

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.11.20-26>

## Редактирование мутации c.3846G>A (p.Trp1282\*) в гене CFTR в ИПСК с использованием аденинового редактора

Кондратьева Е.В., Демченко А.Г., Лавров А.В., Смирнихина С.А.

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

Муковисцидоз (МВ) – аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене *CFTR*, приводящими к дисбалансу ионов хлора и натрия в эпителиальных клетках различных органов. Нонсенс-мутации в гене *CFTR* описаны у 10% пациентов с МВ, при этом наиболее частой нонсенс-мутацией является c.3846G>A (p.Trp1282\*, W1282X). Известно, что современная патогенетическая терапия МВ *CFTR*-модуляторами не эффективна в отношении этого класса мутаций, поэтому пациенты с нонсенс-мутациями в гене *CFTR* до сих пор остаются без эффективного лечения. Этиотропная терапия МВ может быть разработана на основе новейших методов геномного редактирования, например, с использованием редакторов оснований, позволяющих точно изменять нуклеотиды в геноме. Адениновый редактор оснований позволяет целенаправленно корректировать нонсенс-мутации. Целью работы явилась оценка эффективности коррекции мутации c.3846G>A в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) пациента с МВ с помощью аденинового редактора оснований. В работе использован редактор xCas9(3.7)-ABE(7.10) в сочетании с гидовой РНК (в отдельной плазмиде B52-1282), позволяющей редактору конвертировать c.3846A>G. Плазмиды были трансфицированы электропорацией в ИПСК с генотипом F508del/c.3846G>A в гене *CFTR*. Оценка эффективности коррекции проводили спустя 48 часов путём глубокого таргетного секвенирования. Результаты работы показали, что частота конверсии нуклеотида c.3846A>G составила 10,9% аллелей. При этом частота нежелательных изменений (инделов) в локусе редактирования не превышала таковую в нетрансфицированном контроле. Таким образом, в работе показано, что адениновый редактор оснований xCas9(3.7)-ABE(7.10) позволяет корректировать мутацию c.3846G>A в гене *CFTR* в 10,9% аллелей в ИПСК больного МВ без внесения дополнительных мутаций в локус редактирования.

**Ключевые слова:** муковисцидоз, мутация c.3846G>A (p.Trp1282\*, W1282X), ген *CFTR*, геномное редактирование, редакторы оснований, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

**Для цитирования:** Кондратьева Е.В., Демченко А.Г., Лавров А.В., Смирнихина С.А. Редактирование мутации c.3846G>A (p.Trp1282\*) в гене *CFTR* в ИПСК с использованием аденинового редактора. *Медицинская генетика* 2023; 22(11): 20-26.

**Автор для корреспонденции:** Смирнихина С.А.; e-mail: smirnikhinas@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 03.11.2023

## Editing the c.3846G>A (p.Trp1282\*) mutation in the CFTR gene in iPSCs using adenine editor

Kondrateva E.V., Demchenko A.G., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A.

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

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in the *CFTR* gene, leading to an imbalance of chloride and sodium ions in the epithelial cells of various organs. Nonsense mutations in the *CFTR* gene are present in 10% of CF patients, with the most common being c.3846G>A (p.Trp1282\*, W1282X). Current *CFTR*-modulator therapy is ineffective against this class of mutations, leaving patients with nonsense mutations in the *CFTR* gene without effective treatment. Etiotropic therapy for CF can be developed based on the latest genome editing methods, such as base editors, which allow precise changes to nucleotides in the genome. Adenine base editors allow for targeted correction of nonsense mutations. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of correcting the c.3846G>A mutation in induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a CF patient using an adenine base editor. The xCas9(3.7)-ABE(7.10) editor was used in combination with a guide RNA (in a separate B52-1282 plasmid) to convert c.3846A>G. Plasmids were transfected into iPSCs with the F508del/c.3846G>A genotype in the *CFTR* gene using electroporation. The effectiveness of correction was evaluated 48 hours later using deep targeted sequencing. The results showed a conversion frequency of 10.9% of c.3846A>G alleles, with no increase in unwanted changes (indels) in the editing locus compared to the untransfected control. Therefore, this study demonstrates that the adenine base editor xCas9(3.7)-ABE(7.10) allows for correction of the c.3846G>A mutation in the *CFTR* gene in 10.9% of alleles in iPSCs from a CF patient without introducing additional mutations in the editing locus.

