

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc633926>

Коррекция мутации F508del в гене *CFTR* с использованием CRISPR/Cas9 в клетках, полученных от пациентов с муковисцидозом

Е.В. Кондратьева, А.Г. Демченко, О.В. Володина, О.П. Рыжкова, В.А. Ковальская, В.Ю. Табаков, А.В. Лавров, С.А. Смирнихина

Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Муковисцидоз — самое распространённое и неизлечимое генетическое заболевание. Наиболее частой причиной является мутация F508del в гене *CFTR*, которую гипотетически можно исправить методами редактирования генома. В настоящее время крайне актуальными являются как поиск наиболее эффективной системы редактирования на основе CRISPR/Cas9 для данной мутации, так и выбор клеток-мишеней, которые могли бы поддерживать самообновление и давать дифференцированное потомство клеток лёгких. Такими перспективными мишенями служат индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (чипСК) и индуцированные базальные клетки дыхательных путей человека (чиБК).

Цель исследования — исправить мутацию F508del в гене *CFTR* в чипСК и чиБК, полученных от пациентов с муковисцидозом, с помощью технологии CRISPR/Cas9.

Материалы и методы. Мы получили три линии чипСК методом репрограммирования фибробластов от пациентов с муковисцидозом и три линии чиБК методом направленной дифференцировки вышеуказанных чипСК. На основании трёх различных вариантов нуклеазы Cas9, трёх подобранных направляющих РНК и двух одноцепочечных олигонуклеотидов мы разработали восемь систем редактирования мутации F508del, которые ввели в чипСК и чиБК методом электропорации, после чего в трансфицированных клетках оценили уровень негомологичного соединения концов, внесения инделов и направленной гомологичной репарации с помощью глубокого таргетного секвенирования.

Результаты. На чипСК были протестированы восемь редактирующих систем. Наивысшая эффективность негомологичного соединения концов, внесения инделов и направленной гомологичной репарации наблюдалась при использовании нуклеазы SpCas9(1.1). Мутацию F508del достоверно удалось исправить с помощью комбинации этой нуклеазы с направляющей РНК sgCFTR#sp1 (с эффективностью до 6,6% аллелей в трансфицированных клетках). На чиБК были протестированы две редактирующие системы, которые оказались наиболее эффективными в экспериментах на чипСК. Мутацию достоверно удалось исправить с помощью обеих систем (эффективность — до 20% аллелей в трансфицированных клетках).

Заключение. Показана возможность высокоэффективной коррекции мутации F508del в гене *CFTR* в клетках, полученных от пациентов с муковисцидозом, с помощью разработанной системы редактирования на основе системы CRISPR/Cas9. Поскольку чиБК хорошо поддаются трансфекции и редактированию, а также могут быть получены в достаточном количестве из чипСК, они являются перспективной платформой для разработки генотерапевтического лечения муковисцидоза.

Ключевые слова: муковисцидоз; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; CRISPR/Cas9; геномное редактирование; F508del.

Как цитировать:

Кондратьева Е.В., Демченко А.Г., Володина О.В., Рыжкова О.П., Ковальская В.А., Табаков В.Ю., Лавров А.В., Смирнихина С.А. Коррекция мутации F508del в гене *CFTR* с использованием CRISPR/Cas9 в клетках, полученных от пациентов с муковисцидозом // Гены и клетки. 2024. Т. 19, № 4. С. 453–472. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc633926>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc633926>

Correction of F508del in *CFTR* using CRISPR/Cas9 in cells derived from cystic fibrosis patients

Ekaterina V. Kondrateva, Anna G. Demchenko, Olga V. Volodina, Oxana P. Ryzhkova, Valeriia A. Kovalskaia, Vyacheslav Yu. Tabakov, Alexander V. Lavrov, Svetlana A. Smirnikhina

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Cystic fibrosis (CF) is the most common fatal and incurable genetic disease. The most frequent reason is the F508del mutation in the *CFTR* gene, which can theoretically be corrected by genome editing. Currently, pressing issue is the search for the most effective CRISPR/Cas9-based editing system for this mutation, as well as the selection of target cells that could support self-renewal and provide differentiated progeny of lung cells. Such promising targets can be presented by human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and human induced airway basal stem cells (hiBCs).

AIM: To correct the F508del mutation in the *CFTR* gene in hiPSCs and hiBCs derived from CF patients using CRISPR/Cas9 technology.

MATERIALS AND METHODS: We obtained three hiPSCs lines by reprogramming fibroblasts from patients with CF and three hiBCs lines by targeted differentiation of these hiPSCs. Based on three different variants of the Cas9 nuclease, three single guide RNAs, and two single-stranded oligodeoxyribonucleotides we created eight systems for editing the F508del mutation and transfected them into hiPSCs and hiBCs by electroporation. Then we analyzed the levels of non-homologous end joining, indels, and directed homologous repair in the transfected cells by deep target sequencing.

RESULTS: Eight editing systems were tested on hiPSCs. The highest efficiency of non-homologous end joining, indels, and directed homologous repair was observed when using SpCas9(1.1). The mutation was significantly corrected using a combination of this nuclease with the guide RNA sgCFTR#sp1 (with an efficiency up to 6.6% of alleles in transfected cells). Only two editing systems, which seemed to be most effective on hiPSCs, were tested on hiBCs. The mutation was significantly corrected using both systems (with efficiency up to 20% of alleles in transfected cells).

CONCLUSION: We demonstrated the possibility of highly effective correction of the F508del mutation in the *CFTR* gene in cells obtained from patients with CF using a designed system for editing this mutation based on the CRISPR/Cas9 system. Since hiBCs can be transfected and edited quite successfully, and can also be obtained in satisfactory quantities from hiPSCs, they are a promising platform for the development of gene therapy for cystic fibrosis.

Keywords: cystic fibrosis; induced pluripotent stem cells; CRISPR/Cas9; gene editing; F508del.

To cite this article:

Kondrateva EV, Demchenko AG, Volodina OV, Ryzhkova OP, Kovalskaia VA, Tabakov VYu, Lavrov AV, Smirnikhina SA. Correction of F508del in *CFTR* using CRISPR/Cas9 in cells derived from cystic fibrosis patients. *Genes & cells*. 2024;19(4):453–472. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc633926>

Received: 28.08.2024

Accepted: 18.10.2024

Published online: 01.12.2024

ВВЕДЕНИЕ

Муковисцидоз является одним из самых распространённых наследственных заболеваний. В настоящий момент средняя продолжительность жизни людей с муковисцидозом в России составляет 23,7 года [1], в США — 32,4 года, хотя благодаря развитию патогенетической терапии средняя прогнозируемая продолжительность жизни в США для детей, рождённых в 2016–2020 гг., составляет 59 лет (согласно Annual Data Report 2020 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry). Однако такие методы лечения подходят не всем пациентам, препараты являются дорогостоящими и имеют значительные побочные эффекты, а также требуют регулярного применения на протяжении всей жизни, которое ограничено возрастом [2]. Вот почему представляется необходимой разработка этиотропных методов лечения, в первую очередь генной терапии.

Первым из ключевых факторов, имеющих решающее значение для разработки эффективного подхода к генной терапии муковисцидоза, является достаточная эффективность метода коррекции мутации, вызывающей заболевание. Вторым ключевым фактором служит эффективность доставки в очаг заболевания молекул-эффекторов или отредактированных клеток с возможностью их пролонгированного терапевтического эффекта, в связи с чем крайне актуален также поиск собственно клеток-мишеней.

Что касается первого аспекта, то сейчас наиболее перспективным подходом генной терапии представляется метод геномного редактирования. В его основе лежит использование нуклеаз, способных вызывать сайт-специфические изменения в геноме. Среди таких нуклеаз наиболее известными являются нуклеазы цинковых пальцев (ZFN), мегануклеазы, эндонуклеазы TALEN и, наконец, группа белков Cas9. Нуклеазы Cas9 — это белки бактериального происхождения, которые при участии специальных молекул — направляющих РНК (нРНК) — способны вносить двуцепочечный разрыв в ДНК в строго определённом месте. Белки Cas9 обладают ограниченной эффективностью и точностью (поскольку разрезание может произойти в неспецифическом месте, что называется off-target, т.е. нецелевой, активностью), и над улучшением этих параметров работают многие группы исследователей во всём мире [3]. После создания нуклеазой двуцепочечного разрыва восстановление целостности ДНК в клетках проходит в основном по одному из двух путей репарации — негомологичного соединения концов (НГСК) или направленной гомологичной репарации (НГР) [4]. НГСК является преобладающим механизмом репарации у высших эукариот, при этом в месте разрыва в ходе репарации создаются небольшие вставки или делеции, которые зачастую нарушают рамку считывания. Реже возникают транслокации и большие делеции. Явление НГСК широко используется в создании нокаутов, однако мешает точному редактированию генома, вызывая неконтролируемые случайные мутации в целевых локусах

[5]. Чтобы преодолеть эти ограничения, предпринимаются попытки использования донорной ДНК-матрицы, которая путём НГР заменяла бы собой повреждённый участок ДНК и восстанавливала таким образом правильную последовательность. Однако НГР сложно использовать, как уже было сказано, из-за её крайне низкой эффективности в клетках эукариот, поэтому в настоящее время многие исследования направлены на усиление пути НГР [6, 7] и/или на подавление пути НГСК [8]. Матрица для НГР может представлять собой одноцепочечный олигонуклеотид (оОДН) или двуцепочечную молекулу ДНК (линеаризованную или кольцевую в виде плазмиды). Выбор типа донорной ДНК часто продиктован размером вводимой модификации: например, для небольших по размеру исправлений в основном используются оОДН, при этом они широко доступны с коммерческой точки зрения, поскольку их длина обычно составляет менее 200 нуклеотидов. При конструировании донорного олигонуклеотида участок ДНК с желаемой модификацией должен быть фланкирован специфическими плечами гомологии, длина которых может варьировать (от 30–40 до 70–90 нуклеотидов) и обычно примерно одинакова с двух сторон от вставки [9].

Что касается второго аспекта, при разработке генной терапии муковисцидоза принципиальным является поиск клеток-мишеней, которые могли бы поддерживать самообновление и давать дифференцированное потомство клеток лёгких. Несмотря на огромный потенциал человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (чипСК), в работе с ними возникает ряд проблем в связи с их тератогенностью [10], низкой эффективностью трансфекции и редактирования. Поэтому сильный интерес вызывают базально-клеточные предшественники, которые, согласно многим научным статьям, поддерживают рост эпителия дыхательных путей, функционируя в них как стволовые клетки [11].

Получение аутологичных базальных клеток дыхательных путей из отредактированных плюрипотентных стволовых клеток, специфичных для донора, выглядит перспективным направлением в разработке терапии муковисцидоза. За последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в способности дифференцировать чипСК в эпителиальные клетки лёгких с увеличенной зрелостью и функциональностью. Разработаны протоколы, которые повторяют основные этапы развития, приводящие к спецификации лёгких: индуцирование дефинитивной энтодермы, антериоризация с образованием передней энтодермы передней кишки, вентрализация с образованием ранних предшественников лёгких [12]. Тем не менее, хотя человеческие индуцированные базальные клетки (чибК) дыхательных путей, полученные из чипСК, обладают рядом преимуществ по сравнению с первичными базальными клетками дыхательных путей, они вызывают и дополнительные проблемы, связанные с тератогенным потенциалом и неполной дифференцировкой чипСК,

накоплением нецелевых геномных изменений во время репрограммирования, редактирования генома или в ходе культивирования. Кроме того, перед терапевтическим применением учёным предстоит решить технические и клинические проблемы, такие как сложность доставки из-за сильных барьерных свойств эпителия дыхательных путей, правильное заселение клеток в нормальном базолатеральном расположении, необходимость мультипотенциальной дифференцировки для пополнения дыхательных путей скорректированными клетками и сохранение способности к самообновляющемуся делению.

Несколько групп исследователей в мире активно работают над коррекцией самой частой при муковисцидозе мутации F508del. Большинство работ, сделанных с использованием нуклеаз ZFN или TALEN, трудоёмки и дорогостоящи, поэтому эти нуклеазы не получили широкого распространения. В последнее десятилетие всё большую долю занимают исследования с помощью системы CRISPR/Cas9. В большинстве работ показана низкая эффективность *in vitro* коррекции [13–16], тем не менее в нескольких работах удалось получить значимые уровни скорректированных аллелей: 1,9% в клетках линии CFTE [17], 12,7% в чипСК [18] и до 40% в первичных базальных клетках верхних дыхательных путей и бронхиальных эпителиальных клетках [19]. Тем не менее весьма актуально продолжение исследований в направлении исправления мутации F508del с ещё большей эффективностью и точностью, причём в различных типах плюрипотентных клеток.

