© Коллектив авторов, 2020
УДК 57.085.23
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15038>
ISSN – 2073-8137

МОДЕЛИРОВАНИЕ МУКОВИСЦИДОЗА В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ HEK293T И РАЗРАБОТКА СПОСОБА КОРРЕКЦИИ МУТАЦИИ F508del

С. А. Смирнихина, Е. В. Кондратьева, А. А. Анучина, М. И. Зайнитдинова, А. В. Лавров

Медико-генетический научный центр им. академика Н. П. Бочкова,
Москва, Российская Федерация

MODELING OF CYSTIC FIBROSIS IN HEK293T CELL CULTURE AND DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE CORRECTION OF F508del MUTATION

Smirnikhina S. A., Kondratyeva E. V., Anuchina A. A., Zaynitdinova M. I., Lavrov A. V.

Research Centre for Medical Genetics,
Moscow, Russian Federation

Проводилось изучение возможности моделирования муковисцидоза в клеточной культуре HEK293T и коррекция мутации F508del с помощью метода CRISPR/Cas9. Протестированы четыре направляющие РНК в комбинации с тремя нуклеазами Cas9 и двумя матрицами для репарации ДНК. Моделирование муковисцидоза в клеточной культуре HEK293T достигли благодаря трансфекции в клетки дополнительной плазмиды pGEM-CFTR, содержащей locus *CFTR* с мутацией F508del, на которой оценивали эффективность редактирования с помощью глубокого таргетного секвенирования. Эффективность редактирования локуса *CFTR* составила 5,5 %. Частота коррекции мутации варьировала от 0,08 % до 0,7 % аллелей, в зависимости от используемой комбинации компонентов CRISPR/Cas9. Точность разных комбинаций Cas9/sgRNA варьировала от 61,4 % до 90,9 %, максимальный показатель зарегистрирован для saCas9/saCFTR#3. В работе продемонстрирована возможность моделирования муковисцидоза в клеточной культуре HEK293T с помощью синтетической плазмиды и оценена эффективность коррекции мутации F508del с использованием различных комбинаций CRISPR/Cas9.

Ключевые слова: муковисцидоз, *CFTR*, геномное редактирование, CRISPR/Cas9, F508del, HEK293T

The work was carried out to study the possibility of modeling of cystic fibrosis in HEK293T cell culture and the correction of the F508del mutation using the CRISPR/Cas9 method. Four sgRNAs in combination with three Cas9 nucleases and two DNA repair templates were tested. Modeling of cystic fibrosis in HEK293T cell culture was achieved by transfection of an additional plasmid pGEM-CFTR containing the *CFTR* locus with the F508del mutation into cells. The efficacy of mutation editing was assessed using deep targeted sequencing. The average editing efficiency of the *CFTR* locus was 5.5 %. The mutation correction frequency ranged from 0.08 % to 0.7 % alleles, depending on the combination of used CRISPR/Cas9 components. The accuracy of different Cas9/sgRNA combinations ranged from 61.4 % to 90.9 %, the maximum value was recorded for saCas9/saCFTR#3. The possibility of modeling cystic fibrosis in a HEK293T cell culture using a synthetic plasmid was demonstrated and the correction efficiency of the F508del mutation using various CRISPR/Cas9 combinations was evaluated.

Keywords: fibrosis, *CFTR*, genome editing, CRISPR/Cas9, F508del, HEK293T

Для цитирования: Смирнихина С. А., Кондратьева Е. В., Анучина А. А., Зайнитдинова М. И., Лавров А. В. МОДЕЛИРОВАНИЕ МУКОВИСЦИДОЗА В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ HEK293T И РАЗРАБОТКА СПОСОБА КОРРЕКЦИИ МУТАЦИИ F508del. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(2):158-162.
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15038>

For citation: Smirnikhina S. A., Kondratyeva E. V., Anuchina A. A., Zaynitdinova M. I., Lavrov A. V. MODELING OF CYSTIC FIBROSIS IN HEK293T CELL CULTURE AND DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE CORRECTION OF F508del MUTATION. *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(2):158-162. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15038> (In Russ.)

