

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.08.33-39>

## Скрининг направляющих РНК для восстановления рамки считывания в гене DMD методом геномного редактирования

Левченко О.А., Кочергин-Никитский К.С., Панчук И.О., Володина О. В, Нагиева С.Э., Куршакова Е.В., Петрова И.О., Смирнихина С.А., Лавров А.В.

ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова  
15522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

Мышечная дистрофия Дюшенна является самой распространённой мышечной дистрофией у детей. Причиной заболевания наиболее часто являются делеции экзонов 43-55 гена *DMD*, приводящие к сдвигу рамки считывания и отсутствию экспрессии функционального белка дистрофина. Для восстановления рамки считывания наиболее оптимальным является подход пропуска дополнительного экзона. Для того, чтобы удалить экзон полностью необходимо внести два двухцепочечных разрыва ДНК, что сопряжено с рядом негативных последствий. Однако перманентного пропуска экзона также можно добиться, разрушив сайт сплайсинга единственным разрывом ДНК с последующей репарацией путём нехомологичного соединения концов. Для оценки возможности реализации данной стратегии нами был проведен биоинформатический и экспериментальный скрининг нРНК, направленных на сайты сплайсинга экзонов 43-55. В результате наиболее перспективными для редактирования подобным образом оказались акцепторные сайты сплайсинга экзонов 54-55 и донорные сайты сплайсинга экзонов 43 и 53. Кроме того показана эффективность работы Cas9 с неклассической PAM-последовательностью NGA.

**Ключевые слова:** редактирование генома, мышечная дистрофия Дюшенна, *DMD*, экзон-скиппинг, восстановление рамки считывания.

**Для цитирования:** Левченко О.А., Кочергин-Никитский К.С., Панчук И.О., Володина О. В, Нагиева С.Э., Куршакова Е.В., Петрова И.О., Смирнихина С.А., Лавров А.В. Скрининг направляющих РНК для восстановления рамки считывания в гене *DMD* методом геномного редактирования. *Медицинская генетика* 2024; 23(8): 33-39.

**Автор для корреспонденции:** Левченко О.А.; e-mail: olia9998@gmail.com

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-15-00482.

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

**Поступила:** 12.08.2024

## Single guide RNAs screening for restoring the reading frame of the DMD gene by genome editing

Levchenko O.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Panchuk I.O., Volodina O.V., Nagieva S.E., Kurshakova E.V., Petrova I.O., Smirnikhina S.A., Lavrov A.V.

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

Duchenne muscular dystrophy is the most common muscular dystrophy among children. Mostly the cause of the disease is frame-shift deletions of exons 43-55 of the *DMD* gene, leading to the absence of expression of the functional dystrophin. The most optimal approach to restoring the reading frame is skipping an additional exon. In order to completely remove an exon, it is necessary to introduce two double-stranded DNA breaks, which is associated with a number of negative consequences. However, permanent exon skipping can also be achieved by disruption the splice site by a single DNA break with following repair by non-homologous end joining. To assess the feasibility of this strategy, we performed a bioinformatics and experimental screening of sgRNAs targeting the splice sites of exons 43-55. As a result, the most promising sites for editing were the acceptor splice sites of exons 54-55 and the donor splice sites of exons 43 and 53. In addition, we demonstrate the efficiency of Cas9 with the non-classical PAM sequence NGA.

**Keywords:** genome editing, Duchenne muscular dystrophy, *DMD*, exon skipping, reading frame restoration.

**For citation:** Levchenko O.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Panchuk I.O., Volodina O.V., Nagieva S.E., Kurshakova E.V., Petrova I.O., Smirnikhina S.A., Lavrov A.V. Single guide RNAs screening for restoring the reading frame of the *DMD* gene by genome editing. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(8): 33-39. (In Russian).