Цель исследования — коррекция мутации F508del в гене *CFTR* в клетках, полученных от пациентов с муковисцидозом (чипСК и чиБК), с помощью технологии CRISPR/Cas9.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Из биопсийного материала кожи трёх пациентов (№№ 1, 2 и 7) с муковисцидозом, обусловленным гомозиготной мутацией F508del, были получены линии фибробластов с использованием пролиферативной среды «Амниокар» («ПанЭко», Россия). Все участники либо их официальные представители до включения в исследование добровольно подписали форму информированного согласия, утверждённую в составе протокола исследования этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (протокол № 1 от 28.01.2016 г.). Далее из этих фибробластов были созданы три линии чипСК путём репрограммирования, для чего использовали наборы CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и ReproRNA™-OKSGM Kit (STEMCELL Technologies, Канада) согласно протоколам производителей. чипСК культивировали в среде Essential 8™ (Gibco, США) на культуральном пластике, покрытом Matrigel (Corning, США), при 37 °C

и 5% CO₂. Каждые 4–10 дней в зависимости от конfluентности клетки пересевали с помощью раствора Версена («ПанЭко», Россия), добавляя в среду при каждом переосеве на 24 ч ингибитор ROCK Y-27632 (STEMCELL Technologies, Канада) в концентрации 5 мкМ. Полученные три линии чипСК (P1L5, P2L2 и P7L2) были полностью охарактеризованы, включая генотипирование и кариотипирование, анализ экспрессии маркёров плюрипотентности и способности к дифференцировке в три зародышевых листка, и зарегистрированы в базе hPSCreg под номерами RCMGi001-A (рис. 1), RCMGi0013-A (рис. 2) и RCMGi002-A (рис. 3). Для всех линий были подтверждены наличие мутации F508del в гомозиготном состоянии методом секвенирования по Сэнгеру, нормальный кариотип методом GTG-бэндинга, экспрессия маркёров плюрипотентности (NANOG, SSEA4, SOX2, OCT-4) методом иммуноцитохимии, функциональная плюрипотентность методом спонтанной дифференцировки и иммуноцитохимии (экспрессия маркёров энтодермы — альфа-фетопротейна или FOXA2, эктодермы — кератина-76 или бета-III-тубулина, мезодермы — виментина или фибронектина), а также родственность с исходной линией методом STR-анализа.

Получение человеческих индуцированных базальных клеток

Три линии чиБК были созданы путём направленной дифференцировки указанных трёх линий чипСК по описанному ранее протоколу [20, 21] с некоторыми модификациями [12]. Сначала чипСК дифференцировали в клетки дефинитивной энтодермы: среда RPMI-1640 («ПанЭко», Россия); GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, США); 100 нг/мл рекомбинантного активина А человека (R&D Systems, США); 5 мкМ CHIR99021 (Tocris Bioscience, Великобритания). Затем чипСК дифференцировали в клетки энтодермы передней кишки: среда 75% IMDM, 25% F12 (Ham), 100× B-27, 200× N2 — всё производства Thermo Fisher Scientific, США; 0,05% бычьего сывороточного альбумина, 0,45 мМ тиоглицерола, 100× GlutaMAX, 0,05 мг/мл L-аскорбиновой кислоты — всё производства Sigma-Aldrich, США и 100 мкг/мл примоцина (InvivoGen, Франция) с добавлением в первые 3 дня 10 мкМ SB431542 (Tocris Bioscience, Великобритания) и 2 мкМ дорсоморфина (Tocris Bioscience, Великобритания), а в последующие 9–11 дней — 3 мкМ CHIR99021, 10 нг/мл BMP4 (R&D Systems, США) и 100 нМ ретиноевой кислоты (Sigma-Aldrich, США). Полученные в результате NKX2.1⁺ лёгочные прогениторы культивировали на среде для базальных клеток в течение 2 нед с получением предшественников базальных клеток. Затем проводили клеточную сортировку по поверхностному маркёру базальных клеток CD271, используя антитела PE anti-human CD271 (NGFR) (кат. номер 345106; Biolegend, США), по протоколу производителя, на приборе S3e Cell Sorter (Bio-Rad, США). После сортировки по метке PE клетки высевали на пластик, покрытый Matrigel (Corning, США), и культивировали в среде для базальных клеток — PneumaCult™-Ex Plus

Medium (StemCell Technologies, Канада); 1 мкМ A83-01 (Tocris Bioscience, Великобритания); 1 мкМ DMH1 (Tocris Bioscience, Великобритания); 1 мкМ гидрокортизона (Sigma-Aldrich, США) — на культуральном пластике, покрытом Matrigel (Corning, США), при 37 °C, 5% CO₂, пересекая каждые 4–5 дней с применением раствора Версена («ПанЭко», Россия).

Редактирующие системы на основе Cas9

Опираясь на опубликованные данные об эффективности и специфичности редактирования, для разработки систем редактирования мутации F508del были выбраны три варианта нуклеазы Cas9: eSpCas9(1.1) [22], SpCas9(HF4) [23] и SaCas9 [24]. С помощью программного обеспечения Benchling были подобраны три нРНК с гипотетически

P1L5 (RCMGi001-A)

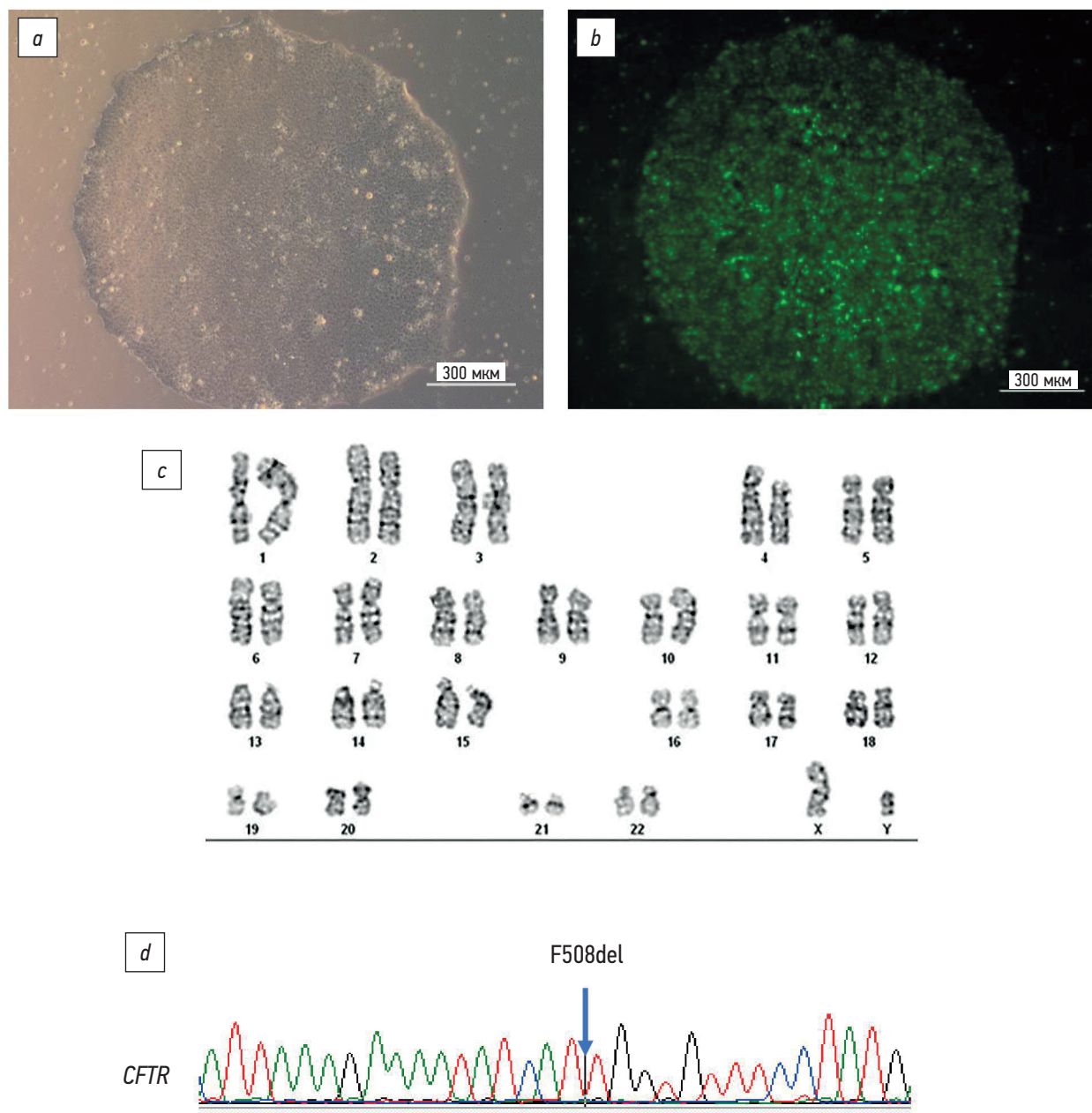


Рис. 1. Морфология и характеристика линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека P1L5: *a* — морфология колонии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток; *b* — прижизненная окраска колонии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток на маркер плюрипотентности TRA-1-60; *c* — кариотип линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток; *d* — секвенограмма локуса *CFTR* с мутацией F508del; *e* — иммуноцитохимическое окрашивание клеток на бета-III-тубулин (зелёный) и DAPI (синий); *f* — иммуноцитохимическое окрашивание клеток на фибронектин (красный) и DAPI (синий).

Fig. 1. Morphology and characteristics of the human induced pluripotent stem cells line P1L5: *a* — morphology of induced pluripotent stem cells colony; *b* — TRA-1-60 pluripotency marker live staining of induced pluripotent stem cells; *c* — induced pluripotent stem cells karyotype; *d* — sequenogram of *CFTR* locus including F508del mutation; *e* — immunostaining of beta3-tubulin (green) and DAPI (blue); *f* — immunostaining of fibronectin (red) and DAPI (blue).

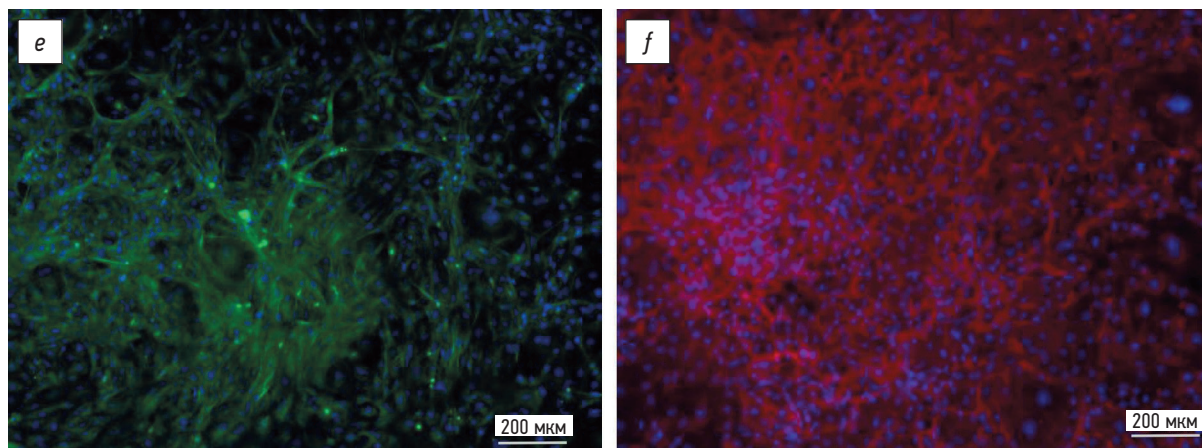


Рис. 1. Окончание.

Fig. 1. The End.