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота	из белков данного семейства с sgRNA, обеспечивающей его целевую направленность на конкретный фрагмент ДНК
ДЦР	– двуцепочечный разрыв ДНК	
ИПСК	– индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека	HDR – homology-directed repair (направленная гомологичная репарация)
нт	– нуклеотид	NGS – секвенирование следующего поколения
п.о.	– пара оснований	NHEJ – non-homologous end joining (негомологичное соединение концов)
РНК	– рибонуклеиновая кислота	PAM – protospacer adjacent motif (мотив, смежный с протоспейсером)
CFTR	– Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (трансмембранный регулятор проводимости муковисцидоза)	sgRNA – направляющая РНК, используемая для определения последовательности ДНК, которую должна разрезать нуклеаза семейства Cas9
CRISPR/Cas9	– группа регулярно перемежающихся коротких палиндромных повторов (CRISPR) и CRISPR-ассоциированный белок 9 (Cas9), часто употребляется для обозначения системы из одного	ssODN – одноцепочечный олигонуклеотид

Муковисцидоз – наследственное моногенное заболевание, возникающее в результате мутаций в гене *CFTR*. Эти мутации влекут за собой различные нарушения работы канала *CFTR*, участвующего в транспорте ионов хлора и натрия в эпителиальных клетках. В результате этого развиваются симптомы, в первую очередь связанные с поражением легких и поджелудочной железы [1]. Самой частой мутацией в Европе является утрата фенилаланина в позиции 508 полипептидной цепи *CFTR* в результате трехнуклеотидной делеции – F508del, частота которой достигает 70 % [2]. Проблема разработки этиотропной терапии муковисцидоза остается актуальной и по сей день, даже несмотря на совершенствование патогенетической терапии [3].

Классическая генная терапия (доставка в клетки правильной копии гена *CFTR*) демонстрирует очень низкую эффективность доставки таргетной молекулы в клетки верхних дыхательных путей, несмотря на хорошие результаты, полученные в доклинических исследованиях. Невозможность доставки гена *CFTR* приводит к отсутствию или чрезвычайно низкому клиническому эффекту, что не позволяет использовать эти методы в рутинной практике [4].

Между тем появились методы редактирования генома, которые позволяют перманентно исправить мутации в генах. В основе наиболее часто используемого метода геномного редактирования лежит создание двуцепочечного разрыва (ДЦР) ДНК с помощью так называемой программируемой нуклеазы (чаще всего это Cas9), специфичность действия которой достигается использованием направляющей РНК (sgRNA) – короткой молекулы, комплементарной таргетной последовательности ДНК. Далее ДЦР репарируется одним из двух методов репарации, функционирующих в клетке, – негомологичным соединением концов или направленной гомологичной репарацией. Последняя происходит только в присутствии донорной молекулы ДНК, способной рекомбинировать с локусом с ДЦР и таким образом вставить новый фрагмент ДНК [5].

Методы геномного редактирования были применены для редактирования гена *CFTR* и коррекции мутации F508del в разных клеточных культурах [6–12]. Почти во всех этих исследованиях доля успешно отредактированных клеток не превышала 2 %. Лишь в одном из исследований 2019 года показано, что использование CRISPR/Cas9 в виде рибонуклеопротеидных комплексов с направляющей РНК в сочетании с электропорацией позволяет исправить мутацию F508del в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) в 12,7 % аллелей и в 22,0 % клеток [12]. Процитированная выше работа свидетельствует о том, что технология CRISPR/Cas9 постоянно развивается, появляются новые модификации, позволяющие увеличить эффективность и специфичность методики.

Для разработки подходов к редактированию той или иной мутации необходимо использовать объект

(чаще всего клеточную культуру) с искомой мутацией. В силу редкости многих мутаций при муковисцидозе [13] зачастую материал от пациентов недоступен, что вынуждает искать альтернативные модели. В недавней работе, опубликованной D. J. Sanz с соавт. [14], показано, что такого рода исследования можно проводить и в культурах клеток, не имеющих мутации в гене *CFTR*, с котрансфекцией в них плазмид с мини-геном – синтетических векторов с фрагментом гена *CFTR*, содержащим таргетную мутацию.