**Corresponding author:** Olga A. Levchenko; e-mail: olia9998@gmail.com

**Funding.** The study was supported by grant No. 23-15-00482 from the Russian Science Foundation.

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

**Accepted:** 12.08.2024

## Введение

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — тяжелое X-сцепленное наследственное заболевание, при котором прогрессирующая атрофия мышц приводит к усиливающимся трудностям с движением и, в конечном итоге, к необходимости искусственной вентиляции легких и преждевременной смерти. Заболевание вызвано патогенными вариантами в гене *DMD*, которые подавляют выработку дистрофина в мышцах [1], чаще всего это делеции одного или нескольких экзонов из региона 43-55, приводящие к сдвигу рамки считывания [2]. Делеции и дупликации без сдвига рамки считывания в основном приводят к другому аллельному заболеванию — мышечной дистрофии Беккера, отличающейся более мягким течением и большей продолжительностью жизни [3].

Современные возможности открывают множество вариантов восстановления функции белка, которые могут приводить к облегчению тяжести течения наследственных заболеваний. Во всем мире было одобрено более 100 различных методов генной, клеточной и РНК-терапии [4]. Наиболее актуальными и популярными стратегиями лечения мышечных дистрофий являются подходы с заменой поврежденного гена путем его переноса с помощью вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и синтеза с него функционального белка [5], пропуск экзона с использованием антисмысловых олигонуклеотидов [6] и метод транс-сплайсинга [7]. Однако они могут иметь ряд недостатков, например, интегрирующие векторы могут привести к онкогенной трансформации, в то время как неинтегрирующие генные конструкции не могут гарантировать продолжительное функционирование, особенно в делящихся клетках [8].

В данной работе мы используем систему CRISPR (кластерные, регулярно расположенные короткие палиндромные повторы)/Cas9, которая отличается от предыдущих подходов тем, что создает точные и постоянные изменения в геноме [9]. В упрощенном виде принцип работы системы заключается в том, что нуклеаза Cas9 в комплексе с уникальной направляющей РНК (нРНК) создаёт двухцепочечный разрыв в заданном месте ДНК, который может восстанавливаться естественным путём системами клеточной репарации. В момент репарации в место разрыва можно вставить необходимую последовательность ДНК или воспользоваться тем, что процесс негомологичного соединения концов ДНК зачастую приводит к однонуклеотид-

ным вставкам или делециям, которые могут, например, нокаутировать ген. Недавние результаты клинических исследований по лечению пигментной дегенерации сетчатки показали эффективность геномного редактирования при субретинальном введении препарата [10]. Кроме того, это был один из первых опытов *in vivo* введения препаратов редактирования генома человеку, успешность которого может развеять опасения о безопасности данного подхода к терапии.

В геномном редактировании глобально можно выделить два подхода. Первый состоит в выключении гена, продукт которого может накапливаться и наносить вред организму, как в случае с препаратом NTLA-2001 для лечения транстиретинового амилоидоза [11], который находится на фазе 3 клинических исследований. Преимуществом данного подхода является широкое разнообразие выбора точек разреза в целевом гене, достаточно внести всего один двухцепочечный разрыв практически в любом месте кодирующей части гена, чтобы при его репарации путем негомологичного соединения концов возник сдвиг рамки считывания и, как следствие, потеря функции гена. Второй подход состоит в восстановлении утраченной геном функции и отличается большей сложностью и разнообразием вариаций исполнения в зависимости от типа патогенного генетического варианта и желаемой цели. Применительно к гену *DMD* наиболее универсальным методом является восстановление рамки считывания. Восстановить нарушенную рамку считывания также можно несколькими способами (рис. 1).

В данной работе мы сосредоточили внимание на классическом пропуске экзонов 43-55, так как данный подход позволит охватить наибольшее число потенциально подходящих для такой терапии пациентов. В большинстве работ нРНК подобраны к классической РАМ-последовательности, что значительно ограничивает выбор целевых регионов [12]. Известные в литературе нРНК, позволяющие эффективно пропустить экзон из региона 43-55, ограничены экзонами 45 и 51.

**Цель исследования:** оценка эффективности всех возможных нРНК, направленных на донорные и акцепторные сайты сплайсинга целевых экзонов.