P2L2 (RCMGi013-A)

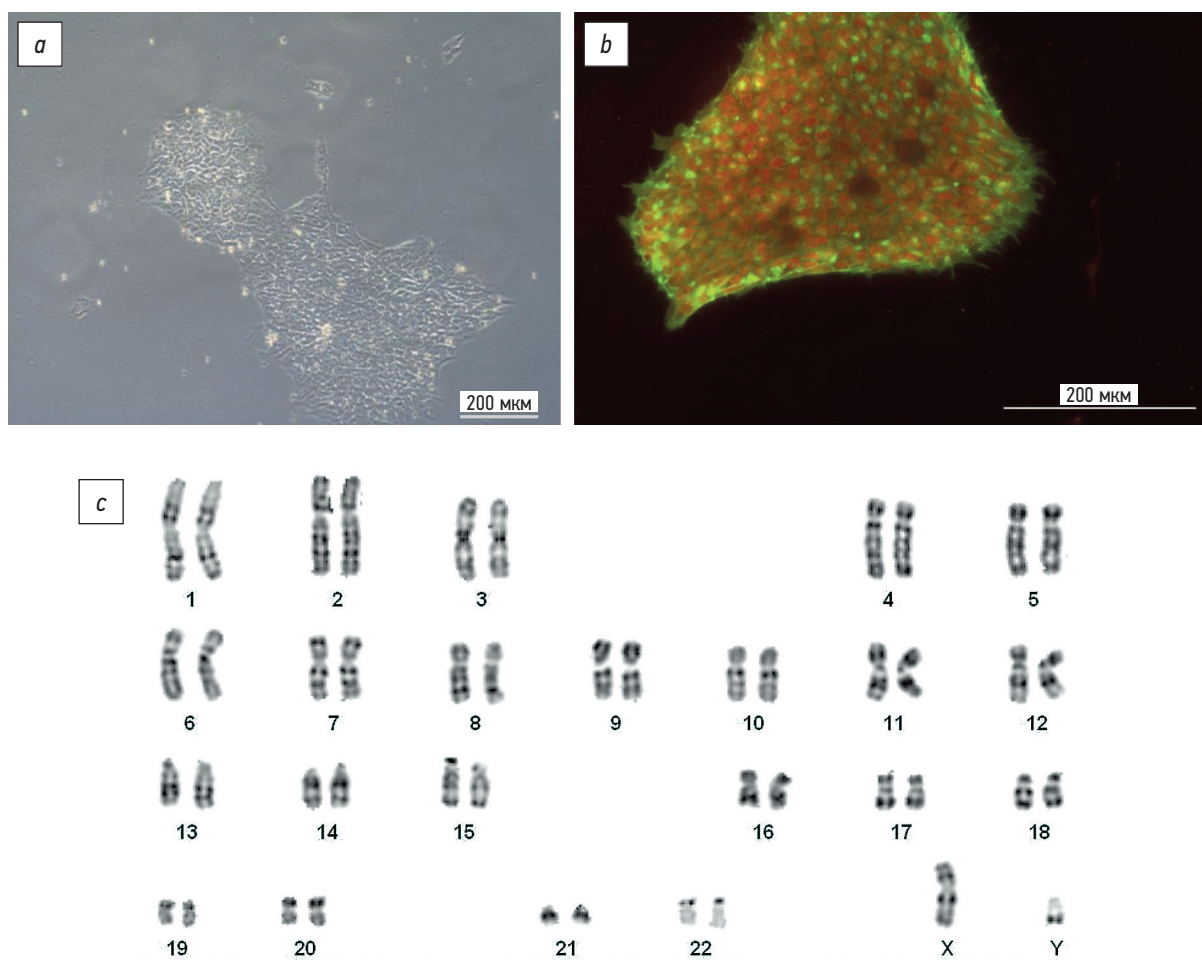


Рис. 2. Морфология и характеристика линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека P2L2: *a* — морфология колоний индуцированных плюрипотентных стволовых клеток; *b* — окраска индуцированных плюрипотентных стволовых клеток на маркёры плюрипотентности SSEA4 (зелёный) и OCT4 (красный); *c* — кариотип линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток; *d* — секвенограмма локуса *CFTR* с мутацией F508del; *e* — иммуноцитохимическое окрашивание клеток на бета-III-тубулин; *f* — иммуноцитохимическое окрашивание клеток на виментин.

Fig. 2. Morphology and characteristics of the human induced pluripotent stem cells line P2L2: *a* — morphology of induced pluripotent stem cells colonies; *b* — SSEA4 (green) and OCT4 (red) pluripotency markers immunostaining of induced pluripotent stem cells; *c* — induced pluripotent stem cells karyotype; *d* — sequenogram of *CFTR* locus including F508del mutation; *e* — induced pluripotent stem cells karyotype; *e* — beta3-tubulin immunostaining; *f* — vimentin immunostaining.

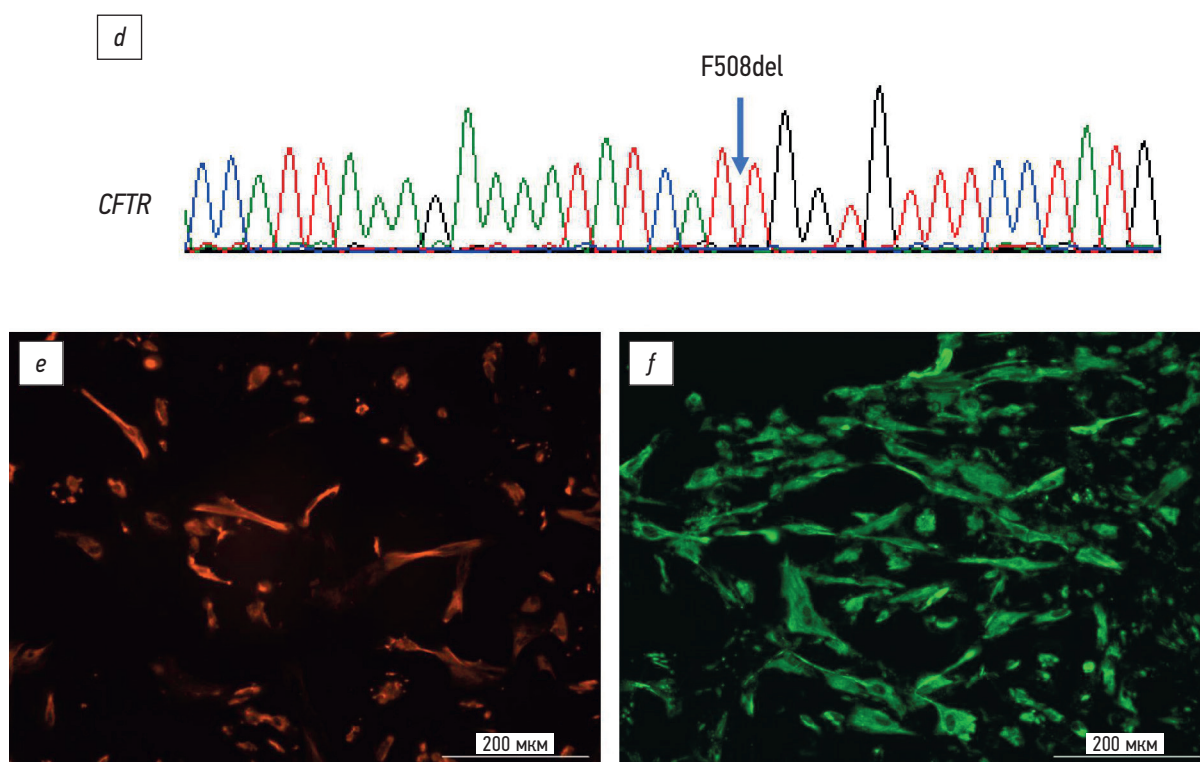


Рис. 2. Окончание.

Fig. 2. The End.

P7L2 (RCMGi002-A)

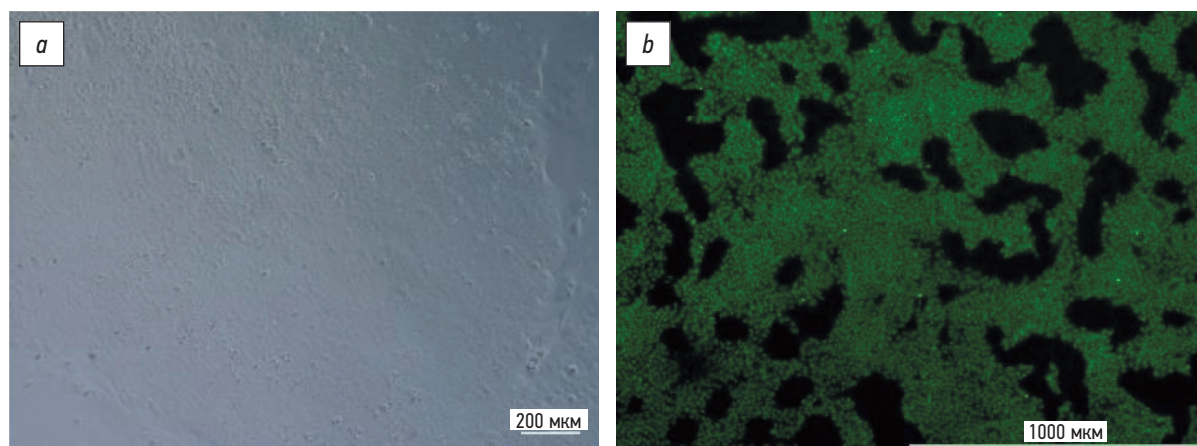


Рис. 3. Морфология и характеристика линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека P7L2: *a* — морфология колонии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток; *b* — окраска индуцированных плюрипотентных стволовых клеток на маркер плюрипотентности SOX2; *c* — кариотип линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток; *d* — секвенограмма локуса *CFTR* с мутацией F508del; *e* — иммуноцитохимическое окрашивание клеток на кератин-76; *f* — иммуноцитохимическое окрашивание клеток на виментин.

Fig. 3. Morphology and characteristics of the human induced pluripotent stem cells line P7L2: *a* — morphology of induced pluripotent stem cells colony; *b* — SOX2 pluripotency marker immunostaining of induced pluripotent stem cells; *c* — induced pluripotent stem cells karyotype; *d* — sequenogram of *CFTR* locus including F508del mutation; *e* — keratin 76 immunostaining; *f* — vimentin immunostaining.

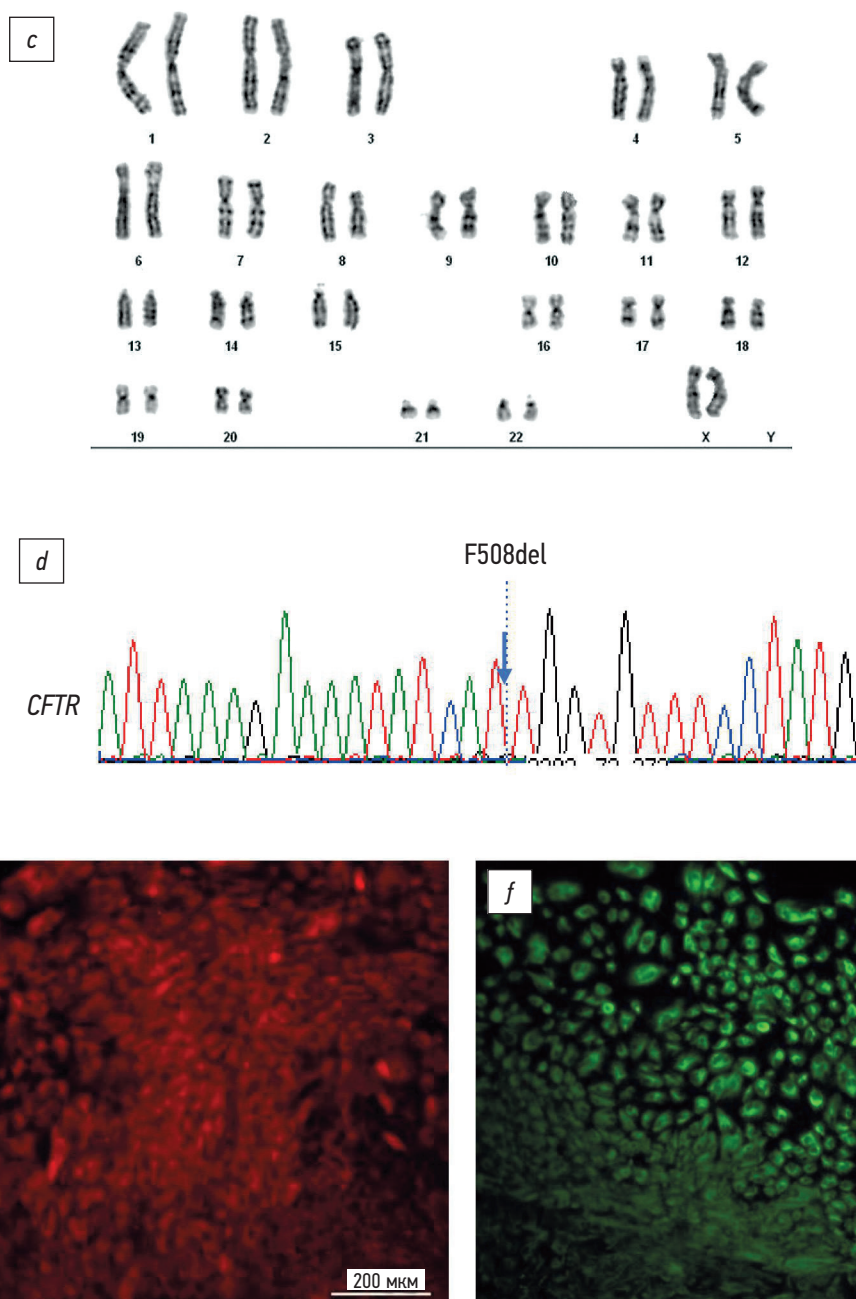


Рис. 3. Окончание.

