

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.218:577.182.99:577.152.1

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-292-298>

Поступила в редакцию 16.03.2020

Received 16.03.2020

Д. А. Ермоленко, А. Ю. Мисюкевич, А. Г. Полешко, И. Д. Волотовский

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА МУКОВИСЦИДОЗА – НАСЛЕДСТВЕННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

Аннотация. Проведен молекулярно-генетический анализ ДНК больного муковисцидозом с целью определения природы мутации, лежащей в основе данного заболевания. ДНК была получена из фибробластов больного муковисцидозом согласно общепринятым методикам. Сконструированы праймеры к фрагменту ДНК в 10-м экзоне гена *CFTR*, в котором локализована одна из часто встречаемых мутаций – F508del, обуславливающая муковисцидоз. С помощью ПЦР-амплификации получен фрагмент ДНК, в котором содержится данная мутация. Электрофорез амплифицированного материала выявил один продукт ДНК размером около 153 пар нуклеотидов. Методом секвенирования по Сэнгеру установлена природа и последовательность нуклеиновых оснований выделенного фрагмента ДНК. Сравнение данных о нуклеотидной последовательности, полученных после секвенирования фрагмента у больного муковисцидозом, с аналогичными данными здорового человека показало наличие мутации на уровне 10-го экзона в положении 1521–1523 кодирующей последовательности гена *CFTR*, представляющей собой выпадение трех пар нуклеотидов, которая, по общепринятым представлениям, относится к мутации F508del. Анализ данных секвенирования позволил отнести данную мутацию к разряду компаундных гетерозигот.

Ключевые слова: аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, муковисцидоз, *CFTR*, мутация F508del, компаундная гетерозигота

Для цитирования: Молекулярно-генетическая природа муковисцидоза – наследственного заболевания человека / Д. А. Ермоленко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 292–298. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-292-298>

Darya A. Ermolenko, Alla Y. Misiukevich, Anna G. Poleshko, Igor D. Volotovski

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

MOLECULAR-GENETIC NATURE OF CYSTIC FIBROSIS, A HUMAN HEREDITARY DISEASE

Abstract. Molecular genetic analysis of DNA patient with cystic fibrosis to determine the nature of mutation to be the reason of this disease. DNA was obtained from fibroblast of given patient according to generally known methods. For that a pair of primers to DNA fragment in 10 exon were a mutation conditioning cystic fibrosis was designed. With help PCR-amplification an amplicon containing desired mutation. The electrophoresis of amplified material one band in DNA of which about 153 nucleotides are contained has shown. The nature and sequence of nucleotides in this fragments were established. A comparison of sequence date for this fragments of cystic fibrosis patient with date of health human has shown existence of mutation on the level of 10 exons at position 1521–1523 of the coding sequence of the *CFTR* gene, which is the loss of 3 pairs of nucleotides, which, according to conventional ideas, refers to the F508del mutation. The analysis sequence date allowed attribute to compound heterozygotes.

Keywords: autosomal recessive hereditary disease, cystic fibrosis, *CFTR*, F508del mutation, compound heterozygote

For citation: Ermolenko D. A., Misiukevich A. Y., Poleshko A. G., Volotovski I. D Molecular-genetic nature of cystic fibrosis, a human hereditary disease. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 292–298 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-292-298>

Введение. Муковисцидоз – аутосомно-рецессивное наследственное заболевание [1]. Клинически муковисцидоз характеризуется поражением легких, а также желудочно-кишечного тракта, в основе которого лежит синдром мальабсорбции. При данном заболевании эпителиальные клетки утрачивают способность к нормальному транспорту воды вследствие дисбаланса ионов хлора. Установлено, что муковисцидоз связан с мутацией в определенном гене, кодирующем белок *CFTR* (от *англ. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), или МВТР – муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости, который ответственен за транспорт ионов хлора и бикарбонатов [2]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, в среднем в мире муковисцидоз встречается с частотой 1 случай на 2500 новорожденных.

Мутации гена *CFTR* подразделяют на 6 классов, определяющих тяжесть проявления клинической картины заболевания на белковом уровне. Принято считать, что мутации I–III классов приводят к тяжелым нарушениям функционирования белка *CFTR* – к классическому фенотипу проявления муковисцидоза, в то время как мутации IV–VI классов вызывают частичные «мягкие» нарушения функции транспортера, что клинически проявляется в более легких формах заболевания [3].

Ген был идентифицирован в 1989 г. [4]. Показано, что он локализован на длинном плече 7-й хромосомы, имеет протяженность 250 000 пар оснований, включает в себя 27 экзонов, кодирующих белковый продукт длиной 1480 аминокислот [5]. Известно порядка 2000 мутаций, вызывающих данное заболевание, среди которых к наиболее часто встречающейся, в том числе в Республике Беларусь, относят мутацию F508del (делеция фенилаланина в 508-м положении). Относительная доля этой мутации составляет около 66 % от всех выявленных мутаций в гене *CFTR*, приводящим к манифестации данного заболевания. У 35 % больных муковисцидозом указанная мутация находится в гетерозиготном состоянии, у 38 % – в гомозиготном. Оказывается, что замена (делеция) всего лишь одной аминокислоты в гене транспортного белка сопровождается посттрансляционной модификацией макромолекулы транспортера, в результате чего белок *CFTR* становится структурно нестабильным и функционально неполноценным.