Целью работы явилось изучение возможности моделирования муковисцидоза в клеточной культуре HEK293T и коррекция мутации F508del с помощью метода CRISPR/Cas9.

Материал и методы

Плазмиды и донорные молекулы ДНК

Плазмиды для геномного редактирования были клонированы по описанной ранее методике [15]. В работе использовали плазмиды, кодирующие eSpCas9(1.1) [16], SpCas9(HF4) [17] и SaCas9 [18]. Две направляющие РНК (sgCFTR#1 и saCFTR#3) были подобраны непосредственно на мутацию F508del, то есть не содержали последовательность СТТ и были активны только в случае мутации. Две другие направляющие РНК (sgCFTR#2 и sgCFTR#3) были подобраны на последовательность экзона 10 гена *CFTR* перед мутацией и были активны как в случае мутации, так и на диком типе последовательности (рис. 1). Комбинации Cas9 и направляющих РНК были клонированы в пять разных плазмид. Для коррекции мутации F508del нами были синтезированы два одноцепочечных олигонуклеотидов (ssODN) в зависимости от предполагаемого места ДЦР – ssODN#1 и ssODN#2. Последний содержал синонимичную мутацию в регионе PAM для sgCFTR#2 для предотвращения повторного разрезания ДНК. Так как клеточная культура HEK293T не содержала мутацию F508del, все эксперименты проводили на искусственной плазмиде pGEM-CFTR, содержащей локус *CFTR* (397 п.о.) с мутацией F508del.

Культивирование клеток и трансфекция

Клеточную культуру HEK293T (любезно предоставлена к.б.н. М. Ю. Скобловым, лаборатория функциональной геномики ФГБНУ «МГНЦ», Москва) культивировали, как описано ранее [15]. Клетки трансфицировали реагентом Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) – 5,8 мкг Cas9+sgNA плазмиды, 0,6 мкг pGEM-CFTR и/или 100 пмоль ssODN на 2×10^5 клеток. Эффективность трансфекции оценивали путем подсчета количества флуоресцентных клеток после котрансфекции 5,8 мкг плазмиды Cas9+sgRNA и 0,6 мкг pEGFP-C1 (Clontech, США) с помощью цитофлуориметрии (Flowmax, Partec, Германия).

Глубокое таргетное секвенирование

Тотальная ДНК из трансфицированных клеток была выделена с использованием набора Quick-gDNA Miniprep Kit (Zymo Research, США). Оценка эффективности редактирования гена *CFTR* (образования инделов и

Рис. 1. Направляющие РНК и последовательности ssODN для редактирования мутации F508del в гене *CFTR*

вставок СТТ) была проведена с использованием глубокого таргетного секвенирования ДНК на приборе MiSeq System (Illumina, США). Подготовку библиотек ДНК для секвенирования проводили в два этапа: сначала амплифицировали фрагмент гена *CFTR* длиной 491 п.о. с плазмиды pGEM-CFTR, используя специфичные для плазмиды праймеры (F-5'-CCATGGCCGCGGGATTAA-3', R-5'-GAATACTCAAGCTATGCATCCAACG-3'), затем проводили второй этап амплификации с праймеров F-5'-TGGAGCCTTCAGAGGGTAAAAT-3' и F-5'-GCTTTGATGACGCTTCTGTATCT-3', амплифицирующих фрагмент длиной 145 п.о., на основе которого создавали библиотеку. Среднее значение покрытия анализируемого локуса *CFTR* составило 32764 (от 24691 до 41011). Анализ данных секвенирования проводили с использованием программного обеспечения CRISPResso2 [19].

Статистическая обработка результатов глубокого секвенирования была проведена с помощью программного обеспечения STATISTICA 10 (StatSoft, Inc.) с использованием медианного теста и критерия Крайскела – Уоллиса.