Fig. 3. The End.

максимальной целевой и минимальной нецелевой (индекс off-target) активностью — как непосредственно на область мутации F508del, так и вблизи неё. Последовательности нРНК приведены в табл. 1, а схема их расположения относительно геномного локуса показана на рис. 4. При подборе оцОДН для репарации двуцепочечных разрывов ДНК, возникших в результате нуклеазной активности Cas9, руководствовались общими рекомендациями касательно общей длины молекулы и плеч гомологии [25], а также местом предполагаемого разрыва ДНК ферментом Cas9. Были подобраны два оцОДН длиной 127 нуклеотидов с плечами гомологии 91 и 36 нуклеотидов в зависимости от используемой нРНК; их последовательности

приведены в табл. 2. В итоге было создано восемь систем редактирования мутации F508del, каждая из которых включала один из трёх вариантов Cas9, один из трёх вариантов нРНК и один из двух вариантов оцОДН (табл. 3). В экспериментах в качестве отрицательного контроля редактирования также была использована плазмида с eSpCas9(1.1) и «нулевой» нРНК. Это плазмида из базы Addgene под номером 71814 содержит неспецифическую последовательность-«заглушку» длиной 24 нуклеотида с сайтами рестрикции для клонирования специфической нРНК. Все плазмиды были выделены с помощью набора ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kit (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя. Концентрацию

Таблица 1. Последовательности подобранных направляющих РНК для коррекции мутации F508del в гене *CFTR*
Table 1. Sequences of selected single guide RNAs for editing of F508del mutation in *CFTR* gene

Название	Последовательность (5'>3')	Индекс off-target
sgCFTR#sp1	ACCATTAAAGAAAATATCAT	40,1
sgCFTR#sp2	AATGGTGCCAGGCATAATCC	42,2
sgCFTR#sa	AATATCATTGGTGTTTCSTATG	81,3

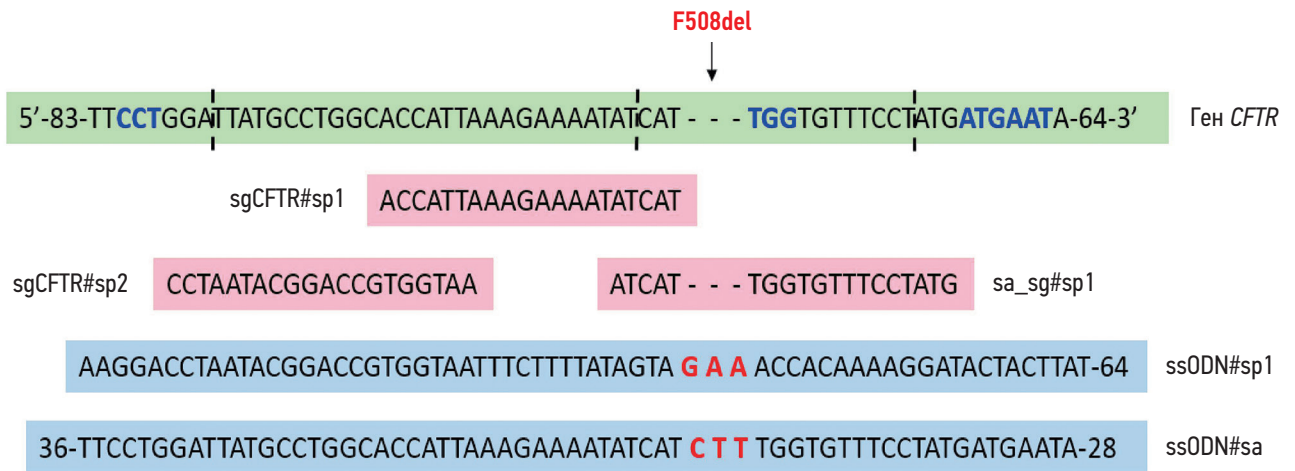


Рис. 4. Схема расположения подобранных направляющих РНК (sgCFTR#sp1, sgCFTR#sp2 и sgCFTR#sa, выделены розовым) и одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов (ssODN#sp1 и ssODN#sa, выделены голубым; красными буквами показаны три недостающих нуклеотида, которые будут добавлены в геном за счёт одноцепочечного олигодезоксирибонуклеотида при гомологичной репарации) относительно локуса *CFTR* (выделен зелёным; синими буквами показаны ПАМ-последовательности для направляющей РНК). Стрелкой указано положение мутации F508del, подлежащей коррекции.
Fig. 4. Scheme of the localization of selected single guide RNAs (sgCFTR#sp1, sgCFTR#sp2, and sgCFTR#sa, highlighted in pink) and single-stranded oligodeoxyribonucleotide (ssODN#sp1 and ssODN#sa, highlighted in blue; the missing three nucleotides that will be added to the genome by single-stranded oligodeoxyribonucleotide during homologous reparation are shown in red letters) in the *CFTR* locus (highlighted in green; PAM sequences for single guide RNAs are shown in blue letters). The arrow indicates the position of the F508del mutation to be corrected.

Таблица 2. Последовательности подобранных одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов для коррекции мутации F508del в гене *CFTR*
Table 2. Sequences of selected single-stranded oligodeoxyribonucleotides for editing of F508del mutation in *CFTR* gene

Название	Последовательность (5'-3')
ssODN#sp1	AAAAGTTTTCACATAGTTTCTTACCTCTTCTAGTTGGCATTGCTTGATGACGCTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAaagATGATATTTCTTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGGAA
ssODN#sa	TAAGCACAGTGGAAGAATTCATTCTGTTCTCAGTTTCTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATcttTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAAGCATGC

и чистоту ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США). ДНК имели приемлемую чистоту, подтверждаемую значениями $A_{260/230}$ и $A_{260/280}$ в диапазоне 1,8–2,2.

Трансфекция человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и человеческих индуцированных базальных клеток

Плазмиду, кодирующую нуклеазу и нРНК, и оОДН, вносили в чиПСК и чиБК методом электропорации

с помощью системы Neon Transfection System (Invitrogen, США). Клетки снимали с культурального пластика с помощью раствора Версена и ресуспендировали в среде OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, США) с добавкой Gluta-Max. В случае чиПСК в суспензию, содержащую 500 тыс клеток, вносили 7 мкг плазмиды и 100 пкмоль оОДН, проводили электропорацию с помощью наконечников-кувет объемом 100 мкл (Neon Transfection System 100 μ L; Thermo Fisher Scientific, США) со следующими настройками: напряжение 1400 мВ, амплитуда 5 с, 2 импульса, и высевали клетки в лунку 12-луночного планшета со средой E8 с добавлением 10% фетальной

Таблица 3. Редактирующие системы для экспериментов на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека и базальных клетках дыхательных путей человека

Table 3. Editing systems for human induced pluripotent stem cells and human induced airway basal stem cells experiments

№	Вариант нуклеазы	Вариант нРНК	Вариант оцОДН
1	SpCas9(1.1)	sgCFTR#sp1	ssODN#sp1
2	SpCas9(1.1)	sgCFTR#sp1	ssODN#sa
3	SpCas9(1.1)	sgCFTR#sp2	ssODN#sp1
4	SpCas9(1.1)	sgCFTR#sp2	ssODN#sa
5	SpCas9(HF4)	sgCFTR#sp1	ssODN#sp1
6	SpCas9(HF4)	sgCFTR#sp1	ssODN#sa
7	SaCas9	sgCFTR#sa	ssODN#sp1
8	SaCas9	sgCFTR#sa	ssODN#sa

Примечание: нРНК — направляющие РНК, оцОДН — одноцепочечные олигодезоксирибонуклеотиды.

Note: нРНК — single guide RNAs (sgRNAs), оцОДН — single-stranded oligodeoxyribonucleotides (ssODNs).

бычьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS) производства HyClone (США) и 5 мкМ Y-27632. В случае чиБК в суспензию, содержащую 90 тыс клеток, вносили 1,2 мкг плазмиды и 18 пкмоль оцОДН, проводили трансфекцию с помощью наконечников-кювет объёмом 10 мкл (Neon Transfection System 10 µL; Thermo Fisher Scientific, США) со следующими настройками: напряжение 1200 мВ, амплитуда 20 с, 2 импульса, и высевали в лунки 48-луночного планшета со средой для базальных клеток с добавлением 10% FBS и 5 мкМ Y-27632. Для контроля эффективности трансфекции также проводили трансфекцию клеток плазмидой рEGFP-C1 (Clontech, США). Через сутки после трансфекции среду заменяли на соответствующую свежую среду без добавления FBS и Y-27632. Через 48–72 ч после трансфекции клетки снимали с помощью раствора Версена. Клетки, трансфицированные плазмидой рEGFP-C1, после снятия ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и анализировали на проточном цитометре. Из остальных клеток выделяли ДНК с использованием набора Quick-DNA Miniprep Kit (Zymo Research, США) и анализировали таргетный локус с помощью глубокого таргетного секвенирования ампликонов.

Глубокое таргетное секвенирование

Используя в качестве матрицы ДНК, выделенную из чиПСК и чиБК, проводили ПЦР-амплификацию локуса гена *CFTR* в области мутации F508del с помощью Taq-полимеразы («Евроген», Россия) и специфических праймеров 5'-TGGAGCCTTCAGAGGGTAAAT-3' и 5'-TGGCATGCTTTGATGACGCT-3' на приборе Eppendorf 5332 Mastercycler Personal PCR Thermal Cycle (Eppendorf, Германия). Этапы и условия проведения ПЦР были следующими: 1 цикл денатурации (3 мин, 95 °C); 35 циклов, включающих денатурацию (30 с, 95 °C), отжиг праймеров (30 с, 60 °C) и элонгацию (30 с, 72 °C); 1 цикл финальной элонгации (5 мин, 72 °C). Глубокое таргетное секвенирование полученных ампликонов проводили в центре

коллективного пользования «Геном» ФГБНУ «МГНЦ» на приборе MiSeq System (Illumina, США).

Анализ эффективности редактирования

Данные секвенирования анализировали с помощью программы CRISPResso2 (<https://crispresso.pinellolab.partners.org/submission>). Для каждого образца рассчитывали следующие показатели: уровень НГСК (доля всех ридов с сохранившейся делецией F508del, но с внесённой другой делецией, инсерцией или точечной мутацией в окне редактирования, от суммарного числа ридов), уровень инделов (доля всех ридов с сохранившейся делецией F508del, но с внесённой другой делецией или инсерцией в окне редактирования) и уровень НГР (доля всех ридов с исправленной делецией F508del от суммарного числа ридов). Для оценки статистически значимой частоты внесения инделов и замен и коррекции мутации использовали непараметрический тест Краскела–Уоллиса для группового анализа и критерий Данна для попарных сравнений (GraphPad Prism 10.1.2).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты редактирования гена *CFTR* в области мутации F508del в трёх культурах человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

В экспериментах на чиПСК были протестированы все восемь редактирующих систем, приведённых в табл. 3.

