

Факторы, влияющие на эффективность CRISPR/Cas9 для коррекции мутации F508del при муковисцидозе

Смирнихина С.А.^{1*}, Банников А.В.¹, Анучина А.А.¹,
Кочергин-Никитский К.С.^{1,2}, Адильгереева Э.П.¹, Лавров А.В.^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»

² Московский физико-технический институт (государственный университет)

³ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

* для корреспонденции: smirnikhinas@gmail.com

Симптоматическое и патогенетическое лечение муковисцидоза позволило увеличить продолжительность жизни пациентов до 30 лет, однако заболевание до сих пор остается неизлечимым. Технологии генной терапии, основанные на использовании специфических нуклеаз, открывают новые возможности в разработке этиотропной терапии наследственных заболеваний. Наиболее широко используемым методом геномного редактирования является CRISPR/Cas9. Цель работы: сравнение эффективности редактирования гена *CFTR* с использованием разных направляющих РНК (sgRNA), подобранных для коррекции мутации F508del, и повышение их активности. В работе использовали модифицированную spCas9 (eSpCas9) и две sgRNA, подобранные на последовательность гена *CFTR*: sgCFTR#1 — непосредственно на мутацию F508del, sgCFTR#2 — за 14 нуклеотидов от мутации в 5'-области. В качестве контроля работы нуклеазы использовали sgGFP, подобранную на последовательность гена *GFP*. Матрицей для sgCFTR#1 и #2 выступала плазмида pGEM-TA-CFTR с частью гена *CFTR* с мутацией F508del, ко-трансфицированная с плазмидой для CRISPR/Cas9, для sgGFP — плазмида pEGFP-C1. На культуре HEK293T показано, что sgCFTR#1 имеет наименьшую эффективность среди используемых sgRNA — количество инсерций/делеций (инделов) при T7E1 анализе составило 6,37–20,82%; уровень экспрессии sgCFTR#1 после трансфекции ниже, чем sgGFP, продемонстрировавшей наибольшую активность — до 65% инделов. Добавление G-квадруплексов в последовательность sgCFTR#1 и sgGFP для повышения их стабильности привело к уменьшению их экспрессии и активности. Культивирование трансфицированных клеток при более низкой температуре (24 часа при 37°C, затем 48 часов при 30°C) привело к двукратному снижению активности sgCFTR#1, не изменив при этом активность sgGFP. Таким образом, в работе получена прямая взаимосвязь между экспрессией направляющей РНК и ее активностью, однако экспрессию sgCFTR#1 и эффективность ее работы повысить не удалось. Необходимо предпринимать дальнейшие попытки усиления экспрессии sgCFTR#1 и ее стабилизации, либо использовать другие Cas9, расширяющие возможности подбора направляющих РНК на мутацию F508del.

Ключевые слова: муковисцидоз, CRISPR/Cas9, экспрессия sgRNA, CFTR, G-квадруплекс.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование частично выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-75-20095).

Influencing factors for CRISPR/Cas9 efficacy for F508del mutation editing in cystic fibrosis

Smirnikhina S.A.^{1*}, Bannikov A.V.¹, Anuchina A.A.¹,
Kochergin-Nikitsky K.S.^{1,2}, Adilgereeva E.P.¹, Lavrov A.V.^{1,3}

¹ Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»