**Keywords:** cystic fibrosis, c.3846G>A (p.Trp1282\*, W1282X) mutation, *CFTR* gene, genome editing, base editors, induced pluripotent stem cells.

**For citation:** Kondrateva E.V., Demchenko A.G., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A. Editing the c.3846G>A (p.Trp1282\*) mutation in the *CFTR* gene in iPSCs using adenine editor. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(11): 20-26. (In Russ.)

**Corresponding author:** Smirnikhina S.A.; **e-mail:** smirnikhinas@gmail.com

**Funding.** The work has been funded by the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

**Accepted:** 03.11.2023

## Введение

**М**уковисцидоз (МВ) – относительно частое аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене *CFTR*. Белок, кодируемый геном *CFTR*, представляет собой ионный канал, участвующий в транспорте ионов хлора. Мутации в гене *CFTR* обуславливают либо полное отсутствие ионного канала, либо нарушение его проводимости вследствие различных изменений белка. Полное отсутствие белка *CFTR* вследствие нонсенс-мутаций приводит к развитию наиболее тяжелого течения МВ [1].

Появившиеся в последнее десятилетие препараты патогенетической терапии (*CFTR*-модуляторы) демонстрируют хороший эффект, однако подходят только пациентам, у которых белок *CFTR* образуется, но по той или иной причине не функционирует. В случаях нонсенс-мутаций эти препараты неэффективны, а пациентам показано только симптоматическое лечение [2]. Особые надежды возлагали на препарат аталурен, эффективный в отношении пациентов с миодистрофией Дюшенна-Беккера, обусловленной нонсенс-мутациями, однако клинические исследования при МВ показали отсутствие какого-либо терапевтического эффекта [3]. Таким образом, несмотря на появление новых лекарственных препаратов, пациенты с нонсенс-мутациями в гене *CFTR* остаются без эффективного лечения.

Геномное редактирование – группа методов молекулярной генетики, позволяющая целенаправленно изменять геномы [4]. С появлением этих методов, в особенности метода CRISPR-Cas в 2012 году, генная терапия вышла на новый уровень, и в настоящее время на основе редактирования генома разрабатывается несколько десятков препаратов для лечения наследственных заболеваний человека, часть из которых уже проходит клинические исследования 3 фазы. Первые модификации метода CRISPR-Cas были не очень точными и сопровождалась относительно большой частотой неспецифических изменений в геноме. Однако с каждым годом методика совершенствуется и становится не только более эффективной, но и безопасной [5].

Редактирование оснований – относительно новая модификация CRISPR-Cas, позволяющая конвертировать нуклеотиды в окне редактирования без создания двуцепочечных разрывов ДНК. Данный метод имеет минимальное количество неспецифических изменений генома как в локусе редактирования, так и за его пределами, и позволяет ювелирно исправлять точечные мутации, которые являются основным типом мутаций, приводящих к наследственным заболеваниям [5]. Редакторы оснований можно разделить на два класса: цитозиновые [6] и адениновые [7]. Цитозиновые редакторы оснований способны конвертировать цитозины в тимины, тогда как адениновые – аденины в гуанины. Последний тип редакторов позволяет редактировать до 34% всех патогенных замен G>A [8], подходит для коррекции нонсенс-мутаций, поэтому имеет особую перспективу для разработки метода исправления нонсенс-мутаций при МВ. Мутация с.3846G>A (p.Trp1282\*, W1282X) является наиболее распространенной в мире (1% пациентов [9]) и в России (2% пациентов [10]) нонсенс-мутацией при МВ, при этом ее частота достигает 36% пациентов в Израиле [9].

Целью работы явилась оценка эффективности коррекции мутации с.3846G>A в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) пациента с МВ с помощью аденинового редактора оснований.

## Методы

### Клеточная линия ИПСК

Клеточная линия ИПСК с генотипом F508del/c.3846G>A в гене *CFTR* была получена из фибробластов кожи пациента с МВ и полностью охарактеризована [11]. Клетки культивировали в среде Essential 8™ Medium (Thermo Fisher Scientific, США).