## Методы

### Получение плазмид

Cas9-содержащие плазмиды получены в дар: (pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgeneplasmid # 48138, PubMed 24157548) и saCas9 - pX601-AAV-

CMV::NLS-SaCas9-NLS-3xHA-bGHpA;U6::BsaI-sgRNA (Addgene plasmid # 61591, PubMed 25830891) – подарок от Feng Zhang; AAV-CMV-GFP (Addgene 67634, PubMed 25798616) – подарок от Connie Cepko. Для подтверждения соответствия картам плазмиды были отсеквенированы методом длинных прочтений на платформе Oxford Nanopore с глубиной прочтения более 10 000 X.

Все специфические последовательности нРНК подобраны с использованием сервиса для дизайна нРНК в составе облачной платформы Benchling (<https://benchling.com>) с учетом предлагаемых сервисом индексов целевой и нецелевой активности и синтезированы в форме дуплексов с липкими концами, совместимыми с эндонуклеазами рестрикции. Синтез произведен компанией GenTerra (<https://www.genterra.ru>).

Для вставки целевых нРНК проводили рестрикцию плазмидных векторов, содержащих spCas9 и saCas9, с использованием эндонуклеаз рестрикции Bbs I/BstV2 I (Сибэнзим) и Bsa I/Bso31 I (Сибэнзим). Лигирование проводили с использованием Т4 ДНК лигазы (Сибэнзим). Весь объем лигазной смеси использовали для

трансформации 100 мкл компетентных E. coli (штамм XL10-Gold, AgilentTechnologies) по стандартному протоколу «теплового шока» [13]. Полученные колонии проверяли методом ПЦР, где в качестве обратного праймера использовали один из олигонуклеотидов дуплекса нРНК, а прямой праймер был комплементарен последовательности плазмиды (табл. 1). Экстракцию осуществляли с помощью набора для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток (Биолаб-микс). Наличие вставки подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру с использованием специфических праймеров (табл. 1) на генетическом анализаторе ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя.

Трансфекция HEK293T

Клетки рассеивали за сутки до трансфекции в количестве 3\*10<sup>5</sup> клеток на 1 лунку 12-луночного планшета. За два часа до трансфекции полную ростовую среду меняли на свежую среду DMEM (PanEco, 1г/мл глюкозы) без добавок. Трансфекцию проводили с использованием 3 мкг/мкл PEI MW 25000 (Polysciences, США) с последующей экспозицией в течение 3,5 ча-

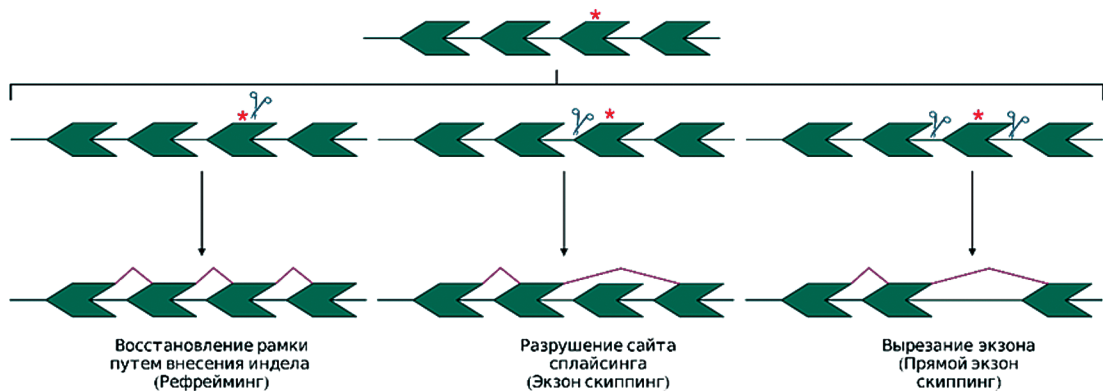


Рис. 1. Способы восстановления рамки считывания.