В целом, несмотря на некоторый разброс в результатах, очевидна общая тенденция. Наивысшая эффективность НГСК во всех линиях наблюдается при использовании нуклеазы SpCas9(1.1), при этом в двух линиях (P1 и P7) она является более высокой при сочетании с нРНК sgCFTR#sp2, а в третьей линии (P2) — при сочетании

с sgCFTR#sp1. В среднем при сочетании с sgCFTR#sp1 НГСК колеблется от 3,5 до 6,2% аллелей для разных линий; при сочетании с sgCFTR#sp2 — от 3,2 до 11,3%. Остальные две нуклеазы демонстрируют более низкую

эффективность НГСК, которая статистически значимо не отличается от уровня НГСК, вызываемого нуклеазой с «нулевой» нРНК, и от нетрансфицированного контроля (рис. 5).

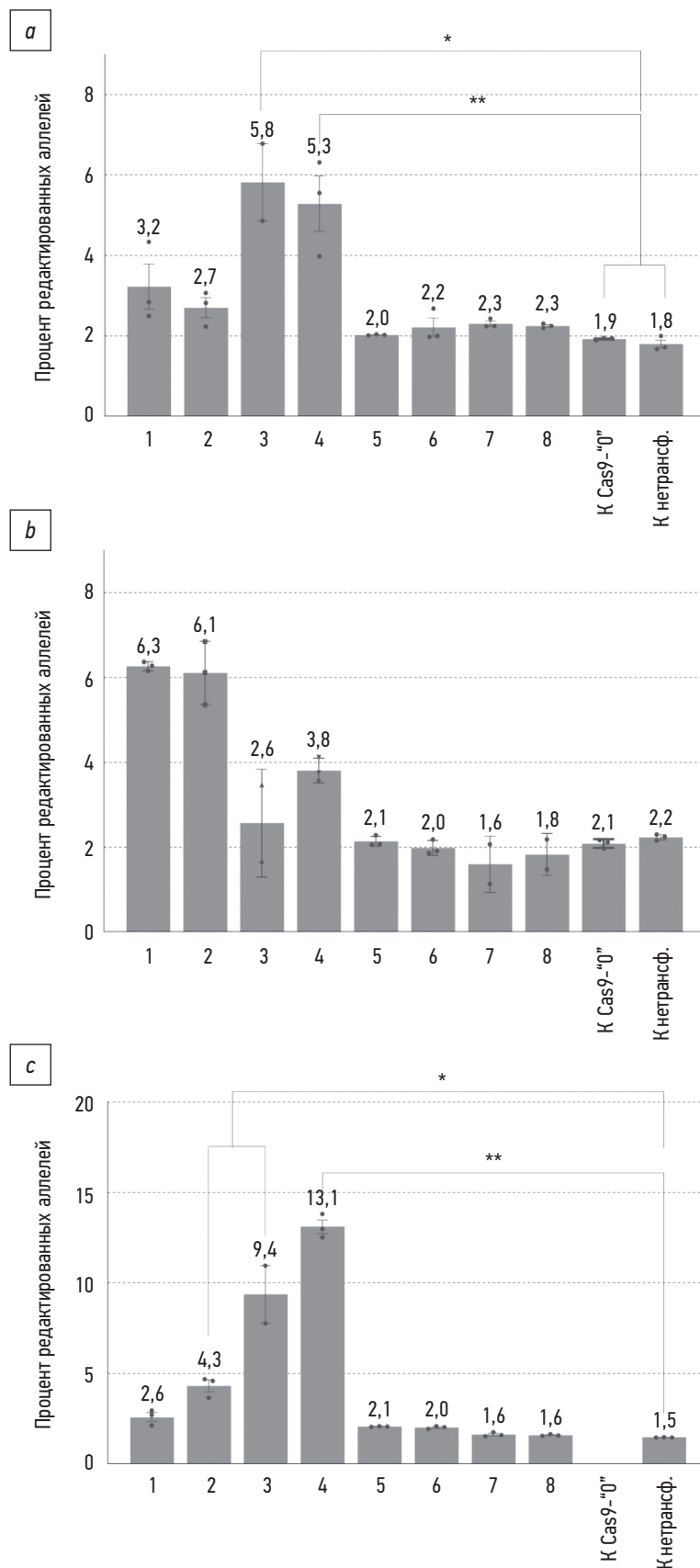


Рис. 5. Уровень нехомологичного соединения концов в трёх линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека: *а* — в линии P1L5, *б* — в линии P2L2, *в* — в линии P7L2. Номера на оси Y соответствуют номерам редактирующих систем в табл. 3. К-Cas9-“0” — отрицательный контроль редактирования, плазмиды с «нулевой» направляющей РНК, К нетрансф. — нетрансфицированный контроль. Данные приведены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n=3-6$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fig. 5. Non-homologous end joining levels in three human induced pluripotent stem cells lines: *a* — P1L5 line, *b* — P2L2 line, *c* — P7L2 line. The numbers on the Y-axis correspond to the numbers of the editing systems in Table 3. K-Cas9-“0” means the negative editing control, a plasmid with “null” single guide RNA. “К нетрансф.” means the untransfected control. Mean $\pm$ SEM ($n=3-6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Помимо общего уровня НГСК мы оценивали вклад только инделов (т.е. делеций и инсерций) в уровень НГСК, поскольку истинные точечные замены трудно обнаружить среди множества замен, возникающих в ходе амплификации и секвенирования. Уровни инделов более низкие, чем уровни НГСК, при этом они снижаются пропорционально и, по-видимому, отражают реальную частоту разрезания

ДНК, поскольку являются практически равными нулю в контрольных образцах. При использовании SpCas9(1.1) уровень инделов колеблется в среднем от 0,8 до 3,3% аллелей для разных линий при сочетании с sgCFTR#sp1; от 1,8 до 9,8% — при сочетании с sgCFTR#sp2. Остальные нуклеазы не вызывают образования инделов на статистически значимом уровне (рис. 6).

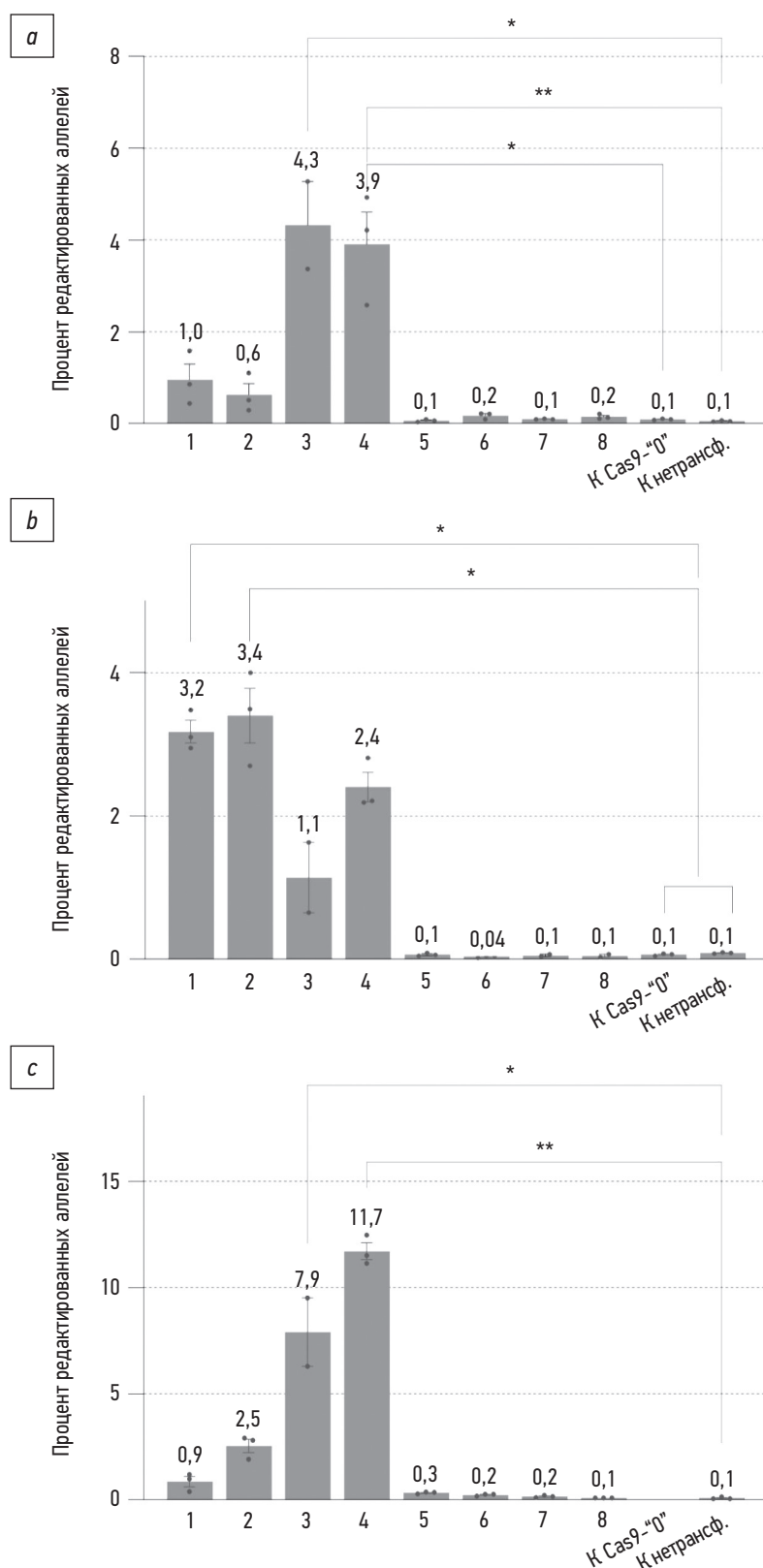


Рис. 6. Частота внесения инделов в локус гена *CFTR* в трёх линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека: *a* — в линии P1L5, *b* — в линии P2L2, *c* — в линии P7L2. Номера на оси Y соответствуют номерам редактирующих систем в табл. 3. К-Cas9-"0" — отрицательный контроль редактирования, плаزمид с «нулевой» направляющей РНК. К нетрансф. — нетрансфицированный контроль. Данные приведены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n=3-6$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fig. 6. Indels levels in *CFTR* locus in three human induced pluripotent stem cells lines: *a* — P1L5 line, *b* — P2L2 line, *c* — P7L2 line. The numbers on the Y-axis correspond to the numbers of the editing systems in Table 3. "K-Cas9-"0" means the negative editing control, a plasmid with "null" single guide RNA. "К нетрансф." means the untransfected control. Mean $\pm$ SEM ($n=3-6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Значения НГР приведены на рис. 7. Несмотря на то, что уровень НГСК и инделов был более высоким при сочетании нуклеазы SpCas9(1.1) с нРНК sgCFTR#sp2, значимый уровень гомологичной репарации наблюдается

только при сочетании этой нуклеазы с нРНК sgCFTR#sp1 и составляет для разных линий в среднем от 0,12 до 0,7%. По-видимому, это связано с тем, что разрыв ДНК, производимый в случае использования sgCFTR#sp2, расположен