### Плазмиды для геномного редактирования

Плазида xCas9(3.7)-ABE(7.10) (для простоты далее она обозначена как xABE) была подарена David Liu (Addgene plasmid #108382; <http://n2t.net/addgene:108382>; RRID:Addgene\_108382), плазида B52 (empty plasmid

backbone to express 2 sgRNAs) была подарена Alberto Ciccia (Addgene plasmid #100708; <http://n2t.net/addgene:100708>; RRID:Addgene\_100708). Обе плазмиды были выделены, очищены и секвенированы для подтверждения ключевых элементов. Для редактирования мутации с.3846G>A с помощью бесплатного программного обеспечения CRISPR RGEN Tools [12] была подобрана и затем синтезирована (Евроген, Россия) последовательность спейсера гидовой РНК CAGTGAAGGAAAGCCTTTGG в виде двух перекрывающихся одноцепочечных олигонуклеотидов с рестрикционными сайтами на 5'-концах для эндонуклеазы рестрикции BbsI. С помощью реакции рестрикции и лигирования спейсер гидовой РНК был заклонирован в плазмиду. Таким образом была получена плазида В52-1282. Вставка спейсера гидовой РНК была подтверждена секвенированием по Сэнгеру.

#### Редактирование мутации с.3846G>A

Трансфекция ИПСК была проведена методом электропорации с помощью системы трансфекции Neon (Thermo Fisher Scientific, США). За 2 часа до трансфекции в лунках с клетками заменяли среду на свежую Essential 8 с 5  $\mu$ M Y-27632. Для трансфекции клетки снимали стандартным способом с использованием раствора Версена и ресуспендировали в среде Opti-MEM™ (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением GlutaMAX™ Supplement (Life Technologies, США). Трансфекцию выполняли согласно протоколу производителя, используя электролитный буфер E2, наконечники 100  $\mu$ L Neon™ Tip и следующие настройки: 1400 В, 10 мс, 2 удара.

Тестировали 3 экспериментальных условия, которые различались молярным соотношением плазмид В52-1282 и хАВЕ (1:1, 2:1 и 4:1). Для каждого условия проводили два эпизода трансфекции, при этом в каждом эпизоде трансфекции использовали 500 тыс. клеток и 7 мкг плазмиды или смеси плазмид. После трансфекции 1 млн клеток каждого условия высевали в отдельную лунку 12-луночного планшета в среде

Essential 8 без антибиотика с добавлением  $\mu$ M Y-27632 и 10% FBS (Hyclone, США). Чтобы оценить эффективность трансфекции, также проводили трансфекцию ИПСК при аналогичных условиях плазмидой рEGFP-C1 (Clontech, США) для экспрессии флуоресцентного белка GFP. В лунки с нетрансфицированным контролем высевали по 1 млн ИПСК. Клетки культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Через 24 ч культуральную среду меняли на свежую среду Essential 8. Еще через 24 ч клетки снимали стандартным образом. Клетки после трансфекции плазмидой рEGFP-C1 (3 повтора) оценивали на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США) (среднее значение эффективности трансфекции составило 9,4%). Клетки экспериментальных условий и нетрансфицированного контроля (по 3 повтора на каждое условие) снимали стандартным способом и использовали для выделения ДНК.

#### Оценка эффективности и точности редактирования мутации с.3846G>A

ДНК из трансфицированных клеток и нетрансфицированного контроля была выделена с помощью набора Quick-DNA Miniprep Kit (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя.

Фрагмент гена *CFTR* был амплифицирован с помощью амплификатора Eppendorf 5332 Mastercycler Personal PCR Thermal Cycle (Eppendorf, Германия). Для приготовления реакционной смеси использовали Taq-полимеразу, 10X Taq Turbo буфер, 50X смесь dNTP (Евроген, Россия). Этапы и условия проведения реакции были следующими: 1 цикл локальной денатурации (5 мин, 95°C); 35 циклов, включающих денатурацию (20 с, 95°C), отжиг праймеров (20 с, 60°C) и элонгацию (15 с, 72°C); и 1 цикл ресинтеза концевых участков ампликона (5 мин, 72°C). Последовательности праймеров приведены в **таблице 1**. Длина ампликона составляла 120 п.н.