Fig. 1. Methods for restoring the reading frame.

Таблица 1. Праймеры для контроля клонирования направляющих РНК в акцепторные плазмиды

Table 1. Primers for control of guide RNAs cloning into acceptor plasmids

| Наименование      | Последовательность 5'->3' | Направление | Нуклеаза | Назначение                                   |
|-------------------|---------------------------|-------------|----------|----------------------------------------------|
| sa-sg-seq10F      | AGAATTCCTAGAGCTCGCTG      | Sense       | SaCas9   | Контроль колоний / секвенирование по Сэнгеру |
| sa-sg-seq10R      | CAAAATCTCGCCAACAAGTT      | Antisense   | SaCas9   | Секвенирование по Сэнгеру                    |
| u6prom-f          | GAGGGCCTATTTCCCATGATT     | Sense       | SpCas9   | Контроль колоний / секвенирование по Сэнгеру |
| scaffoldRNA-seq.r | AAGCACCGACTCGGTGCC        | Antisense   | SpCas9   | Секвенирование по Сэнгеру                    |

сов, затем среду заменяли на полную ростовую без антибиотика. Эффективность трансфекции оценивали по %GFP событий на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США) через 48 часов.

*Оценка эффективности редактирования путем анализа ДНК*

Целевые сайты амплифицировали путём стандартной ПЦР. Праймеры представлены в **табл. 2**. Ампликоны секвенировали по Сэнгеру с двух сторон. Для оценки эффективности редактирования секвенограммы анализировали на наличие коротких инсерций и делеций (инделов) с использованием программ TIDE (Tracking of Indels by Decomposition, <http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>).

**Результаты исследования и их обсуждение**

*Биоинформатический скрининг нРНК*

Ключевым ограничением при выборе локуса для редактирования ДНК является РАМ-последовательность, которая распознается нуклеазой Cas и должна находиться в трех нуклеотидах от целевого места разреза [12]. Однако при оценке нецелевых локусов редактирования было показано, что кроме классического РАМ-NGG, Cas9 способна связываться с другими РАМ-последовательностями с различной эффективностью [14,15]. На основании этих данных при выборе нРНК мы использовали РАМ-NGG, РАМ-NNG и РАМ-NGN.

Сначала нРНК были подобраны так, чтобы двухцепочечный разрыв ДНК происходил максимально близко к консенсусному сайту сплайсинга в интервале +/-3 нуклеотида от экзон-интронного соединения. В общей сложности подобраны 105 нРНК для различных РАМ-последовательностей, теоретически совместимых с spCas9. Поскольку максимальная эффективность нуклеазы наблюдается при классическом РАМ NGG, только 28 (26,7%) подобранных нРНК обладали предсказанным индексом эффективности более 30%. Аналогичный подбор был сделан для последовательности РАМ-NNGRR, совместимой с saCas9: подобраны 38 нРНК, 10 (26,3%) из которых по предсказаниям имели эффективность более 30%. При фильтрации всех нРНК по уровню эффективности не менее 40% осталось 26, направленных ко всем экзонам кроме 54. После этого все последовательности проверили на специфичность с использованием приложения Blat геномного браузера UCSC (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). Дополнительно вручную проведен поиск нРНК с небольшим удалением от консенсусных последовательностей сайтов сплайсинга, но с ужесточением требований к РАМ (только NGG для spCas9). После ещё нескольких циклов ручной проверки и отбора нРНК по принципу баланса между ожидаемой эффективностью и специфичностью разреза, а также положением предполагаемого разреза в консервативных областях мотивов сайтов сплайсинга были отобраны 25 нРНК к экзонам 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53, 54 (**табл.**