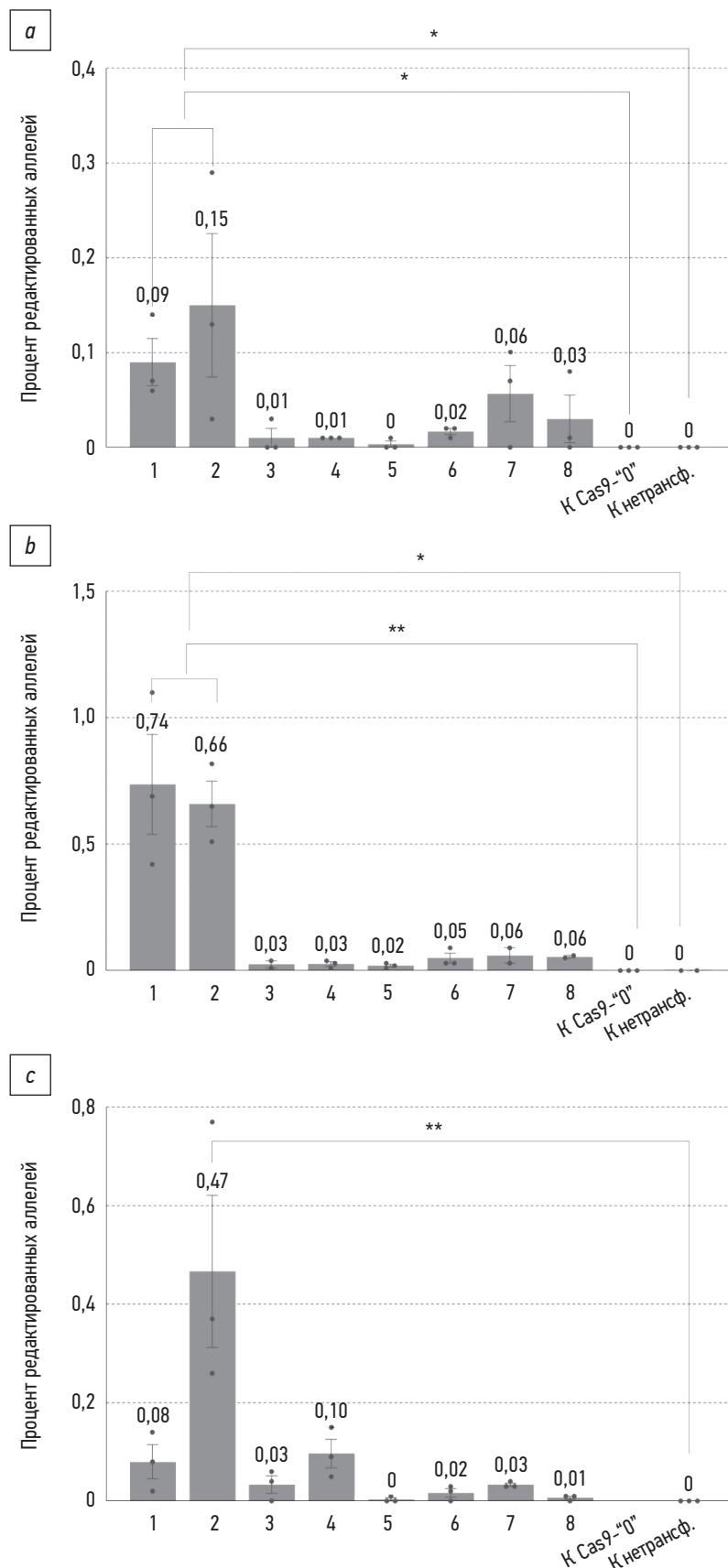


Рис. 7. Уровень направленной гомологичной репарации в трёх линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека: *a* — в линии P1L5, *b* — в линии P2L2, *c* — в линии P7L2. Номера на оси Y соответствуют номерам редактирующих систем в табл. 3. К-Cas9-"0" — отрицательный контроль редактирования, плаزمид с «нулевой» нРНК. К нетрансф. — нетрансфицированный контроль. Данные приведены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n=3-6$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fig. 7. Directed homologous repair levels in three human induced pluripotent stem cell lines: *a* — P1L5 line, *b* — P2L2 line, *c* — P7L2 line. The numbers on the Y-axis correspond to the numbers of the editing systems in Table 3. "K-Cas9-"0" means the negative editing control, a plasmid with "null" single guide RNA. "К нетрансф." means the untransfected control. Mean $\pm$ SEM ($n=3-6$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

далеко от мутации, и лишь небольшой фрагмент донорной молекулы оцОДН встраивается в место разрыва. Остальные нуклеазы дают ещё более низкие значения НГР, что коррелирует с низкой эффективностью внесения ими инделов в таргетный локус и, по всей видимости, обусловлено именно этим.

Низкую эффективность редактирования генома в чиПСК можно объяснить прежде всего низкой эффективностью трансфекции этих клеток. Средняя эффективность трансфекции составляла от 4 до 19% для трёх разных линий ($n=9$). Для оценки редактирующих систем (т.е. для понимания того, в каком проценте случаев редактирующая система, попавшая в клетку, вызывает то или иное событие в ДНК) была проведена нормализация полученных значений на процент трансфицированных клеток. В результате нормированная эффективность НГР составила от 0,2 до 6,6% аллелей в трансфицированных клетках.

Результаты редактирования гена *CFTR* в области мутации F508del в трёх культурах человеческих индуцированных базальных клеток

Для экспериментов на чиБК были выбраны те редактирующие системы, которые лучше всего себя показали на чиПСК, — системы №№ 1 и 2 в табл. 3.

На линиях P1 и P2 эффективность НГСК оказалась статистически значимой в сравнении с контролем только при использовании оцОДН ssODN#sa, составив 7,7 и 7,1% соответственно; на линии P7 уровень НГСК статистически значимо не отличается от контроля (рис. 8).

Как и в случае с чиПСК, уровень инделов представляется более точной оценкой частоты событий в ДНК и близок к нулю в контрольных образцах (рис. 9). На линии P1 уровень инделов статистически значим при использовании обоих оцОДН, составляя 3,7 и 5,7%. На линии P2 статистически значимый результат получен с применением ssODN#sa (4,4%), а на линии P7 — с применением ssODN#sp1 (3,2%).

Уровень НГР на двух линиях — P1 и P2 — оказался статистически значимым при использовании ssODN#sa, составив 5,9 и 3,8% соответственно, а на линии P7 — при использовании ssODN#sp1, составив 4,8% (рис. 10). Эти данные согласуются с уровнем НГСК и инделов (т.е. восстановление мутации произошло в тех образцах, где имело место эффективное разрезание ДНК), хотя наблюдается значительный разброс в технических и биологических репликах, который связан, по-видимому, со сложностью данных биологических объектов.

Аналогично результатам на чиПСК, для единообразия результаты редактирования генома чиБК были пересчитаны с поправкой на эффективность трансфекции, хотя в целом чиБК поддаются трансфекции более успешно (средняя эффективность составила от 26 до 37% для трёх

разных линий, $n=6$). В результате нормированная эффективность НГР составила в среднем от 13,1 до 19,8% аллелей в трансфицированных клетках.

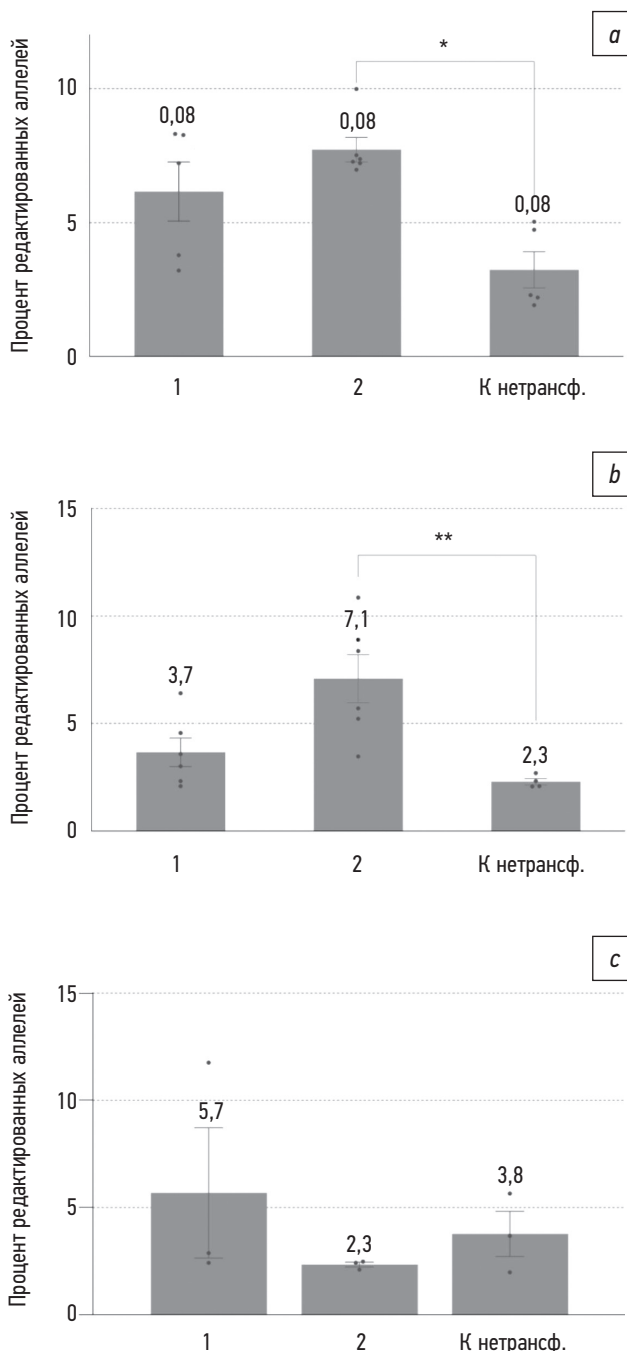


Рис. 8. Уровень негомологичного соединения концов в трёх линиях индуцированных базальных клеток дыхательных путей человека: *a* — в линии P1L5, *b* — в линии P2L2, *c* — в линии P7L2. Номера на оси Y соответствуют номерам редактирующих систем в табл. 3. К нетрансф. — нетрансфицированный контроль. Данные приведены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n=3-6$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fig. 8. Non-homologous end joining levels in three human induced airway basal stem cells lines: *a* — P1L5 line, *b* — P2L2 line, *c* — P7L2 line. The numbers on the Y-axis correspond to the numbers of the editing systems in Table 3. “К нетрансф.” means the untransfected control. Mean $\pm$ SEM ($n=3-6$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

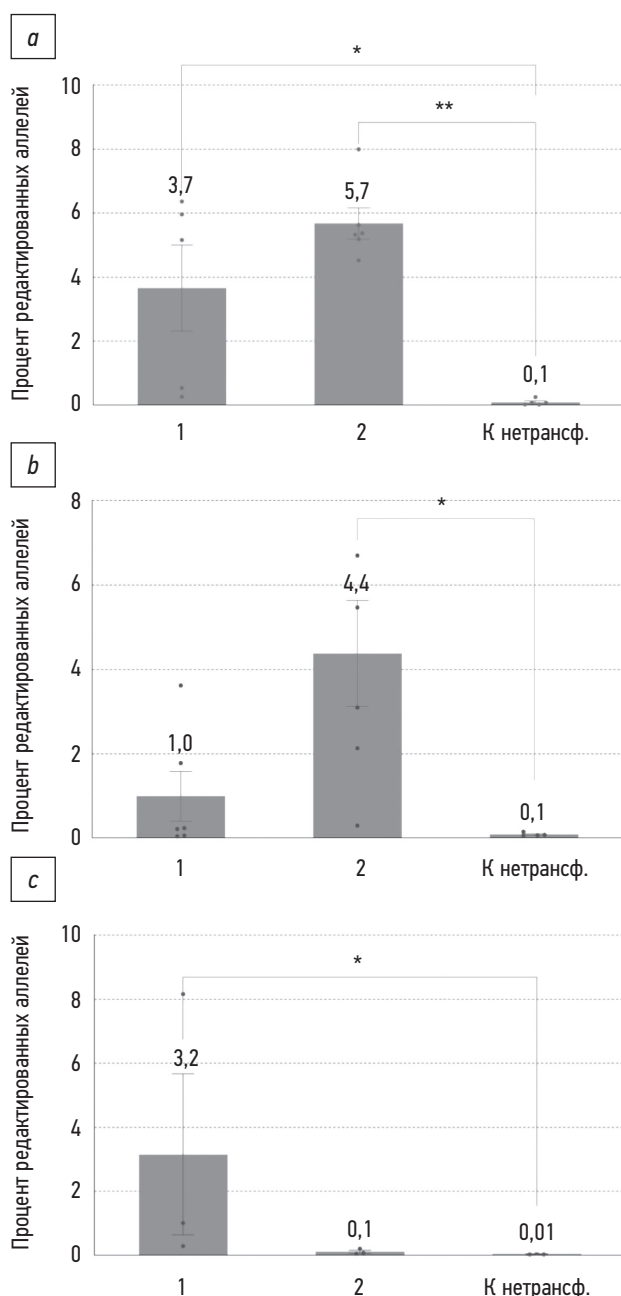


Рис. 9. Частота внесения инделов в локус гена *CFTR* в трёх линиях индуцированных базальных клеток дыхательных путей человека: *a* — в линии P1L5, *b* — в линии P2L2, *c* — в линии P7L2. Номера на оси Y соответствуют номерам редактирующих систем в табл. 3. К нетрансф. — нетрансфицированный контроль. Данные приведены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n=3-6$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fig. 9. Indels levels in *CFTR* locus in three human induced airway basal stem cells lines: *a* — P1L5 line, *b* — P2L2 line, *c* — P7L2 line. The numbers on the Y-axis correspond to the numbers of the editing systems in Table 3. "К нетрансф." means the untransfected control. Mean $\pm$ SEM ($n=3-6$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для данной работы выбраны три модифицированных варианта Cas9, которые обладают большей специфичностью по сравнению с SpCas9 дикого типа и ранее не были