Затем было проведено глубокое таргетное секвенирование ампликона. Библиотека была изготовлена с помощью наборов PCR KAPA HiFi HotStart ReadyMix и KAPA Hyper Prep, были использованы адаптеры KAPA с двойным индексом, 15 мкМ KAPA UDI Adapter Plate (96), секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с помощью MiSeq v3 600 в ЦКП «Геном» ФГБНУ «МГНЦ». Полученные результаты анализировали с помощью программы CRISPResso2 [13]. Анализировали по 15 нуклеотидов в обе стороны от предполагаемого места разрыва ДНК. Для оценки процента конверсии нуклеотида А в G в позиции 7 с 5'-конца спейсера гидовой РНК

**Таблица 1.** Последовательности олигонуклеотидов для амплификации участка гена *CFTR*

**Table 1.** Oligonucleotide sequences for amplification of the *CFTR* gene region

Название	Последовательность (5'-3')
1282_seq_F	ACTACTGAACACTGAAGGAGAAATC
1282_seq_R	TTCTGGCTAAGTCCTTTTGCTCAC

в анализ брали данные с покрытием не менее 30. Эффективность редактирования считали с поправкой на эффективность трансфекции по формуле:  $E = (\% \text{ аллелей с нуклеотидом G-49,41})/50 \cdot 100/T$ , где  $T$  – эффективность трансфекции в долях единицы. Для оценки инделов в области гомологии со спейсером гидовой РНК учитывали данные с покрытием не менее 8.

#### Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA v.10 (StatSoft Inc., США).

#### Результаты

В данной работе использовали адениновый редактор, состоящий из никазы  $\text{xCas9(3.7)}$  (модифицированная нуклеаза, имеющая ряд мутаций, позволяющих связываться с РАМ NG, GAA или GAT и имеющая один расщепляющий домен), и двух адениновых дезаминаз из *E. coli* TadA (дикого типа и с мутациями, соединенными друг с другом линкером в 32 аминокислоты) [14]. Эта модификация получила название  $\text{xABE}$  (рис. 1). В редакторе  $\text{xABE}$  используется модификация аденинового редактора ABE (7.10), окно редактирования которого, по данным разработчиков, включает нуклеотиды в позициях с 4 по 7, реже в позиции 8 (рис. 1).

В связи с жесткими требованиями к дизайну гидовой РНК (наличие РАМ последовательности и попадание нуклеотида, который необходимо конвертировать, в окно редактирования) удалось подобрать только один вариант гидовой РНК. Гидовая РНК была доставлена в ИПСК в отдельной плазмиде B52-1282. Плазмиды B52-1282 и  $\text{xABE}$  были трансфицированы в ИПСК больного МВ с генотипом *CFTR*: F508del/c.3846G>A в соотношениях 1:1, 2:1 и 4:1. При редактировании мутации c.3846G>A в гене *CFTR* таргетный нуклеотид находится в позиции 6 в окне редактирования. Помимо него в окно редактирования (в позиции 7) попадает еще один аденин, который также может конвертироваться в гуанин (рис. 2). Вариант c.3847A>G не является патогенным, хоть и приводит к замене аминокислоты аргинина на глицин (p.R1283G) (данные Американ-

ского регистра мутаций при МВ *CFTR*2, <https://cftr2.org>, дата обращения 01.08.2023).

Так как ИПСК имели генотип F508del/c.3846G>A, то 50% аллелей содержали нуклеотид А в позиции 6 окна редактирования и столько же аллелей содержали нуклеотид G в этом положении. При анализе нетрансфицированных клеток выяснилось, что соотношение аллелей не 50/50, а аллель А преобладал (при анализе трех независимых образцов в среднем соотношение составило А: 50,59%; G: 49,41%, разница была статистически достоверной,  $p=0,0021$ ), поэтому при расчете эффективности редактирования формулу видоизменили:  $E = (\% \text{ аллелей с нуклеотидом G-49,41})/50 \cdot 100/T$ .

Результаты работы показывают, что частота конверсии нуклеотида c.3846A>G (позиция 6) составляет 10,9% при использовании соотношения B52-1282 и  $\text{xABE}$  (1:1), при увеличении количества плазмиды B52-1282 эффективность коррекции снижается. При этом в позиции 7 не отмечено повышения частоты встречаемости нуклеотида G при редактировании, относительно нетрансфицированного контроля.

Далее в работе была проанализирована частота внесения нежелательных изменений (инделов) в локус редактирования. При анализе инделов учитывали делеции и инсерции нуклеотидов в окне редактирования и в шести нуклеотидах по обеим сторонам (3+3) от предполагаемого разрыва ДНК никазой. Инсерций с покрытием NGS больше трех обнаружено не было и, поскольку такие события встречались в немодифицированных контрольных образцах, их отнесли к ошибкам секвенирования. Было обнаружено четыре типа делеций в анализируемых регионах: делеции нуклеотидов в позициях 7, 15, 18 и 20 (рис. 3). Примечательно, что делетировались только нуклеотиды, которые идут парами, то есть два последовательных AA/GG/CC, или триплетом TTT, поэтому точно определить, какой именно нуклеотид из пары/триплета делетировался, невозможно. В связи с тем, что частота делеций нуклеотидов была такой же, как и в нетрансфицированном контроле, вероятно, все эти делеции, так же как инсерции, можно отнести к ошибкам секвенирования.