**Таблица 2.** Праймеры для оценки эффективности редактирования

**Table 2.** Primers for assessing editing efficiency

| Экзон | Прямой праймер            | Обратный праймер           | Длина<br>апликона | Положение hg38         |
|-------|---------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| 43    | CCATTTGCTACCTTTGGGATTTG   | AGCTCATTTGTCTGAATTGTTTCATC | 450               | chrX:32287800-32287351 |
| 44    | ATGTTGTGTGTACATGCTAGGTGTG | AGTTAAAGAGTCCAGATGTGCTGA   | 397               | chrX:32217249-32216853 |
| 45    | TCCTTTGGATATGGGCATGTCAG   | TGATAGGTTCTTTAATGTTAGTGCC  | 463               | chrX:31968640-31968217 |
| 46    | TGGCCAGGAATTTTGAATCAG     | CTTCTTTATGCAAGCAGGCC       | 436               | chrX:31932468-31932033 |
| 50    | GCCTGGAGAAAGGGTTTTGTATG   | ACACTCCCCATATCCCGTTGT      | 543               | chrX:31820305-31819763 |
| 51    | TGCCATCTTCCTTGATGTTGGA    | AGGCTGAATAGTGAGAGTAATGTGT  | 309               | chrX:31774120-31773812 |
| 52    | AGGCATTCAGACAGTGGTTTAAG   | CTTTGTGTGTCCCATGCTTGTTA    | 439               | chrX:31730036-31729598 |
| 53    | CCTTCAGAACCGGAGGCAAC      | CATTTTCAGCTTTAACGTGATTTTCT | 298               | chrX:31679546-31679249 |
| 54    | AAGTTTGTCTCTGAAAGGTGGGTTA | CCACCCCATTTATTACAGCCAAC    | 398               | chrX:31658336-31657939 |
| 55    | CTCCCCCATACAAACGCCT       | GCGGAAATGCCTGACTTACT       | 424               | chrX:31628077-31627654 |

3). Две из подобранных нРНК подошли одновременно для spCas9(NAG) и saCas9(NAGAA).

#### Экспериментальный скрининг нРНК

Для оценки эффективности создания двухцепочечного разрыва произведена трансфекция в культуру клеток HEK293T согласно схеме (рис. 2) в трех технических и двух биологических повторностях. Плазмида с saCas9 не содержит репортерного гена *GFP*, поэтому для оценки эффективности доставки конструкций в клетки мы использовали котрансфекцию с меньшей по размеру *GFP*-содержащей плазмидой. Плазмида с spCas9 трансфицирована индивидуально.

После трансфекции из клеток выделяли ДНК и амплифицировали места отжига нРНК. Далее с помощью программы TIDE оценивали процент инделов, образовавшихся в результате репарации двухцепочечного разрыва путем негомологичного соединения концов, который отражает эффективность редактирования. Для стандартизации результатов и сравнения эффективности процент инделов нормирован на эффективность трансфекции, разброс которой составил от 17% до 66% для spCas9 и от 75% до 96% для saCas9. Результат представ-

лен на рис. 3. Достоверно эффективными оказались шесть нРНК, направленных на сайты сплайсинга экзонов 43, 53, 54 и 55. Они могут быть подходящими для исправления более 30 типов делеций (табл. 4), 4 из которых относятся к числу наиболее частых и встречаются примерно у 10% пациентов [2]. По предварительным подсчетам имеющихся в ФГБНУ МГНЦ данных разрабатываемый подход мог быть эффективен как минимум для 8% российских больных.

Практически все отобранные нРНК имеют классические PAM-последовательности, за исключением нРНК\_55-4, которая имеет PAM-CGA. По данным литературы, PAM-NGA является второй по эффективности после NGG и достоверно эффективнее всех остальных PAM-последовательностей (NAA, NAT, NAG, NAC, NTA, NTT, NTG, NTC, NGT, NGC, NCA, NCT, NCG, NCC) [16].