² Moscow Institute of Physics and Technology

³ The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov

* corresponding author: smirnikhinas@gmail.com

Symptomatic and pathogenetic treatment of cystic fibrosis allowed to increase patients' lifespan up to 30 years, but disease is still incurable. New gene therapy technologies based on the use of specific nucleases open up new opportunities in development of etiology-based therapy for hereditary diseases. Among these methods CRISPR/Cas9 is the most widely used approach for genome editing. The aim of the study is to compare correction efficacy of *CFTR* gene by Cas9 with different guide RNAs (sgRNAs), designed to F508del mutation, and to increase their activity. We used modified spCas9 (eSpCas9) and two sgRNAs designed to *CFTR* gene: sgCFTR#1 — directly to the F508del mutation and sgCFTR#2 — 14 nucleotides 5'-upstream from the mutation. SgGFP designed to *GFP* gene was used as a control of the nuclease activity. pGEM-TA-CFTR plasmid with part of the *CFTR* gene with the F508del mutation co-transfected with the plasmid for CRISPR/Cas9 was used as template for sgCFTR#1 and #2; plasmid pEGFP-C1 was used as template for sgGFP. Experiments performed in HEK293T cell culture demonstrated, that sgCFTR#1 has the lowest efficiency among used sgRNAs — number of insertions/deletions (indels) by T7E1 assay was 6.37–20.82%. Expression level of sgCFTR#1 after transfection was lower than expression of sgGFP, which showed the greatest activity — up to 65% of indels. Addition of

G-quadruplexes to sgCFTR#1 and sgGFP sequences with the aim to increase their stability led to decrease of expression and activity. Culturing transfected cells at lower temperature (24 hours at 37°C, then 48 hours at 30°C) resulted in two-fold decrease of sgCFTR#1 activity, but without affecting sgGFP activity. Thus, direct relationship between sgRNAs expression and their activity was confirmed in the study; however, sgCFTR#1 expression and its efficacy could not be increased. Further attempts to enhance sgCFTR#1 expression and its stabilization should be performed, or other Cas9 enzymes, which expand the ability to select sgRNA direct to F508del mutation can be potentially used.

Key words: cystic fibrosis, CRISPR/Cas9, sgRNA expression, CFTR, G-quadruplex.

Введение

Муковисцидоз (МВ, OMIM#219700) — одно из самых частых и тяжелых наследственных заболеваний у человека. Несмотря на существенные успехи, достигнутые в его лечении [1–3], МВ остается неизлечимой болезнью с предсказанной медианой продолжительности жизни 41,7 года и медианой возраста смерти 30 лет [4]. Молекулярной причиной заболевания являются мутации в гене *CFTR*, кодирующем трансмембранный натрий-хлорный ионный канал [5]. Наиболее частой мутацией среди европейцев является F508del, приводящая к утрате фенилаланина в первичной аминокислотной последовательности, что ведет к нарушению созревания белка CFTR и его полному отсутствию на поверхности клеток [6]. Благодаря широкому внедрению методов геномного редактирования в лабораторную практику потенциально появилась возможность коррекции большинства мутаций у человека, в том числе и F508del [7–11]. Первые попытки исправления мутации F508del с использованием нуклеаз цинковых пальцев [9, 12–13], нуклеаз TALEN [10, 14] и CRISPR/Cas9 [8, 11, 15] демонстрируют возможность успешного редактирования, однако их невысокая эффективность не позволяет использовать их в клинике, что делает крайне актуальной задачей поиск и развитие новых подходов к коррекции F508del.

Метод геномного редактирования CRISPR/Cas9 чрезвычайно популярен в силу простоты использования, легкости дизайна системы целевой коррекции и достаточно высокой эффективности [7]. CRISPR/Cas9 состоит из двух обязательных компонентов: единой направляющей РНК (sgRNA), необходимой для распознавания и связывания с целевой последовательностью ДНК, и нуклеазы Cas9, способной создать двуцепочечный разрыв (ДЦР) ДНК в месте связывания sgRNA с ДНК. При наличии донорной ДНК репарация ДЦР осуществляется путем направленной гомологичной репарации или негомологичного соединения концов (НГСК), при отсутствии — только путем НГСК [16]. Основным недостатком CRISPR/Cas9 является неспецифическая активность, обусловленная наличием псевдогенов и высокогомологичных участков в геноме, а также небольшой длиной sgRNA [7]. Существует несколько стратегий по уменьшению нецелевой активности CRISPR/Cas9 [17], одной из которых является внесение мутаций в Cas9, приводящих к снижению связывания нуклеазы с нецелевой последовательностью ДНК за счет нейтрализации положительно заряженных оснований [18, 19].