Рис. 1. Схематическое изображение структурных элементов  $\text{xABE}$  и окна редактирования [15].

Fig. 1. Scheme of  $\text{xABE}$  structural elements and editing windows [15].

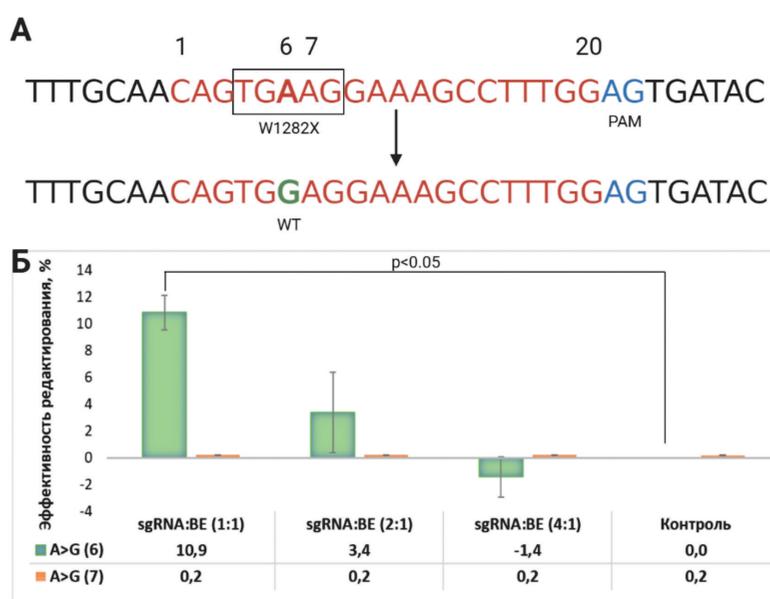
## Обсуждение

Нонсенс-мутации встречаются у 10% пациентов с МВ [16], и существующее патогенетическое лечение неэффективно для этой группы пациентов, так как направлено на улучшение работы белка CFTR, тогда как при нонсенс-мутациях белок не образуется [2]. Методы генной терапии, особенно основанные на геномном редактировании, являются многообещающим инструментом, способным корректировать практически все типы мутаций, и могут лечь в основу этиотропной терапии МВ. На фоне многочисленных методов геномного редактирования модификация «редактирование оснований» выглядит предпочтительной, так как отличается очень низкой неспецифической активностью и относительно высокой эффективностью [5].

ИПСК обладают мощным дифференцировочным потенциалом, который можно использовать для получения труднодоступных для биопсии клеток. Напри-

мер, из ИПСК пациента с МВ можно получить клетки легких [17], поджелудочной железы [18] и т.д., пораженных при МВ. Для разработки эффективного метода лечения заболевания можно корректировать мутацию в ИПСК, а затем из модифицированных клеток получить клеточные производные, в которых показать восстановление работы канала CFTR и охарактеризовать все возможные изменения на уровне ДНК, РНК и белков. Для этого необходимо, чтобы эффективность коррекции мутации в ИПСК была достаточно высокой для получения популяции клеток без проведения дополнительной селекции или сортировки.

В связи с низкой эффективностью доставки генетических конструкций в ИПСК и коррекции мутаций в них разные научные группы используют различные методики, позволяющие в конечном итоге добиться получения большого количества отредактированных ИПСК. Несмотря на это, исправление мутаций в ИПСК все еще остается довольно сложной задачей,



**Рис. 2.** Коррекция мутации c.3846G>A (W1282X) в гене *CFTR* в ИПСК больного муковисцидозом. А – схема локуса ДНК, в котором осуществлялась коррекция. Цифрами обозначены позиции нуклеотидов от 5'-конца sgRNA, рамкой выделено окно редактирования, красными буквами обозначены нуклеотиды, к которым гомологичен спейсер гидовой РНК, синими буквами обозначены нуклеотиды PAM. Б – эффективность конверсии A>G в позициях 6 и 7 последовательности ДНК при разных условиях. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего, n=3. Статистическая обработка проводилась с использованием t-критерия.