Терминология. Под термином «NHEJ» понимали любое изменение изначальной последовательности ДНК гена *CFTR*, обнаруженное с помощью CRISPResso2 в области ДЦР, образуемое в результате репарации ДНК путем негомولوجичного соединения концов. При этом наблюдали делеции, однонуклеотидные замены и вставки, за исключением вставки нуклеотидов СТТ. Под термином «HDR» понимали количество обнаруженных вставок нуклеотидов СТТ в области мутации F508del (то есть исправление мутации), образуемых в результате репарации путем направленной гомологичной репарации. Под термином «несовершенный HDR» понимали одновременную фиксацию событий NHEJ и HDR в одном и том же аллеле, в то время как под термином «точный HDR» понимали только вставку нуклеотидов СТТ в области мутации F508del без дополнительных изменений.

Результаты и обсуждение. В результате оценки частоты делеций, однонуклеотидных замен и вставок, за исключением вставок нуклеотидов СТТ (события NHEJ), в гене *CFTR* при геномном редактировании показано, что все используемые комбинации Cas9 и направляющих РНК демонстрируют схожую эффективность. В среднем указанные выше события произошли в 5,5 % аллелей (варьируя от 3,9 % до 7,1 %) (рис. 2А). Эффективность разных нуклеаз (две мутированные формы SpCas9 и SaCas9), как и направляющих РНК, подобранных на мутацию F508del или в стороне от нее, не отличалась.

Далее в работе оценивали частоту вставок СТТ (HDR), то есть исправления мутации F508del после геномного редактирования. Редактирование проводили путем котрансфекции плазмид, кодирующих Cas9 и направляющую РНК вместе с ssODN. При использовании ssODN#2 в качестве матрицы для репарации в комбинации с Cas9(1.1)/sgCFTR#2 удалось обнаружить лишь три ряда NGS из 41011 с исправленной мутацией, что было расценено программой CRISPResso2 как отсутствие вставок СТТ.

При подборе ssODN мы руководствовались рекомендациями, предложенными в статье Richardson с соавт. [20], суть которых сводится к использованию ssODN, гомологичного к таргетной цепи ДНК длиной 127 нт с плечами гомологии 91 нт в области 5'-конца и 36 нт в области 3'-конца от предполагаемого ДЦР. При таком подходе ssODN#2, подобранный к месту предполагаемого разрыва, вызванного комбинацией Cas9 и sgCFTR#2, лишь своим 3'-концом мог исправ-

вить мутацию в результате рекомбинации (рис. 1). Однако, скорее всего, этого не произошло, предположительно из-за того, что концы ssODN участвуют только в создании гомологии, но не в самой рекомбинации (не встраиваются).

Рис. 2. Эффективность редактирования гена *CFTR* в клеточной культуре HEK293T: А – частота событий NHEJ в области мутации F508del; Б – частота событий HDR (исправления мутации F508del)

На рисунке 2Б представлена частота исправления мутации F508del с использованием всех комбинаций Cas9 и sgRNA с ssODN#1. Частота коррекции мутации варьировала от 0,08 % до 0,7 % аллелей, в зависимости от используемой Cas9/sgRNA, однако статистической достоверности различий не получено. В среднем вставка СТТ произошла в 0,28 % аллелей.

Несмотря на довольно большое количество публикаций, связанных с редактированием гена *CFTR*, и в частности коррекцией мутации F508del [6–12, 14], проблема создания эффективной методики остается нерешенной. Во всех подобных работах, которые проводили на ИПСК [8, 10], CFBE41o- [9], эпителии трахеи от больного муковисцидозом (CFTE) [6], эпителии бронхиол (HBE) [6], базальных клетках эпителия бронхиол (HBECS) [11] и кишечных органоидах [7], показана крайне низкая эффективность исправления мутации, не превышающая 2 % клеток. Только в одном исследовании авторы заявляют об эффективности коррекции мутации F508del в ИПСК в 12,7 % аллелей и в 22,0 % клеток [12]. В нашей работе эффективность HDR в клеточной культуре HEK293T варьировала от 0,08 % до 0,7 % аллелей, в зависимости от используемой комбинации Cas9/sgRNA.