Для разработки эффективного способа коррекции мутации F508del мы выбрали несколько направляющих РНК на место вокруг мутации и использовали модифицированную нуклеазу eSpCas9, показавшую сходную с диким типом SpCas9 целевую, но значительно сниженную нецелевую активность [18]. Целью данной работы было сравнение эффективности редактирования *CFTR* с использованием разных sgRNA, подобранных для коррекции мутации F508del, и повышение их активности.

Материалы и методы

Клонирование плазмид. Исходная плазида для CRISPR/Cas9 eSpCas9(1.1) была подарена Feng Zhang (Addgene #71814). Направляющие РНК (sgRNA) для SpCas9 были подобраны с использованием свободного программного обеспечения, разработанного Broad Institute (США) (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>). Плазида была рестрицирована *BbsI* (СибЭнзим, Россия) и использована в реакции лигирования как вектор для клонирования последовательности, кодирующей направляющую РНК (ДНК-Синтез или Евроген, Россия). С применением реакций гибридизации и лигирования были получены следующие плазмиды: spCas9-sgCFTR#1, spCas9-sgCFTR#2, spCas9-sgGFP, spCas9-sgCFTR#1quad и spCas9-sgGFPquad.

Клеточная культура и трансфекция. Клеточную культуру НЕК293Т (любезно предоставленную к.б.н. М.Ю. Скобловым из лаборатории функциональной геномики ФГБНУ «МГНЦ») культивировали в DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (PAA Laboratories GmbH, Австрия), 100U/мл/100мкг/мл пенициллин/стрептомицина и 4 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). Кальций-фосфатную трансфекцию клеток НЕК293Т проводили в 12-луночных планшетах при 50% конфлюентности, как описано ранее [20], суммарное количество плазмид на лунку 1,5 или 5,5 мкг (при ко-трансфекции 1 или 5 мкг плазмиды с Cas9 и sgRNA и 0,5 мкг целевой плазмиды). Через 6 часов после трансфекции среду меняли на полную ростовую, содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки. В качестве репортерной плазмиды использовали pEGFP-C1 (Clontech, США). Количество флуоресцентных клеток оценивали через 48–72 часа после трансфекции на проточном цитометре (Flowmax, Partec, Германия). Фотографирование клеток проводили на микроскопе Axio Vert.A1 (Zeiss, Германия).

Выделение ДНК и РНК. Выделение ДНК проводили с использованием набора Genomic DNA-Tissue MiniPrep (ZymoResearch, США), согласно протоколу производителя. РНК выделяли стандартным фенол-хлороформным методом.

Оценка экспрессии. Синтез кДНК проводили с помощью М-MuLV (Альфа-фермент, Россия). Для оценки экспрессии в реакционную смесь (25 мкл), содержащую 500 нМ праймеров, 200 мкМ дНТФ, 3 мкМ Mg²⁺, 0,1xSYBR Green I (Invitrogene, США) и 0,04 Ед. Таq-полимеразы, вносили по 5 мкл ДНК. ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Условия реакции: 95°C — 2 мин, 45x(95°C — 30 с, 60°C — 30 с, 72°C — 30 с). Использовали праймеры для sgRNA (F — 5'-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGC-3', R — 5'-CCAACGCGTTGGATGCATAGCTT-3'), гена *B2M* (F — 5'-CTGCCGTGTGAACCATGTGA-3', R — 5'-CAATCCAAATGCGGCATCTTC-3') и плазмиды spCas9 (F — 5'-TGGACTATCATATGCTTACCG-3', R — 5'-CGCGCTAAAACGGACSTA-3'). Нормализацию экспрессии sgRNA проводили на ген *B2M* и плазмиду spCas9.