**Fig. 2.** Correction of the c.3846G>A (W1282X) mutation in the *CFTR* gene in iPSCs from a cystic fibrosis patient. А – diagram of the DNA locus in which the correction was carried out. The numbers indicate the positions of nucleotides from the 5'-end of the sgRNA, the editing window is highlighted with a frame, the nucleotides to which the guide RNA spacer is homologous are indicated in red letters, and the PAM nucleotides are indicated in blue letters. В – efficiency of A>G conversion at positions 6 and 7 of the DNA sequence under different conditions. Data are presented as mean ± standard error of the mean, n=3. Statistical analysis was carried out using the t-test.



## Литература/References

1. Shteinberg M., Haq I.J., Polineni D., Davies J.C. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2021 Jun 5;397(10290):2195-2211. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32542-3
2. Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol*. 2020 Feb 21;10:1662. doi: 10.3389/fphar.2019.01662
3. Zainal Abidin N., Haq I.J., Gardner A.I., Brodrie M. Ataluren in cystic fibrosis: development, clinical studies and where are we now? *Expert Opin Pharmacother*. 2017 Sep;18(13):1363-1371. doi: 10.1080/14656566.2017.1359255
4. Doudna J.A. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. 2020 Feb;578(7794):229-236. doi: 10.1038/s41586-020-1978-5
5. Anzalone A.V., Koblan L.W., Liu D.R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol*. 2020 Jul;38(7):824-844. doi: 10.1038/s41587-020-0561-9
6. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016 May 19;533(7603):420-4. doi: 10.1038/nature17946
7. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. Programmable base editing of A • T to G • C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017 Nov 23;551(7681):464-471. doi: 10.1038/nature24644
8. Lavrov A.V., Varenikov G.G., Skoblov M.Y. Genome scale analysis of pathogenic variants targetable for single base editing. *BMC Med Genomics*. 2020 Sep 18;13(Suppl 8):80. doi: 10.1186/s12920-020-00735-8
9. Petrova N., Balinova N., Marakhonov A., Vasilyeva T., Kashirskaya N., Galkina V., Ginter E., Kutsev S., Zinchenko R. Ethnic Differences in the Frequency of CFTR Gene Mutations in Populations of the European and North Caucasian Part of the Russian Federation. *Front Genet*. 2021 Jun 16;12:678374. doi: 10.3389/fgene.2021.678374
10. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2020 год. Под редакцией Е.И. Кондратьевой, С.А. Красовского, М.А. Стариновой, А.Ю. Воронковой, Е.Л. Амелиной, Н.Ю. Каширской, С.Н. Авдеева, С.И. Куцева. Москва: МЕД-ПРАКТИКА-М, 2022. 68 с.
11. Kondrateva E., Demchenko A., Slesarenko Y., Pozhitnova V., Yasinovskiy M., Amelina E., Tabakov V., Voronina E., Lavrov A., Smirnikhina S. Generation of two induced pluripotent stem cell lines (RCM-Gi004-A and -B) from human skin fibroblasts of a cystic fibrosis patient with compound heterozygous F508del/W1282X mutations. *Stem Cell Research* 2021; 52: 102232. DOI: 10.1016/j.scr.2021.102232
12. Hwang G.H., Park J., Lim K., Kim S., Yu J., Yu E., Kim S.T., Eils R., Kim J.S., Bae S. Web-based design and analysis tools for CRISPR base editing. *BMC Bioinformatics*. 2018 Dec 27;19(1):542. doi: 10.1186/s12859-018-2585-4
13. Clement K., Rees H., Canver M.C., Gehrke J.M., Farouni R., Hsu J.Y., Cole M.A., Liu D.R., Joung J.K., Bauer D.E., Pinello L. CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. *Nat Biotechnol*. 2019 Mar; 37(3):224-226. doi: 10.1038/s41587-019-0032-3
14. 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. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*. 2018 Apr 5;556(7699):57-63. doi: 10.1038/nature26155
15. Rees H.A., Liu D.R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet*. 2018 Dec;19(12):770-788. doi: 10.1038/s41576-018-0059-1