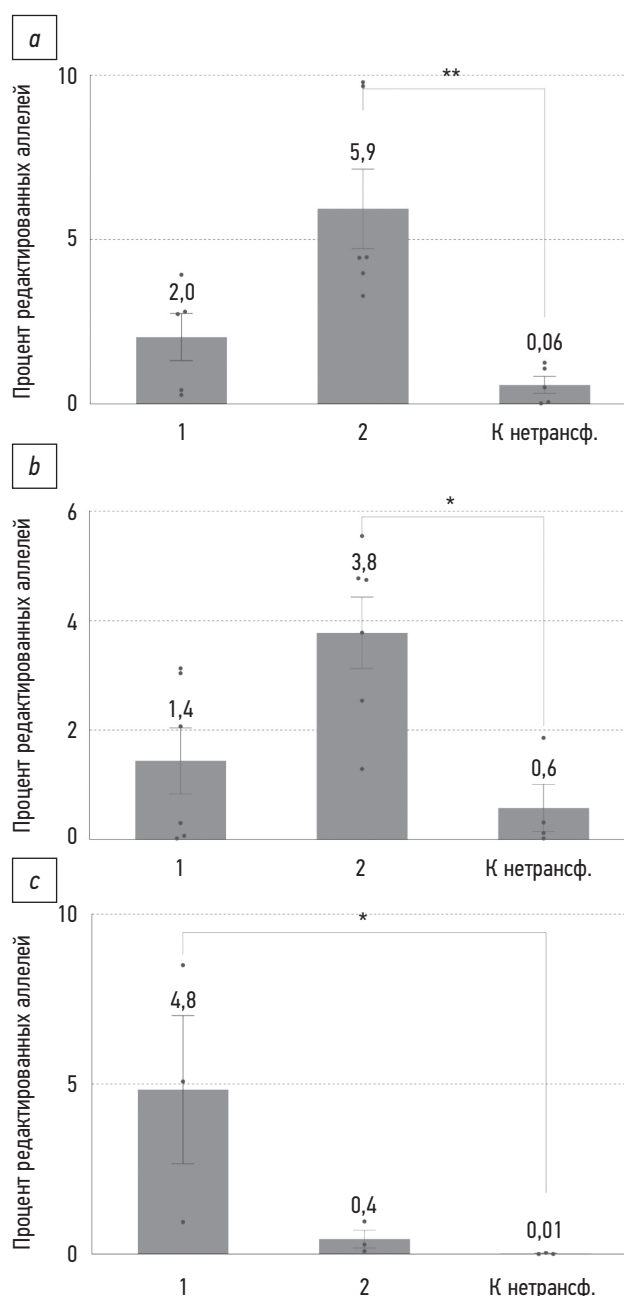


Рис. 10. Уровень направленной гомологичной репарации в трёх линиях индуцированных базальных клеток дыхательных путей человека: *a* — в линии P1L5, *b* — в линии P2L2, *c* — в линии P7L2. Номера на оси Y соответствуют номерам редактирующих систем в табл. 3. К нетрансф. — нетрансфицированный контроль. Данные приведены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n=3-6$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fig. 10. Directed homologous repair levels in three human induced airway basal stem cells lines: *a* — P1L5 line, *b* — P2L2 line, *c* — P7L2 line. The numbers on the Y-axis correspond to the numbers of the editing systems in Table 3. "К нетрансф." means the untransfected control. Mean $\pm$ SEM ($n=3-6$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

протестированы для мутации F508del. Разработаны и протестированы три варианта нРНК и два варианта оцОДН. В итоге в данной работе проведено сравнение эффективности восьми комбинаций Cas9, нРНК и оцОДН на шести разных клеточных культурах.

На линиях чиПСК из трёх вариантов нуклеазы наивысшую и статистически значимую эффективность расщепления ДНК показала нуклеаза eSpCas9(1.1). Необходимо ещё раз отметить, что хотя в классическом определении НГСК включает в себя делеции, инсерции и точечные замены, очевидным представляется тот факт, что при сравнении эффективности комбинаций стоит ориентироваться на уровень возникновения инделов в образцах. Это подтверждается литературными данными [26], а также наблюдаемым нами фактом, что именно относительные уровни инделов согласуются с относительными уровнями НГР. Восстановление мутации достоверно происходит именно в тех образцах, в которых наблюдался статистически значимый уровень внесения инделов в ДНК. Например, на линии P7 уровень инделов ниже, чем на двух других линиях, и низкий уровень НГР на ней же согласуется с этим наблюдением.

Уровень НГСК и инделов при сочетании нуклеазы eSpCas9(1.1) с нПНК sgCFTR#sp2 был в среднем более высоким, чем при использовании sgCFTR#sp1, однако уровень НГР оказался статистически значимым только в образцах с sgCFTR#sp1, что можно объяснить особенностью расположения сайта гибридизации нПНК относительно мутации. В итоге значимая эффективность редактирования мутации F508del в чиПСК наблюдалась при использовании данной комбинации — eSpCas9(1.1) с sgCFTR#sp1. С обоими оцОДН получены статистически значимые уровни редактирования: на линиях P1 и P7 более высокие значения наблюдались для ssODN#sa (2,9 и 1,3% аллелей в трансфицированных клетках соответственно), на линии P2 — для ssODN#sp1 (6,6% аллелей в трансфицированных клетках).

Таким образом, в результате экспериментов удалось исправить мутацию в гене *CFTR* в трёх культурах чиПСК. Тем не менее без клеточной сортировки полученная эффективность является недостаточной для разработки лечения муковисцидоза с помощью описанного метода. В связи с этим комбинации, которые лучше всего себя показали в редактировании мутации в чиПСК, были протестированы аналогичным образом на чиБК.

До сих пор опубликованы данные только о редактировании генома на первичных базальных клетках верхних дыхательных путей [19]. В лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ» разработан протокол дифференцировки чиПСК в базальные клетки дыхательных путей, экспрессирующие *CFTR* на высоком уровне [12], и в данной работе впервые показана возможность высокоэффективной коррекции мутации F508del в них. Этот результат является ценным, потому что на сегодняшний день чиБК представляются одной из наиболее перспективных морфологических платформ для разработки лечения муковисцидоза [11]: они сохраняются как долгоживущая, самообновляющаяся популяция базальных клеток (т.е. не истощаются в течение жизни реципиента); сохраняют способность давать дифференцированное потомство дыхательных путей того же количества и фенотипа, что и до коррекции и размножения; создают эпителий

дыхательных путей, экспрессирующий терапевтически значимые уровни функциональной активности каналов CFTR; не нарушают нормальную функцию дыхательных путей и не приобретают канцерогенного потенциала.

На всех трёх линиях чиБК при использовании обеих комбинаций мутация была успешно исправлена, однако значительный разброс в полученных значениях снижает статистическую значимость результатов. Действительно, как сложный биологический объект группа клеток подвергается трансфекции и редактированию в технических и биологических репликах с разной эффективностью, и этот разброс в значениях может значительно усиливаться в ходе ПЦР-амплификации и приготовления библиотек для секвенирования, которые тоже вносят некоторую долю ошибок в виде накопления тех или иных аллелей. В результате этого изначальные разбросы, которые могут быть не столь существенными, превращаются в достаточно большие на выходе. Таким образом, трудно говорить об абсолютной эффективности редактирования с помощью той или иной редактирующей системы, однако можно сравнивать их между собой.

В итоге в результате экспериментов на всех трёх линиях чиБК были получены следующие уровни редактирования мутации F508del: на линиях P1 и P2 уровень оказался статистически значимым при использовании ssODN#sa (19,8 и 13,9% аллелей в трансфицированных клетках), на линии P7 — при использовании ssODN#sp1 (13,1% аллелей в трансфицированных клетках). По литературным данным, для получения принципиальной клинической пользы достаточно 6–15% клеток с правильно функционирующим каналом CFTR в эпителиальном слое лёгких [27, 28]. Таким образом, данный метод может быть использован для дальнейшей разработки генотерапевтического лечения муковисцидоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана возможность коррекции мутации F508del в гене *CFTR* в клетках, полученных от пациентов с муковисцидозом, с помощью разработанной системы редактирования данной мутации на основе системы CRISPR/Cas9. Мутация исправлена, во-первых, в чиПСК с эффективностью до 6,6% аллелей в трансфицированных клетках и, во-вторых, в чиБК с высокой эффективностью — до 20% аллелей в трансфицированных клетках. Поскольку чиБК хорошо поддаются трансфекции и редактированию, а также могут быть получены в достаточном количестве из чиПСК, они являются перспективной платформой для разработки генотерапевтического лечения муковисцидоза.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Е.В. Кондратьева — большая часть культуральной и молекулярно-генетической работы, анализ полученных данных, написание статьи; А.Г. Демченко — создание чибК; О.В. Володина — участие в культуральной и молекулярно-генетической работе; О.П. Рыжкова, В.А. Ковальская — выполнение глубокого таргетного секвенирования; В.Ю. Табаков — создание линий фибробластов; А.В. Лавров, С.А. Смирнихина — дизайн эксперимента, экспертная оценка данных, участие в подготовке публикации.

Этическое утверждение. Все участники либо их официальные представители до включения в исследование добровольно подписали форму информированного согласия, утверждённую в составе протокола исследования этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (протокол № 1 от 28.01.2016 г.).

Благодарности. Мы благодарим Е.Л. Амелину (Научно-исследовательский институт пульмонологии, Москва) за медицинское сопровождение пациентов и предоставление биоптатов кожи

ADDITIONAL INFORMATION

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

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication). E.V. Kondrateva — most of the cell culture and molecular genetic work, analysis of the data, preparation and writing the text of the article; A.G. Demchenko — creation of the hiBCs; O.V. Volodina — participation in cell culture and molecular genetic work; O.P. Ryzhkova, V.A. Kovalskaia — deep target sequencing; V.Yu. Tabakov — creation of fibroblast cultures; A.V. Lavrov, S.A. Smirnikhina — experiment design, expert assessment of data, participation in the preparation of the publication.

Ethics approval. Written consent was obtained from all the study participants before the study screening in according to the study protocol approved by the local ethic committee of Research Centre for Medical Genetics N. 1, 28.01.2016.