T7E1 анализ. Для проведения T7E1 анализа проводили амплификацию интересующего локуса: фрагмент гена *CFTR* (5'-ACGACTCACTATAGGGCGAATTGGG-3', 5'-TGATCCATTCACAGTAGCTTACCC-3') или ген *GFP* (5'-AAAAGTGTGGGGAGGCATGGTGAGCAAGGCGAG-3', 5'-AAAGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3') в 50 мкл ПЦР-смеси, содержащей 500 нМ праймеров, 200 мкМ дНТФ, 3 мкМ Mg²⁺, и 0,04 Ед. Таq-полимеразы. Далее ПЦР-продукт очищали фенол-хлороформом, ресуспендировали в 15 мкл 1x NEB buffer 2, проводили денатурацию ампликонов при 95°C — 2,5 мин, затем быструю ренатурацию, снижая температуру на 1°C каждые 10 с (до 85°C), затем медленную ренатурацию охлаждением до комнатной температуры. Ренатурированные ампликоны подвергали рестрикции в 10 мкл с 5 ед. T7E1 нуклеазы в течение 40 мин при 37°C. Далее проводили электрофорез в 1,8% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Эффективность редактирования рассчитывалась с использованием ImageJ по формуле $E = (b+c)/(a+b+c) \times 100$, где a — яркость полосы, соответствующей исходному ампликону, b и c — яркость полос, соответствующих фрагментам рестрикции.

Результаты

Были подобраны две направляющие РНК (sgRNA) для spCas9 на последовательность экзона 10 гена *CFTR* в месте мутации F508del (рис. 1). При этом РАМ последовательность для sgCFTR#1 появлялась только при наличии мутации F508del, то есть нуклеаза Cas9 могла производить ДЦР только в случае мутации. Вторая sgRNA — sgCFTR#2 — подобрана на последовательность ДНК рядом с мутацией, и с ее помощью можно редактировать как последовательность с мутацией, так и дикий тип. Соответственно были получены 2 плазмиды: spCas9-sgCFTR#1 и spCas9-sgCFTR#2.

Эффективность CRISPR/Cas9 с подобранными sgRNA оценивали по доле вставок/делений (инделов) в целевом локусе в клеточной культуре НЕК293Т. Так как в НЕК293Т отсутствует мутация F508del, то в работе проводили ко-трансфекцию плазмид spCas9-sgCFTR#1 или spCas9-sgCFTR#2 с плазмидой pGEM-TA-CFTR, содержащей в себе часть гена *CFTR* с мутацией. Процент инделов, образующихся в плазмиде pGEM-TA-CFTR, оценивали через 48–72 часа после ко-трансфекции, путем T7E1 анализа. Кроме того, в работе в качестве положительного контроля редактирования использовали направляющую РНК, подобранную на ген *GFP* (плазмида spCas9-sgGFP), которую ко-трансфицировали с плазмидой pEGFP-C1. В серии экспериментов было показано, что наиболее эффективной sgRNA является sgGFP, приводящая к образованию инделов в 60,6–64,7% случаев (рис. 2). SgCFTR#1 показала наименьшую эффективность, приводя к образованию инделов в 6,37–20,82%. Использование разного количества плазмид с Cas9 и sgRNA в трансфекции позволило незначительно увеличить процент редактирования локуса *CFTR*, поэтому все дальнейшие эксперименты проводили с использованием 5 мкг плазмиды на 200 тысяч клеток.

Несмотря на довольно эффективное редактирование локуса *CFTR* с помощью spCas9-sgCFTR#2, при разработке геномного редактирования мутации F508del оптимально использовать специфическую sgRNA, связывающуюся только с мутированным локусом, поэтому в работе были предприняты попытки увеличения эффективности работы sgCFTR#1, подобранной на мутацию F508del.

