cilia formation. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(22):12067–86.
14. Kim H., Yoo J., Lee I., Kang Y.J., Cho H.S., Lee W. Crystal structure of syndesmos and its interaction with Syndecan-4 proteoglycan.

- Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2015 Jul 13 [cited 2020 Apr 3];463(4):762–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X15300632>
15. Baciú P.C., Saoncella S., Lee S.H., Denhez F., Leuthardt D., Goetinck P.F. Syndesmos, a protein that interacts with the cytoplasmic domain of syndecan-4, mediates cell spreading and actin cytoskeletal organization. *J Cell Sci* [Internet]. 2000 Jan [cited 2019 Nov 25];113 Pt 2:315–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10633082>
 16. Denhez F., Wilcox-Adelman S.A., Baciú P.C., Saoncella S., Lee S., French B., et al. Syndesmos, a syndecan-4 cytoplasmic domain interactor, binds to the focal adhesion adaptor proteins paxillin and Hic-5. *J Biol Chem*. 2002 Apr 5;277(14):12270–4.
 17. Drané P., Brault M.E., Cui G., Meghani K., Chaubey S., Detappe A., et al. TIRR regulates 53BP1 by masking its histone methyl-lysine binding function. *Nature* [Internet]. 2017;543(7644):211–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature21358>
 18. Zhang A., Peng B., Huang P., Chen J., Gong Z. The p53-binding protein 1-Tudor-interacting repair regulator complex participates in the DNA damage response. *J Biol Chem* [Internet]. 2017 Apr 21 [cited 2019 Feb 6];292(16):6461–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28213517>
 19. Drané P., Chowdhury D. TIRR and 53BP1- partners in arms. *Cell Cycle* [Internet]. 2017;16(13):1235–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1337966>
 20. Laboratory of virology and genetics EPFL [Internet]. [cited 2021 Jul 15]. Available from: <https://www.epfl.ch/labs/tronolab/>
 21. Cloud-Based Informatics Platform for Life Sciences R&D | Benchling [Internet]. [cited 2021 Jul 15]. Available from: <https://www.benchling.com/>
 22. Yang D., Scavuzzo M.A., Chmielowiec J., Sharp R., Bajic A., Borowiak M. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Feb 18 [cited 2020 Oct 14];6(1):1–15. Available from: www.nature.com/scientificreports/
 23. Zhang J.-P., Li X.-L., Li G.-H., Chen W., Arakaki .C, Botimer G.D., et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol* [Internet]. 2017 Dec 20 [cited 2019 Feb 6];18(1):35. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-017-1164-8>
 24. Lin S., Staahl B.T., Alla R.K., Doudna J.A. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*. 2014;3:e04766.
 25. Gerlach M., Kraft T., Brenner B., Petersen B., Niemann H., Montag J., et al. Efficient Knock-in of a Point Mutation in Porcine Fibroblasts Using the CRISPR/Cas9-GMNN Fusion Gene. *Genes (Basel)* [Internet]. 2018 Jun 13 [cited 2019 Feb 14];9(6):296. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4425/9/6/296>
 26. Shao S., Ren C., Liu Z., Bai Y., Chen Z., Wei Z., et al. Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2020 Apr 1];92:43–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272517302388>
 27. Stazio M. Di, Foschi N., Athanasakis E., Gasparini P., d'Adamo A.P. Systematic analysis of factors that improve homologous direct repair (HDR) efficiency in CRISPR/Cas9 technique. *PLoS One* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2021 Jul 15];16(3):e0247603. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0247603>
 28. Li G., Wang H., Zhang X., Wu Z., Yang H. A Cas9–transcription factor fusion protein enhances homology-directed repair efficiency. *J Biol Chem*. 2021 Jan 1;296:100525.
 29. Maurissen T.L., Woltjen K. Synergistic gene editing in human iPS cells via cell cycle and DNA repair modulation. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Jul 15];11(1). Available from: [https://www.nature.com/articles/PMC7280248/](https://www.nature.com/articles/PMC7280248)
 30. Botuyan M.V., Cui G., Drané P., Oliveira C., Detappe A., Brault M.E., et al. Mechanism of 53BP1 activity regulation by RNA-binding TIRR and a designer protein. *Nat Struct Mol Biol*. 2018;1–10.
 31. Wang J., Yuan Z., Cui Y., Xie R., Yang G., Kassab M.A., et al. Molecular basis for the inhibition of the methyl-lysine binding function of 53BP1 by TIRR. *Nat Commun*. 2018;9(1):2689.
 32. Anuchina A.A., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A. TIRR: a potential front runner in HDR race—hypotheses and perspectives [Internet]. Vol. 47, *Molecular Biology Reports*. Springer; 2020 [cited 2020 Apr 3]. p. 2371–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32036573>