Для визуализации вносимых изменений и оценки возможных эффектов на пропуск экзона сиквенограммы мест посадки отобранных нРНК дополнительно были проанализированы в DECODRv3.0. Однонуклеотидные делеции и вставки происходили в равной степени, реже наблюдаются более крупные делеции, как например делеция 10 п.н. в нРНК\_43-2 и 4 п.н. в

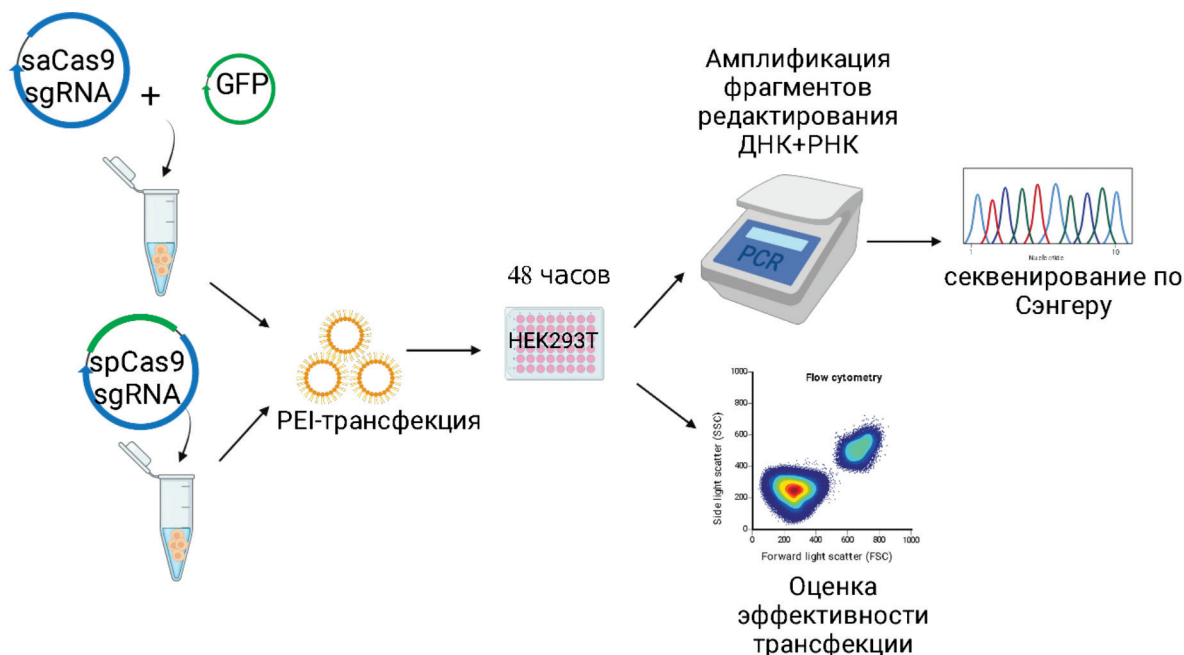


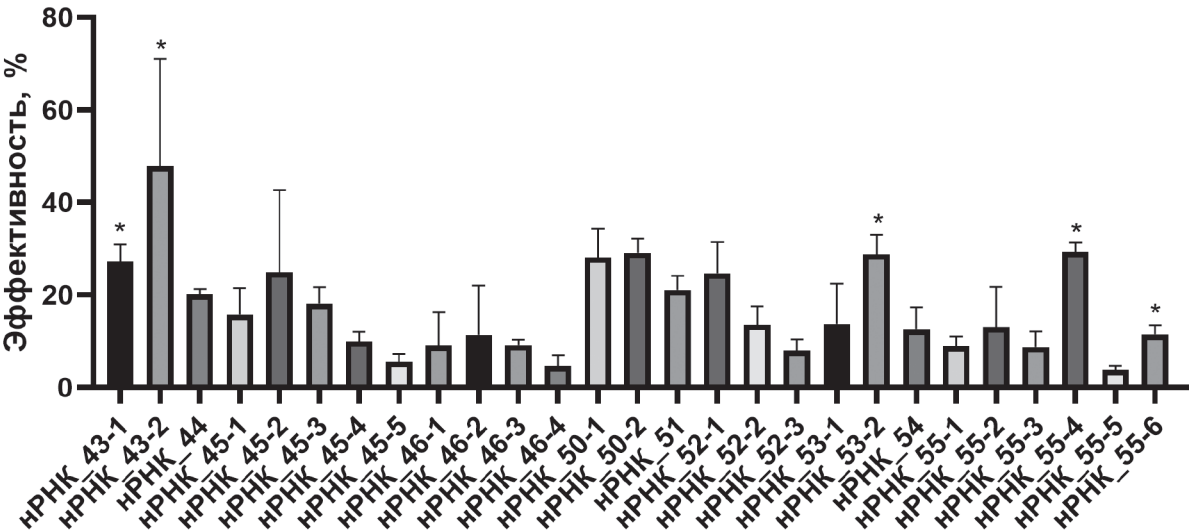
Рис. 2. Схема эксперимента по трансфекции нРНК в HEK293T