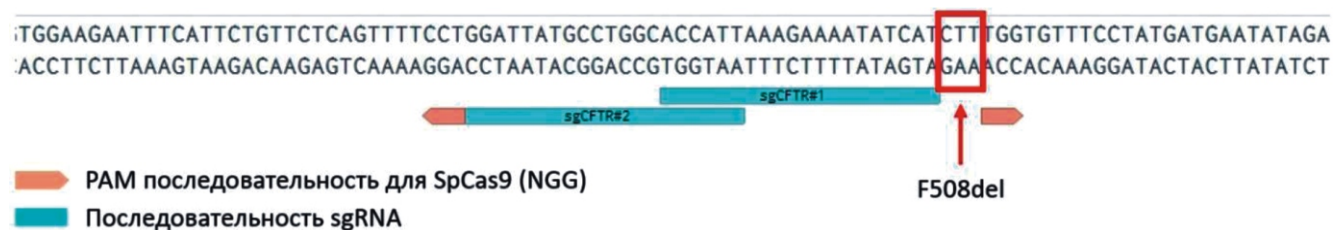


Рис. 1. Фрагмент 10 экзона гена *CFTR* с подобранными sgRNA.

Известно, что различные sgRNA обладают разной эффективностью и природа этого феномена до конца не изучена [21–23]. Одним из известных лимитирующих факторов эффективности CRISPR/Cas9 является уровень экспрессии sgRNA. Методом количественной ПЦР мы измерили уровень экспрессии sgCFTR#1 и sgGFP (рис. 3) на разных сроках после трансфекции. Как видно из рис. 3, направляющие РНК имеют разную динамику экспрессии. Сразу после трансфекции (0 и 7 часов) уровни экспрессии обеих РНК низкие и не различаются между собой, но через 24 часа после трансфекции уровень экспрессии sgGFP почти в 15 раз выше, чем sgCFTR#1; через 30 часов после трансфекции — в 22 раза выше. При этом уровни экспрессии sgCFTR#1 через 30 часов и sgGFP через 24 часа практически не отличаются, что может говорить о том, что экспрессия sgCFTR#1 с течением времени после трансфекции увеличивается медленнее, чем экспрессия sgGFP.

Так как промотор у обеих направляющих РНК одинаковый — U6, транскрипция обеих sgRNA должна быть одинаковой. Разный уровень экспрессии может быть обусловлен более быстрой деградацией sgCFTR#1 по сравнению с sgGFP. В дальнейшей работе мы попытались повысить стабильность sgCFTR#1. В исследовании по скринингу большого числа направляющих РНК, проведенном Moreno-Mateos с соавт., показано, что sgRNA, имеющие в своем составе гуанидин-богатые участки (более 8 оснований), более стабильны из-за формирования G-квадруплексов [21]. Мы добавили последовательность CACCGGGAGGGCGGGGAGGG к последовательностям sgCFTR#1 и sgGFP с 5'-конца, чтобы создать условия для образования G-квадруплекса, — sgCFTR#1quad и sgGFPquad соответственно. Результаты анализа гетеродуплексов показали, что эффективность разрезания целевой ДНК с использованием измененных направляющих РНК снизилась (рис. 4).

Также мы измерили экспрессию всех используемых в этом эксперименте sgRNA через 48 часов после трансфекции и обнаружили снижение экспрессии направляющих РНК с G-квадруплексами по сравнению с исходной sgRNA (рис. 5). Таким образом, эффективность разрезания целевой ДНК хорошо коррелирует с уровнем экспрессии используемой sgRNA — чем выше экспрессия, тем выше процент редактирования. G-квадруплексы приводят к снижению уровня экспрессии sgRNA.