Acknowledgments. We thank E.L. Amelina (The Research Institute of Pulmonology, Moscow) for medical support of the patients and provision of skin biopsies.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кондратьева Е.И., Воронкова А.Ю., Каширская Н.Ю., и др. Российский регистр пациентов с муковисцидозом: уроки и перспективы // Пульмонология. 2023. Т. 33, № 2. С. 171–181. EDN: DBHMER doi: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-171-181
2. Schneider E.K., Reyes-Ortega F., Li J., Velkov T. Can cystic fibrosis patients finally catch a breath with lumacaftor/ivacaftor? // Clin Pharmacol Ther. 2016. Vol. 101, N. 1. P. 130–141. doi: 10.1002/cpt.548
3. Kondrateva E., Demchenko A., Lavrov A., Smirnikhina S. An overview of currently available molecular Cas-tools for precise genome modification // Gene. 2021. Vol. 769. P. 145225. doi: 10.1016/j.gene.2020.145225
4. Hsu P.D., Zhang F. Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies // ACS Chem Neurosci. 2012. Vol. 3, N. 8. P. 603–610. doi: 10.1021/cn300089k
5. Yang H., Wang H., Shivalila C.S., et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering // Cell. 2013. Vol. 154, N. 6. P. 1370–1379. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.022
6. Charpentier M., Khedher A.H.Y., Menoret S., et al. CtlP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair // Nat Commun. 2018. Vol. 9, N. 1. P. 1133. doi: 10.1038/s41467-018-03475-7
7. Rees H.A., Yeh W.H., Liu D.R. Development of hRad51–Cas9 nickase fusions that mediate HDR without double-stranded breaks // Nat Commun. 2019. Vol. 10, N. 1. P. 2212. doi: 10.1038/s41467-019-09983-4
8. Pannunzio N.R., Watanabe G., Lieber M.R. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks // J Biol Chem. 2017. Vol. 293, N. 27. P. 10512–10523. doi: 10.1074/jbc.tm117.000374
9. Renaud J.B., Boix C., Charpentier M., et al. Improved genome editing efficiency and flexibility using modified oligonucleotides with TALEN and CRISPR–Cas9 nucleases // Cell Rep. 2016. Vol. 14, N. 9. P. 2263–2272. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.018
10. Wecht S., Rojas M. Mesenchymal stem cells in the treatment of chronic lung disease // Respirology. 2016. Vol. 21, N. 8. P. 1366–1375. doi: 10.1111/resp.12911
11. King N.E., Suzuki S., Barilla C., et al. Correction of airway stem cells: genome editing approaches for the treatment of cystic fibrosis // Hum Gene Ther. 2020. Vol. 31, N. 17–18. P. 956–972. doi: 10.1089/hum.2020.160
12. Demchenko A., Belova L., Balyasin M., et al. Airway basal cells from human-induced pluripotent stem cells: a new frontier in cystic fibrosis research // Front Cell Dev Biol. 2024. Vol. 12. P. 1336392. doi: 10.3389/fcell.2024.1336392
13. Schwank G., Koo B.K., Sasselli V., et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients // Cell Stem Cell. 2013. Vol. 13, N. 6. P. 653–658. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.002

14. Firth A.L., Menon T., Parker G.S., et al. Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs // *Cell Rep.* 2015. Vol. 12, N. 9. P. 1385–1390. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.062
15. Peters-Hall J.R., Coquelin M.L., Torres M.J., 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. Vol. 315, N. 2. P. L313–L327. doi: 10.1152/ajplung.00355.2017
16. 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. Vol. 17. P. 441–447. doi: 10.1016/j.omtm.2020.01.014
17. Hollywood J.A., Lee C.M., Scallan M.F., Harrison P.T. Analysis of gene repair tracts from Cas9/gRNA double-stranded breaks in the human CFTR gene // *Sci Rep.* 2016. Vol. 6. P. 32230. doi: 10.1038/srep32230
18. Ruan J., Hirai H., Yang D., et al. Efficient gene editing at major CFTR mutation loci // *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019. Vol. 16. P. 73–81. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.006
19. Vaidyanathan S., Salahudeen A.A., Sellers Z.M., et al. High-efficiency, selection-free gene repair in airway stem cells from cystic fibrosis patients rescues CFTR function in differentiated epithelia // *Cell Stem Cell.* 2020. Vol. 26, N. 2. P. 161–171.e4. doi: 10.1016/j.stem.2019.11.002
20. Djidrovski I., Georgiou M., Hughes G.L., et al. SARS-CoV-2 infects an upper airway model derived from induced pluripotent stem cells // *Stem Cells.* 2021. Vol. 39, N. 10. P. 1310–1321. doi: 10.1002/stem.3422
21. Wong A.P., Bear C.E., Chin S., et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein // *Nat Biotechnol.* 2012. Vol. 30, N. 9. P. 876–882. doi: 10.1038/nbt.2328
22. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity // *Science.* 2016. Vol. 351, N. 6268. P. 84–88. doi: 10.1126/science.aad5227
23. Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects // *Nature.* 2016. Vol. 529, N. 7587. P. 490–495. doi: 10.1038/nature16526
24. Ran F.A., Cong L., Yan W.X., et al. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9 // *Nature.* 2015. Vol. 520, N. 7546. P. 186–191. doi: 10.1038/nature14299
25. Richardson C.D., Ray G.J., DeWitt M.A., et al. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA // *Nat Biotechnol.* 2016. Vol. 34, N. 3. P. 339–344. doi: 10.1038/nbt.3481
26. Song B., Yang S., Hwang G.H., et al. Analysis of NHEJ-Based DNA repair after CRISPR-mediated DNA cleavage // *Int J Mol Sci.* 2021. Vol. 22, N. 12. P. 6397. doi: 10.3390/ijms22126397
27. Johnson L.G., Olsen J.C., Sarkadi B., et al. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis // *Nat Genet.* 1992. Vol. 2, N. 1. P. 21–25. doi: 10.1038/ng0992-21
28. Char J.E., Wolfe M.H., Cho H.J., et al. A little CFTR goes a long way: CFTR-dependent sweat secretion from G551D and R117H-5T cystic fibrosis subjects taking ivacaftor // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, N. 2. P. e88564. doi: 10.1371/journal.pone.0088564

REFERENCES

1. Kondrateva E.I., Voronkova A.Yu., Kashirskaya N.Yu., et al. Russian registry of patients with cystic fibrosis: lessons and perspectives. *Pulmonologiya.* 2023;33(2):171–181. EDN: DBHMER doi: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-171-181
2. Schneider EK, Reyes-Ortega F, Li J, Velkov T. Can cystic fibrosis patients finally catch a breath with lumacaftor/ivacaftor? *Clin Pharmacol Ther.* 2016;101(1):130–141. doi: 10.1002/cpt.548
3. Kondrateva E, Demchenko A, Lavrov A, Smirnikhina S. An overview of currently available molecular Cas-tools for precise genome modification. *Gene.* 2021;769:145225. doi: 10.1016/j.gene.2020.145225
4. Hsu PD, Zhang F. Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies. *ACS Chem Neurosci.* 2012;3(8):603–610. doi: 10.1021/cn300089k
5. Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013;154(6):1370–1379. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.022
6. Charpentier M, Khedher AHY, Menoret S, et al. CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. *Nat Commun.* 2018;9(1):1133. doi: 10.1038/s41467-018-03475-7
7. Rees HA, Yeh WH, Liu DR. Development of hRad51-Cas9 nickase fusions that mediate HDR without double-stranded breaks. *Nat Commun.* 2019;10(1):2212. doi: 10.1038/s41467-019-09983-4
8. Pannunzio NR, Watanabe G, Lieber MR. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2017;293(27):10512–10523. doi: 10.1074/jbc.tm117.000374
9. Renaud JB, Boix C, Charpentier M, et al. Improved genome editing efficiency and flexibility using modified oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 nucleases. *Cell Rep.* 2016;14(9):2263–2272. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.018
10. Wecht S, Rojas M. Mesenchymal stem cells in the treatment of chronic lung disease. *Respirology.* 2016;21(8):1366–1375. doi: 10.1111/resp.12911
11. King NE, Suzuki S, Barillà C, et al. Correction of airway stem cells: genome editing approaches for the treatment of cystic fibrosis. *Hum Gene Ther.* 2020;31(17-18):956–972. doi: 10.1089/hum.2020.160
12. Demchenko A, Belova L, Balyasin M, et al. Airway basal cells from human-induced pluripotent stem cells: a new frontier in cystic fibrosis research. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1336392. doi: 10.3389/fcell.2024.1336392
13. 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;13(6):653–658. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.002
14. 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;12(9):1385–1390. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.062
15. Peters-Hall JR, Coquelin M, Torres MJ, 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. doi: 10.1152/ajplung.00355.2017

16. Palmer DJ, Turner DL, 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;17:441–447. doi: 10.1016/j.omtm.2020.01.014

17. 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;6:32230. doi: 10.1038/srep32230

18. Ruan J, Hirai H, Yang D, et al. Efficient gene editing at major CFTR mutation loci. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019;16:73–81. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.006

19. Vaidyanathan S, Salahudeen AA, Sellers ZM, et al. High-efficiency, selection-free gene repair in airway stem cells from cystic fibrosis patients rescues CFTR function in differentiated epithelia. *Cell Stem Cell.* 2020;26(2):161–171.e4. doi: 10.1016/j.stem.2019.11.002

20. Djidrovski I, Georgiou M, Hughes GL, et al. SARS-CoV-2 infects an upper airway model derived from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2021;39(10):1310–1321. doi: 10.1002/stem.3422

21. Wong AP, Bear CE, Chin S, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nat Biotechnol.* 2012;30(9):876–882. doi: 10.1038/nbt.2328

22. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* 2016;351(6268):84–88. doi: 10.1126/science.aad5227

23. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;529(7587):490–495. doi: 10.1038/nature16526

24. Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature.* 2015;520(7546):186–191. doi: 10.1038/nature14299

25. Richardson CD, Ray GJ, DeWitt MA, et al. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):339–344. doi: 10.1038/nbt.3481

26. Song B, Yang S, Hwang GH, et al. Analysis of NHEJ-based DNA repair after CRISPR-mediated DNA cleavage. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6397. doi: 10.3390/ijms22126397

27. Johnson LG, Olsen JC, Sarkadi B, et al. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet.* 1992;2(1):21–25. doi: 10.1038/ng0992-21

28. Char JE, Wolfe MH, Cho HJ, et al. A little CFTR goes a long way: CFTR-dependent sweat secretion from G551D and R117H-5T cystic fibrosis subjects taking ivacaftor. *PLoS One.* 2014;9(2):e88564. doi: 10.1371/journal.pone.0088564

ОБ АВТОРАХ

* Кондратьева Екатерина Владимировна;

адрес: Россия, 115035, Москва, ул. Москворечье, д. 1;

ORCID: 0000-0003-0770-2569;

eLibrary SPIN: 4929-7581;

e-mail: ekaterina.kondratyeva@gmail.com

Демченко Анна Григорьевна;

ORCID: 0000-0002-4460-7627;

eLibrary SPIN: 3779-9060;

e-mail: demchenkoann@yandex.ru

Володина Ольга Владимировна;

ORCID: 0000-0001-7086-2288;

eLibrary SPIN: 4468-1184;

e-mail: volodold@gmail.com

Рыжкова Оксана Петровна, канд. мед. наук;

ORCID: 0000-0003-1285-9093;

eLibrary SPIN: 8146-7111;

e-mail: ryzhkova.oksana85@gmail.com

Ковальская Валерия Александровна;

ORCID: 0000-0002-8728-8574;

e-mail: Mikhailova.v.a@mail.ru

Табakov Вячеслав Юрьевич, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0003-0291-153X;

eLibrary SPIN: 9536-1608;

e-mail: vyutab@yandex.ru

Лавров Александр Вячеславович, канд. мед. наук;

ORCID: 0000-0003-4962-6947;

eLibrary SPIN: 4926-8347;

e-mail: avlavrov@yandex.ru

AUTHORS' INFO

* Ekaterina V. Kondratyeva;

address: 1 Moskvorechie street, 115035 Moscow, Russia;

ORCID: 0000-0003-0770-2569;

eLibrary SPIN: 4929-7581;

e-mail: ekaterina.kondratyeva@gmail.com

Anna G. Demchenko;

ORCID: 0000-0002-4460-7627;

eLibrary SPIN: 3779-9060;

e-mail: demchenkoann@yandex.ru

Olga V. Volodina;

ORCID: 0000-0001-7086-2288;

eLibrary SPIN: 4468-1184;

e-mail: volodold@gmail.com

Oxana P. Ryzhkova, MD, Cand. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0003-1285-9093;

eLibrary SPIN: 8146-7111;

e-mail: ryzhkova.oksana85@gmail.com

Valeriia A. Kovalskaia;

ORCID: 0000-0002-8728-8574;

e-mail: Mikhailova.v.a@mail.ru

Vyacheslav Yu. Tabakov, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0003-0291-153X;

eLibrary SPIN: 9536-1608;

e-mail: vyutab@yandex.ru

Alexander V. Lavrov, MD, Cand. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0003-4962-6947;

eLibrary SPIN: 4926-8347;

e-mail: avlavrov@yandex.ru

Смирнихина Светлана Анатольевна, канд. мед. наук,
доцент;
ORCID: 0000-0002-1558-3048;
eLibrary SPIN: 6884-6170;
e-mail: smirnikhinas@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Svetlana A. Smirnikhina, MD, Cand. Sci. (Medicine), Associate
Professor;
ORCID: 0000-0002-1558-3048;
eLibrary SPIN: 6884-6170;
e-mail: smirnikhinas@gmail.com