16. Wilschanski M. Class 1 CF Mutations. *Front Pharmacol*. 2012 Jun 20;3:117. doi: 10.3389/fphar.2012.00117
17. Demchenko A., Kondrateva E., Tabakov V., Efremova A., Salikhova D., Bukharova T., Goldshtein D., Balyasin M., Bulatenko N., Amelina E., Lavrov A., Smirnikhina S. Airway and Lung Organoids from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Can Be Used to Assess CFTR Conductance. *Int. J. Mol. Sci*. 2023, 24, 6293. <https://doi.org/10.3390/ijms24076293>
18. Maxwell K.G., Millman J.R. Applications of iPSC-derived beta cells from patients with diabetes. *Cell Rep Med*. 2021 Apr 20;2(4):100238. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100238
19. Fleischer A., Vallejo-Díez S., Martín-Fernández J.M., Sánchez-Gilbert A., Castresana M., Del Pozo A., Esquisabel A., Ávila S., Castrillo J.L., Gaínza E., Pedraz J.L., Viñas M., Bachiller D. iPSC-Derived Intestinal Organoids from Cystic Fibrosis Patients Acquire CFTR Activity upon TALEN-Mediated Repair of the p.F508del Mutation. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020 Apr 18;17:858-870. doi: 10.1016/j.omtm.2020.04.005
20. Palmer D.J., Turner D.L., Ng P. A Single «All-in-One» Helper-Dependent Adenovirus to Deliver Donor DNA and CRISPR/Cas9 for Efficient Homology-Directed Repair. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020 Feb 4;17:441-447. doi: 10.1016/j.omtm.2020.01.014
21. Suzuki S., Chosa K., Barillà C., Yao M., Zuffardi O., Kai H., Shuto T., Suico M.A., Kan Y.W., Sargent R.G., Gruenert D.C. Seamless Gene Correction in the Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Locus by Vector Replacement and Vector Insertion Events. *Front Genome Ed*. 2022 Apr 6;4:843885. doi: 10.3389/fgeed.2022.843885
22. Johnson L.G., Olsen J.C., Sarkadi B., Moore K.L., Swanstrom R., Boucher R.C. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet*. 1992 Sep;2(1):21-5. doi: 10.1038/ng0992-21
23. Geurts M.H., de Poel E., Amatngalim G.D., et al. CRISPR-Based Adenine Editors Correct Nonsense Mutations in a Cystic Fibrosis Organoid Biobank [published online ahead of print, 2020 Feb 13]. *Cell Stem Cell*. 2020;S1934-5909(20)30019-9. doi:10.1016/j.stem.2020.01.019
24. Krishnamurthy S., Traore S., Cooney A.L., Brommel C.M., Kulkarnav K., Sinn P.L., Newby GA, Liu DR, McCray PB. Functional correction of CFTR mutations in human airway epithelial cells using adenine base editors. *Nucleic Acids Res*. 2021 Oct 11;49(18):10558-10572. doi: 10.1093/nar/gkab788
25. Chiavetta R.F., Titoli S., Barra V., Cancemi P., Melfi R., Di Leonardo A. Site-Specific RNA Editing of Stop Mutations in the CFTR mRNA of Human Bronchial Cultured Cells. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 30;24(13):10940. doi: 10.3390/ijms241310940
26. Melfi R., Cancemi P., Chiavetta R., Barra V., Lentini L., Di Leonardo A. Investigating REPAIRv2 as a Tool to Edit CFTR mRNA with Premature Stop Codons. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 6;21(13):4781. doi: 10.3390/ijms21134781
27. Cuevas-Ocaña S., Yang J.Y., Aushev M., Schlossmacher G., Bear C.E., Hannan N.R.F., Perkins N.D., Rossant J., Wong A.P., Gray M.A. A Cell-Based Optimised Approach for Rapid and Efficient Gene Editing of Human Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 17;24(12):10266. doi: 10.3390/ijms241210266
28. Erwood S., Laselva O., Bily T.M.I., Brewer R.A., Rutherford A.H., Bear C.E., Ivakine E.A. Allele-Specific Prevention of Nonsense-Mediated Decay in Cystic Fibrosis Using Homology-Independent Genome Editing. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020 May 12;17:1118-1128. doi: 10.1016/j.omtm.2020.05.002
29. Santos L., Mention K., Cavusoglu-Doran K., Sanz D.J., Bacalhau M., Lopes-Pacheco M., Harrison P.T., Farinha C.M. Comparison of Cas9 and Cas12a CRISPR editing methods to correct the W1282X-CFTR mutation. *J Cyst Fibros*. 2021 Jun 5;S1569-1993(21)00167-3. doi: 10.1016/j.jcf.2021.05.014