Также мы попытались увеличить эффективность редактирования, культивируя клетки при более низкой температуре. В ряде работ показано увеличение эффективности геномного редактирования в отношении нескольких генов, включая *CFTR*, с использованием нуклеаз цинковых пальцев при временном культивировании трансфицированных клеток при 30°C [9, 24]. Основной предполагаемый механизм — стабилизация нуклеазы. Мы культивировали трансфицированные клетки 24 часа при 37°C, после чего понижали температуру до 30°C на 48 часов. Оценку геномного редактиро-

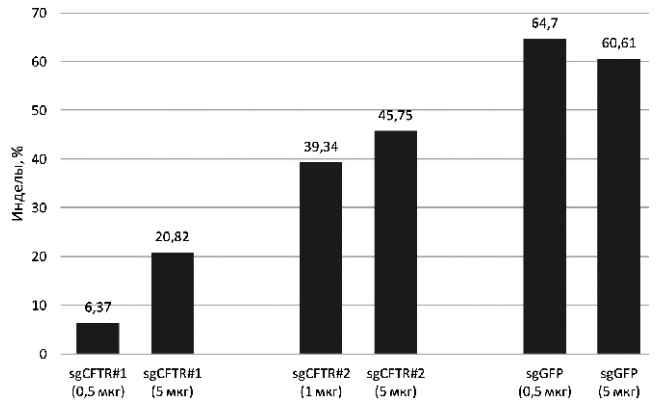


Рис. 2. Сравнение эффективности работы spCas9(1.1) с разными направляющими РНК. Данные приведены как среднее.

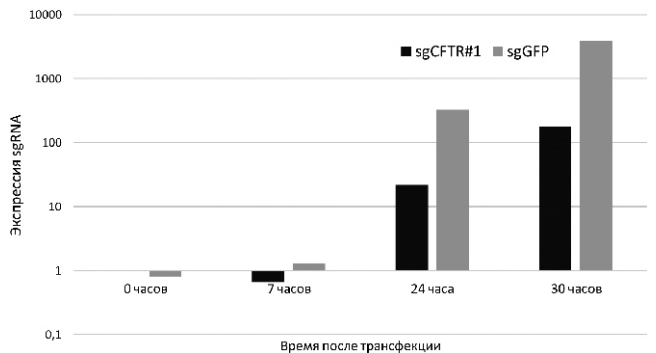


Рис. 3. Экспрессия sgRNA в разные промежутки времени после трансфекции. Данные приведены как среднее.

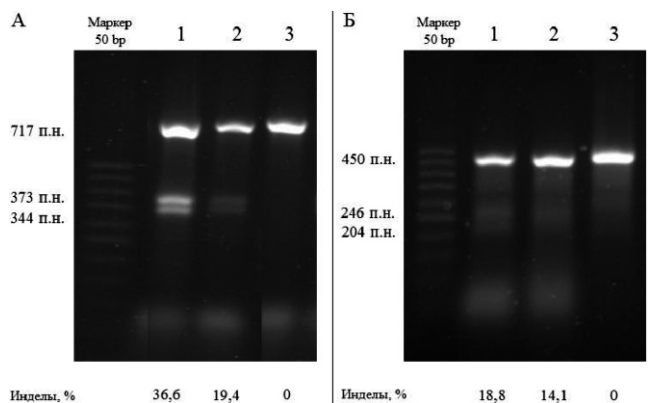


Рис. 4. Эффективность разрезания ДНК с использованием sgRNA с G-квадруплексами. А — электрофореграмма T7E1 анализа с результатами редактирования плазмиды pEGFP-C1. 1 — sgGFP, 2 — sgGFPquad, 3 — отрицательный контроль. Б — электрофореграмма T7E1 анализа с результатами редактирования плазмиды pGEM-TA-CFTR. 1 — sgCFTR#1, 2 — sgCFTR#1quad, 3 — отрицательный контроль.