В данной работе мы использовали клеточную линию HEK293T, не имеющую мутацию F508del, поэтому коррекцию мутации проводили на синтетической плазмиде, содержащей фрагмент гена *CFTR* с мутацией. Результаты работы показывают, что эффективность редактирования локуса *CFTR* и коррекции мутации F508del в синтетической плазмиде сопоставима с эффективностью исправления мутации в клеточных линиях, имеющих мутацию [6–11, 14]. Таким образом, можно считать такой подход оправданным, особенно в случае исправления редких мутаций и недоступности клеточного материала от пациента. Ис-

следование, опубликованное D. J. Sanz с соавт. [14], также подтверждает возможность такого подхода для коррекции редких мутаций в гене *CFTR*. С другой стороны, моделирование муковисцидоза в линии HEK293T позволяет проводить первичные эксперименты для тестирования эффективности разных комбинаций компонентов CRISPR/Cas9 с последующей верификацией результатов наиболее эффективных комбинаций на культурах от пациентов.

Эффективность исправления мутации F508del для комбинации Cas9(1.1)-sgCFTR#3 и ssODN#1 была самой низкой – 0,08 %, что можно объяснить тем, что место разрезания ДНК с использованием направляющей РНК sgCFTR#3 было на значительном удалении от последовательности, к которой подбирали ssODN#1 (рис. 1). Из результатов следует, что только каждый 66-й разрыв ДНК в этом случае был репарирован с исправлением мутации (табл.). Низкую эффективность также наблюдали и при использовании комбинации Cas9(1.1)-sgCFTR#2 и ssODN#1, что, вероятно, связано с недостаточной длиной одного из плеч гомологии ssODN#1 – 7 нуклеотидов с 5'-конца (рис. 1). В этом случае лишь каждый 44-й разрыв ДНК репарировался с коррекцией мутации (табл.). Необъяснимой остается низкая эффективность коррекции мутации при использовании комбинации Cas9(HF4)-sgCFTR#1, которая должна была быть сопоставимой с эффективностью при Cas9(1.1)-sgCFTR#1, однако оказалась в три раза ниже. Наиболее эффективной была комбинация Cas9(1.1)-sgCFTR#1 – 0,7 % исправления мутации (в 2–11 раз выше, чем в остальных комбинациях), при этом каждый 9-й ДЦР репарировался с помощью HDR.

В работе также посчитали процент точной коррекции мутации F508del, то есть только вставку СТТ без дополнительных изменений в локусе *CFTR*, который подвергали редактированию (табл.). Показано, что точность разных комбинаций Cas9/sgRNA варьирует от 61,4 % до 90,9 %, максимальный показатель зарегистрирован для комбинации saCas9/saCFTR#3.

Наконец, как видно из таблицы, для двух из пяти комбинаций Cas9/sgRNA (Cas9(1.1)-sgCFTR#1 и saCas9-saCFTR#3) с ssODN#1 показано, что примерно каждый 14-й индуцированный нуклеазой ДЦР репаруется с точной коррекцией мутации F508del.

В исследовании мы столкнулись с проблемой неточного (несовершенного) HDR. В зависимости от используемой комбинации Cas9/sgRNA его доля составила от 9,1 % до 38,6 % от всех событий HDR. При использовании комбинаций с sgCFTR#2 и sgCFTR#3 сохранялась возможность повторного разрезания исправленного локуса, так как обе направляющие РНК были подобраны на последовательность рядом с му-

тацией, но не на нее непосредственно. Комбинации Cas9 с sgCFTR#1 активны только на аллелях с мутацией, однако NHEJ может приводить к появлению мутаций, которые, хоть и должны разрушать гомологию направляющей РНК с её таргетом, не исключают полностью возможность повторного разреза и репарации с помощью HDR. С другой стороны, несовершенный HDR рассчитывается как количество ридов NGS, отличных от референсной последовательности, поэтому, возможно, являются ошибками секвенирования, которые случаются с частотой 1:1000 нуклеотидов и могут быть засчитаны алгоритмом при используемой глубине секвенирования. Самой точной комбинацией была saCas9/saCFTR#3, доля точного исправления мутации у которой составила почти 91 %.