Fig. 2. Schema of the gRNA transfection experiment in HEK293T

нРНК\_55-6. Все отобранные нРНК создают двухцепочечный разрез в экзоне. Вероятнее всего это обусловлено высокой консервативностью интронной части сайта сплайсинга и, соответственно, её похожестью во всех генах [17], что делает эти регионы малопривлекательными для геномного редактирования. В противоположность этому экзоны отличаются своей уникальностью и обогащены регуляторными последовательностями энхансеров сплайсинга (ESE), которые отвечают за правильное распознавание сплайсосома и включение экзона в зрелую мРНК [18]. Наибольшее количество ESE находится в области экзон-интронного соединения. Ещё одним плюсом создания индела в экзоне, а именно в его 5'-конце, является дополнительный эффект рефрейминга (рис. 1). Так как варианты сай-

тов сплайсинга редко приводят к стопроцентному экзон-скиппингу [19], сдвиг рамки считывания в начале экзона может оказывать дополнительный терапевтический эффект, восстанавливая рамку считывания, нарушенную делецией предыдущего экзона [20].

Однако успешное внесение инделов в целевой регион не гарантирует пропуска экзона на уровне РНК. Для оценки терапевтической эффективности отобранных конструкций необходима проверка их в клетках с высоким уровнем экспрессии полноразмерного дистрофина, например, в миобластах. Целью следующей работы является получение клеточных культур от доноров с мышечной дистрофией Дюшенна и оценка уровня восстановления экспрессии дистрофина после трансфекции.



**Рис. 3.** Гистограмма эффективности редактирования. Звездочками помечены столбцы со статистически достоверными значениями по данным TIDE ( $p < 0.001$ , рассчитывается автоматически внутренним программным обеспечением).

**Fig. 3.** Histogram of editing efficiency. Columns with statistically significant values according to TIDE data ( $p < 0.001$ , calculated automatically by internal software) are marked with asterisks.

**Таблица 4.** Экспериментально отобранные нРНК. Наиболее частые делеции отмечены жирным шрифтом.

**Table 4.** Experimentally selected gRNAs. The most frequent deletions are marked in bold.

| Направляющая РНК | Эффективность редактирования (%) | Подходящие для редактирования делеции                                                                                 |
|------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| нРНК_43-1        | 27,1 (±4,3)                      | <b>44</b> , 44-47, 44-48, 44-49, 44-51, 44-53, 44-55                                                                  |
| нРНК_43-2        | 47,9 (±26,6)                     | <b>44</b> , 44-47, 44-48, 44-49, 44-51, 44-53, 44-55                                                                  |
| нРНК_53-2        | 28,8 (±4,9)                      | <b>52</b> , 50-52, <b>49-52</b> , <b>48-52</b> , 47-52, 45-52, 43-52, 42-52, 41-52, 40-52, 39-52, 38-52, 37-52. 36-52 |
| нРНК_54          | 12,6 (±5,5)                      | 55, 55-57, 55-59, 55-60, 55-67                                                                                        |
| нРНК_55-4        | 29,3 (±2,3)                      | 54, 52-54, 50-54, 49-54, 48-54, 47-54, 45-54, 43-54                                                                   |
| нРНК_55-6        | 11,5 (±2,4)                      | 54, 52-54, 50-54, 49-54, 48-54, 47-54, 45-54, 43-54                                                                   |