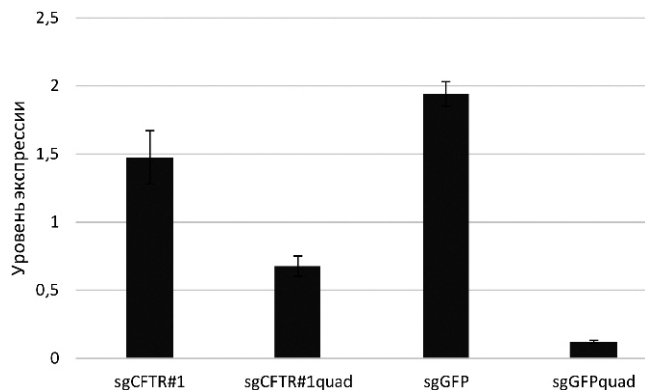


Рис. 5. Экспрессия sgRNA в клетках культуры HEK293T через 48 часов после трансфекции. Данные приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

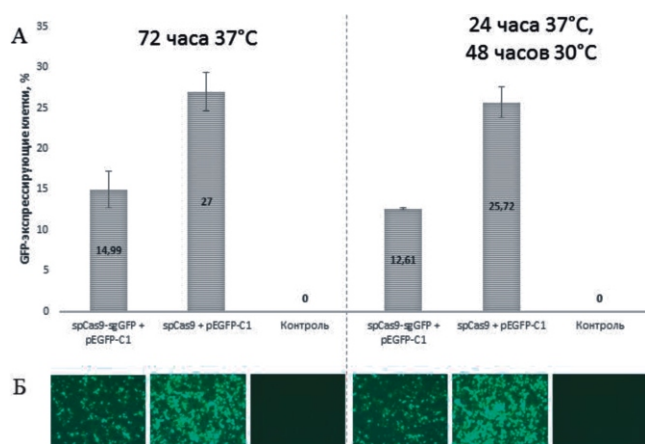


Рис. 6. Сравнение эффективности редактирования EGFP при разных условиях культивирования трансфицированных клеток HEK293T. А — доля флуоресцентных (GFP-положительных) клеток. Данные приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Б — GFP флуоресценция клеток, увеличение $\times 100$.

вания проводили через 72 часа после трансфекции. Кроме того, параллельно использовали плазмиды с sgCFTR#1 (+ pGEM-TA-CFTR) и sgGFP (+pEGFP-C1). На рис. 6 показано снижение доли флуоресцентных (GFP-положительных) клеток при добавлении плазмиды с sgGFP по сравнению с клетками, в которые не до-

бавляли эту направляющую РНК. Разницы в эффективности редактирования в зависимости от температуры культивирования не отмечено. При редактировании CFTR отмечено двукратное снижение эффективности редактирования при культивировании клеток при 30°C (таблица).

Заключение

В работе проанализировали эффективность геномного редактирования локуса CFTR, содержащего мутацию F508del. Направляющая РНК, подобранная непосредственно на мутацию, показала значительно меньшую активность, по сравнению с той, что подобрана в 5'-области от мутации. В работе было обнаружено, что низкая активность sgRNA коррелирует с ее низкой экспрессией. Попытки стабилизировать sgRNA путем добавления в нее G-квадруплексов не увенчались успехом. Культивирование трансфицированных клеток при более низкой температуре также не дало положительного результата в повышении эффективности геномного редактирования. Необходимо предпринимать дальнейшие попытки усиления экспрессии sgCFTR#1 и ее стабилизации, либо использовать другие Cas9, например, saCas9, с другими РАМ-последовательностями, расширяющими возможности подбора направляющих РНК на мутацию F508del.

Список литературы

- Nazareth D., Walshaw M. Coming of age in cystic fibrosis — transition from paediatric to adult care. Clin Med. 2013;13: 482-486.
- Whiting P, Al M, Burgers L, et al. Ivacaftor for the treatment of patients with cystic fibrosis and the G551D mutation: a systematic review and cost-effectiveness analysis. Health Technol Assess. 2014 Mar;18(18):1-106.
- Cholon DM, Esther CR Jr, Gentzsch M. Efficacy of lumacaftor-ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis patients homozygous for the F508del-CFTR mutation. Expert Rev Precis Med Drug Dev. 2016;1(3):235-243.
- Cystic Fibrosis Foundation. Patient registry annual data report (цитирование от 31 августа 2017). 2015. Доступно по ссылке: <http://www.cff.org/LivingWithCF/QualityImprovement/PatientRegistryReport>.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science. 1989 Sep 8;245(4922):1073-1080.