Таблица

Точность разных комбинаций CRISPR/Cas9 и доля исправления мутации F508del (несовершенный и точный HDR) от всех событий NHEJ

Комбинация Cas9 и направляющей РНК	Частота несовершенного HDR	Частота точного HDR	Доля точного HDR от всех событий HDR, %	Доля аллелей с HDR от всех событий NHEJ, %	Доля аллелей с точным HDR от всех событий NHEJ, %
Cas9(1.1)-sgCFTR#1	0,27	0,43	61,4	11,09	6,80
Cas9(1.1)-sgCFTR#2	0,04	0,12	75,0	2,27	1,70
Cas9(1.1)-sgCFTR#3	0,02	0,06	75,0	1,51	1,13
Cas9(HF4)-sgCFTR#1	0,05	0,08	62,5	3,28	2,05
saCas9-saCFTR#3	0,03	0,32	90,9	7,18	6,53

Закключение. В работе продемонстрирована возможность моделирования муковисцидоза в клеточной культуре HEK293T с помощью синтетической плазмиды и оценена эффективность коррекции мутации F508del с использованием шести различных комбинаций Cas9/sgRNA/ssODN. Для комбинаций Cas9(1.1)-sgCFTR#1, saCas9-saCFTR#3 с ssODN#1 целесообразно проводить дальнейшие эксперименты на пациент-специфичных клетках с мутацией F508del.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* 2013;22:58-65. <https://doi.org/10.1183/09059180.00008412>
- Cystic Fibrosis Foundation. Patient registry: annual data report, 2017. Bethesda, Maryland, 2018. Available at: <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2017-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>. Accessed November 27, 2019.
- Rowe S. M., McCollery S. A., Rietschel E., Li X., Bell S. C. [et al.]. Lumacaftor/Ivacaftor Treatment of Patients with Cystic Fibrosis Heterozygous for F508del-CFTR. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2017;14(2):213-219. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201609-689OC>
- Смирнихина С. А., Лавров А. В. Современное патогенетическое лечение и разработка новых методов генной и клеточной терапии муковисцидоза. *Гены и Клетки*. 2018;3(XIV):23-31. [Smirnikhina S. A., Lavrov A. V. Modern pathogenesis-based methods and development of new gene and cell-based methods for cystic fibrosis treatment. *Geny*

& Kletki. – *Genes & Cells*. 2018;3(XIV):23-31. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.23868/201811029>

- Zhang F., Wen Y., Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum. Mol. Genet.* 2014;23(R1):R40-46. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>
- Lee C. M., Flynn R., Hollywood J. A., Scallan M. F., Harrison P. T. Correction of the ΔF508 Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair. *Biores. Open. Access.* 2012;1(3):99-108. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0218>
- Schwank G., Koo B. K., Sasselli V., Dekkers J. F., Heo I. [et al.]. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell. Stem. Cell.* 2013;13(6):653-658. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.002>
- Firth A. L., Menon T., Parker G. S., Qualls S. J., Lewis B. M. [et al.]. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell. Rep.* 2015;12(9):1385-1390. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.062>