## Закключение

Таким образом, в данной работе проведен скрининг всех нРНК, направленных на сайты сплайсинга экзонов 43–55 гена *DMD*, из них отобраны 6 лучших, позволяющих продолжить разработку терапии для более тридцати вариантов делеций. Показана возможность увеличения количества целевых локусов редактирования ДНК за счет дополнительной РАМ-последовательности NGA, что значительно расширяет возможности применения технологии геномного редактирования.

## Литература/References

1. Duan D., Goemans N., Takeda S. et al. Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Rev. Dis. Prim. England*. 2021; 7(1): 13.
2. Bladen C.L., Salgado D., Monges S. et al. The TREAT-NMD DMD global database: Analysis of more than 7,000 duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* 2015;36(4):395–402.
3. Straub V., Guglieri M. An update on Becker muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol. England*. 2023; 36(5): 450–454.
4. Chancellor D., Barrett D., Nguyen-Jatkoe L. et al. The state of cell and gene therapy in 2023. *Mol. Ther.* 2023; 31(12):3376–3388.
5. Hoy S.M. Delandistrogene Moxeparvovec: First Approval. *Drugs. New Zealand*. 2023; 83(14):1323–1329.
6. Monjaret F., Bourg N., Suel, L. et al. Cis-splicing and translation of the pre-trans-splicing molecule combine with efficiency in spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol. Ther.* 2014; 22(6):1176–1187.
7. Barthélémy F., Wein N., Krahn M. et al. Translational research and therapeutic perspectives in dysferlinopathies. *Mol. Med.* 2011; 17(9–10):875–882.
8. Athanasopoulos T., Munye M.M., Yáñez-Muñoz R.J. Non-integrating Gene Therapy Vectors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017; 31(5):753–770.
9. Izumi R., Takahashi T., Suzuki N. et al. The genetic profile of dysferlinopathy in a cohort of 209 cases: Genotype–phenotype relationship and a hotspot on the inner DysF domain. *Hum. Mutat.* 2020; 41(9):1540–1554.
10. Pierce E.A., Aleman T.S., Jayasundera K.T. et al. Gene Editing for CEP290-Associated Retinal Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2024; 390(21):1972–1984.
11. Gillmore J.D., Gane E., Taubel J. et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 2021; 385(6):493–502.
12. Hu J.H., Miller S.M., Geurts M.H. et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*. 2018; 556(7699): 57–63.
13. Sambrook J., Russell D.W. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride. *CSH Protoc. United States*. 2006 Jun 1;2006(1):pdb.prot3932. doi: 10.1101/pdb.prot3932.
14. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A. et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol. United States*. 2013; 31(9): 827–832.
15. Doench J.G., Fusi N., Sullender M. et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol. United States*. 2016; 34(2): 184–191.
16. Zhang Y., Ge X., Yang F. et al. Comparison of non-canonical PAMs for CRISPR/Cas9-mediated DNA cleavage in human cells. *Sci. ReC.* 2014; 4: 1–5.
17. Wachutka L., Caizzi L., Gagneur J. et al. Global donor and acceptor splicing site kinetics in human cells. *Elife*. 2019; 8: 1–52.
18. Amoasii L., Long C., Li H. et al. Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 2017; 9(418):eaan8081.
19. Kondratyeva E., Bukharova T., Efremova A. et al. Health Characteristics of Patients with Cystic Fibrosis whose Genotype Includes a Variant of the Nucleotide Sequence c.3140-16T>A and Functional Analysis of this Variant. *Genes (Basel)*. 2021;12(6): 837.
20. Min Y.L., Chemello F., Li H. et al. Correction of Three Prominent Mutations in Mouse and Human Models of Duchenne Muscular Dystrophy by Single-Cut Genome Editing. *Mol. Ther.* 2020;28(9):2044–2055.