Таблица

Сравнение эффективности редактирования гена CFTR при разных условиях культивирования трансфицированных клеток HEK293T

Условия культивирования	Трансфицированные плазмиды	Инделы (среднее), %
72 часа 37°C	spCas9-sgCFTR#1 + pGEM-TA-CFTR	24,66
	pGEM-TA-CFTR	0
24 часа 37°C, 48 часов 30°C	spCas9-sgCFTR#1 + pGEM-TA-CFTR	12,66
	pGEM-TA-CFTR	0

6. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med.* 2015;277:155-166.
7. Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet.* 2014 Sep 15;23(R1):R40-46.
8. Firth AL, Menon T, Parker GS, et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep.* 2015 Sep 1;12(9):1385-90.
9. Lee CM, Flynn R, Hollywood JA, et al. Correction of the Δ F508 Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair. *BioResearch Open Access.* 2012;1(3):99-108.
10. Suzuki S, Sargent RG, Illek B, et al. TALENs Facilitate Single-step Seamless SDF Correction of F508del CFTR in Airway Epithelial Submucosal Gland Cell-derived CF-iPSCs. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2016 Jan 5;5:e273.
11. Hollywood JA, Lee CM, Scallan MF, Harrison PT. Analysis of gene repair tracts from Cas9/gRNA double-stranded breaks in the human CFTR gene. *Sci Rep.* 2016 Aug 25;6:32230.
12. Crane AM, Kramer P, Bui JH, et al. Targeted correction and restored function of the CFTR gene in cystic fibrosis induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* 2015 Apr 14;4(4):569-577.
13. Bednarski C, Tomczak K, Vom Huvel B, et al. Targeted Integration of a Super-Exon into the CFTR Locus Leads to Functional Correction of a Cystic Fibrosis Cell Line Model. *PLoS One.* 2016 Aug 15;11(8):e0161072.
14. Camarasa MV, Galvez VM. Robust method for TALEN-edited correction of pF508del in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Feb 9;7:26.
15. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell.* 2013 Dec 5;13(6):653-658.
16. Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013 Nov;8(11):2281-2308.
17. Смирнихина С.А., Лавров А.В. Генная терапия наследственных заболеваний с помощью технологии CRISPR/Cas9 in vivo. *Медицинская генетика.* 2016;15(9):3-11.
18. Smirnikhina S.A., Lavrov A.V. Gennaya terapiya nasledstvennykh zabolevaniy s pomoshch'yu tekhnologii CRISPR/Cas9 in vivo. *Meditsinskaya genetika.* 2016;15(9):3-11.
19. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* 2016 Jan 1;351(6268):84-88.
20. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;529:490-495.
21. Смирнихина С.А., Банников А.В., Лавров А.В. Оптимизация условий трансфекции клеточной культуры CFTE290- для разработки редактирования мутации F508del в гене CFTR. *Медицинская генетика.* 2016;15(8):36-39.
22. Smirnikhina S.A., Bannikov A.V., Lavrov A.V. Optimizatsiya usloviy transfeksii kletochnoy kul'tury CFTE290- dlya razrabotki redaktirovaniya mutatsii F508del v gene CFTR. *Meditsinskaya genetika.* 2016;15(8):36-39.
23. Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods.* 2015 Oct;12(10):982-988.
24. Zhang JP, Li XL, Neises A, et al. Different Effects of sgRNA Length on CRISPR-mediated Gene Knockout Efficiency. *Sci Rep.* 2016 Jun 24;6:28566.
25. Miyaoka Y, Berman JR, Cooper SB, et al. Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing. *Sci Rep.* 2016 Mar 31;6:23549.
26. Doyon Y, Choi VM, Xia DF, et al. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nat Methods.* 2010 Jun;7(6):459-460.