9. Bednarski C., Tomczak K., Vom Hövel B., Weber W. M., Cathomen T. Targeted Integration of a Super-Exon into the CFTR Locus Leads to Functional Correction of a Cystic Fibrosis Cell Line Model. *PLoS. One.* 2016;11(8):e0161072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161072>
10. Merkert S., Bednarski C., Göhring G., Cathomen T., Martin U. Generation of a gene-corrected isogenic control iPSC line from cystic fibrosis patient-specific iPSCs homozygous for p.Phe508del mutation mediated by TALENs and ssODN. *Stem. Cell. Res.* 2017;23:95-97. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.07.010>
11. Peters-Hall J. R., Coquelin M. L., Torres M. J., LaRanger R., Alabi B. R. [et al.]. Long-term culture and cloning of primary human bronchial basal cells that maintain multipotent differentiation capacity and CFTR channel function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2018;315(2):L313-L327. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00355.2017>
12. Ruan J., Hirai H., Yang D., Ma L., Hou X. [et al.]. Efficient Gene Editing at Major CFTR Mutation Loci. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2019;16:73-81. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.006>
13. CFTR2 – Clinical and Functional Translation of CFTR. Available at: <https://www.cftr2.org>. Accessed November 27, 2019.
14. Sanz D. J., Hollywood J. A., Scallan M. F., Harrison P. T. Cas9/gRNA targeted excision of cystic fibrosis-causing deep-intronic splicing mutations restores normal splicing of CFTR mRNA. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184009>
15. Smirnikhina S. A., Anuchina A. A., Kochergin-Nikitsky K. S., Adilgerieva E. P., Yakushina V. D. [et al.]. Experimental approaches to the target editing of the CFTR gene using CRISPR-Cas9. *Bulletin of RSMU.* 2018;2:14-20. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.022>
16. Slaymaker I. M., Gao L., Zetsche B., Scott D. A., Yan W. X. [et al.]. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* 2016;351(6268):84-88. <https://doi.org/10.1126/science.aad5227>
17. Kleinstiver B. P., Pattanayak V., Prew M. S., Tsai S. Q., Nguyen N. T. [et al.]. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;529(7587):490-495. <https://doi.org/10.1038/nature16526>
18. Ran F. A., Cong L., Yan W. X., Scott D. A., Gootenberg J. S. [et al.]. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature.* 2015;520(7546):186-191. <https://doi.org/10.1038/nature14299>
19. Clement K., Rees H., Canver M. C., Gehrke J. M., Farouni R. [et al.]. CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. *Nat. Biotechnol.* 2019;37(3):224-226. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0032-3>
20. Richardson C. D., Ray G. J., DeWitt M. A., Curie G. L., Corn J. E. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(3):339-344. <https://doi.org/10.1038/nbt.3481>

Сведения об авторах:

Смирнихина Светлана Анатольевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией редактирования генома; тел.: 84993243579; e-mail: smirnikhinas@gmail.com; ORCID: 0000-0002-1558-3048

Кондратьева Екатерина Владимировна, научный сотрудник лаборатории редактирования генома; тел.: 84993243579; e-mail: ekaterina.kondratyeva@gmail.com; ORCID: 0000-0003-0770-2569

Анучина Арина Артуровна, научный сотрудник лаборатории редактирования генома; тел.: 84993243579; e-mail: arinate@mail.ru; ORCID: 0000-0003-1820-5461

Зайнитдинова Милляуша Иршатовна, научный сотрудник лаборатории редактирования генома; тел.: 84993243579; e-mail: milyazaun@gmail.com; ORCID: 0000-0002-2402-669X

Лавров Александр Вячеславович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории редактирования генома; тел.: 84993243579; e-mail: alexandervlavrov@gmail.com; ORCID: 0000-0003-4962-6947

© Коллектив авторов, 2020
УДК 616.2-02.7+616-084/085
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15039>
ISSN – 2073-8137

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕФЕРЕНТНЫХ ЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗНОСТИ КИШЕЧНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Ю. А. Мельяновская, Е. И. Кондратьева, С. И. Куцев

Медико-генетический научный центр им. академика Н. П. Бочкова,
Москва, Российская Федерация

DETERMINATION OF REFERENCE VALUES FOR THE METHOD OF INTESTINAL CURRENT MEASUREMENT IN THE RUSSIAN FEDERATION

Melyanovskaya Yu. L., Kondratyeva E. I., Kutsev S. I.

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Целью исследования явилось определение референтных значений метода определения разности кишечных потенциалов у 10 здоровых добровольцев и 5 больных муковисцидозом с «тяжелым» генотипом и абсолютной панкреатической недостаточностью. При стимуляции форсколином изменение тока короткого замыкания (ΔISC) в группе контроля составило $25,78 \pm 4,41 \mu A/cm^2$, у пациентов с муковисцидозом значения ΔISC не превышали $2,97 \pm 0,61 \mu A/cm^2$.