Прогресс в молекулярной генетике привел к разработке оригинального метода генетической коррекции строения генов, получившего название CRISPR/Cas9-технологии [6]. Данная технология позволяет элиминировать поврежденный участок гена и заменять его исходной неповрежденной нуклеотидной последовательностью. В ряде работ последних лет описаны попытки генетического редактирования муковисцидоза. Однако прежде чем приступить к генетическому редактированию того или иного гена, следует определить точную локализацию мутации, которая проводится в несколько стадий.

Цель настоящей работы – определение природы мутации в гене *CFTR* у больного (мужской пол, 20 лет), приводящая к нарушению нормального функционирования транспортного белка *CFTR*, ответственного за развитие тяжелого наследственного заболевания – муковисцидоза, с целью последующего проведения CRISPR/Cas 9 редактирования мутированного гена.

Объекты и методы исследования. Объект исследования. В качестве объекта исследования использовали фибробласты кожи. В центре «Клеточные технологии» Института биофизики и клеточной инженерии в условиях операционной был произведен забор фрагмента кожи размером 2–3 мм у пациента мужского пола 20 лет с диагнозом «муковисцидоз», обслуживавшегося в 9-й больнице г. Минска.

В качестве контроля в работе использовали образцы ДНК, выделенной из фибробластов здорового человека.

Выделение и культивирование фибробластов. В Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси был выбран следующий подход. Из кожи (папиллярного слоя дермы) пациента выделяли небольшой фрагмент размером 2×3 мм и помещали его в чашку Петри с ростовой средой. Затем чашку накрывали предметным стеклом с отверстием в центре и помещали ее в инкубатор на 2 недели. Ростовую среду готовили на основе DMEM (среда Дульбекко) с добавлением 10 %-ной фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Как только в чашке Петри образовывался сливной монослой, фрагмент переносили в другую чашку с ростовой средой того же состава для получения вторичного монослоя. Манипуляцию с эксплантом повторяли несколько раз. Каждый образовавшийся монослой снимали и пересеивали в ростовую среду, содержащую DMEM/F12 в соотношении 3:1 и 10 % от общего объема ФБС. Данный способ позволял в течение 1 мес. накопить в культуре большое количество пролиферативно активных фибробластов.

В стационарной стадии роста культура фибробластов была представлена морфологически однородными клетками, имеющими вытянутую форму. Результаты иммунофенотипического анализа, полученные в культуре фибробластов дермы больного муковисцидозом, показали отсутствие значимых различий в уровне экспрессии основных маркеров фибробластов кожи по сравнению с фибробластами здоровых доноров. CD90+ экспрессировали 92 % клеток, CD44+ – 95 %, CD105+ – 76 %, CD73+ – 92 %, виментин – 97 %, фибронектин – 28 %. Кроме того, фибробласты экспрессировали белок нестин (3 %) и маркер эпителиальных клеток – K19 (4 %).

Выделение геномной ДНК из клеток. ДНК из фибробластов выделяли и очищали с помощью набора NucleoSpin®Tissue по протоколу производителя (Macherey-Nagel, США). Протокол включает четыре ключевых (основных) шага: клеточный лизис, адсорбцию нуклеиновых кислот, отмывку и десорбцию (элюцию).

Разрушение клеточной структуры (лизис клеток) достигалось путем инкубации образцов в количестве 10^7 клеток фибробластов в растворе, содержащем SDS, входящего в состав буфера T1, и протеиназу К, при 70°C .

Связывание ДНК с силикагелевой мембраной колонок NucleoSpin® Tissue Column происходило после добавления к лизату большого количества хаотропных солей, входящих в состав буфера В3 с добавлением абсолютного этанола. Нежелательные примеси удаляли на стадии промывания с помощью двух буферных растворов: ВW, В5 (wash buffer), которые содержат вещества, не дающие им адсорбироваться.

Связанную с мембраной ДНК отмывали в 30 мкл буфера ВЕ для элюции (выведения в раствор). Растворенную в буфере ДНК хранили при -20°C .

ПЦР-амплификация целевого участка CFTR. Поскольку самая частая мутация гена CFTR F508del локализована в его 10-м экзоне, использовали метод ПЦР-амплификации для выделения и клонирования целевого фрагмента гена, в котором, предположительно, располагается мутация.

Праймеры, фланкирующие исследуемый участок, подбирали с помощью программы Primer-BLAST, основываясь на нуклеотидной последовательности из базы данных GenBank. Праймеры были синтезированы в ОДО «Праймтех».

ПЦР проводили в термоциклере Biometra T1 Thermoblock Thermal Cycler PCR DNA с использованием набора DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, США).

Реакционная смесь включала 12,5 мкл готового раствора Dream Taq PCR Master Mix (2X), в состав которого входили ДНК-полимераза, 2×ПЦР буфер, раствор 0,4 мМ мононуклеотидтрифосфатов (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) в свободном виде, 0,4 мМ MgCl_2 , по 16 рМ прямого и обратного праймеров, 0,5 нг матричной ДНК, Milli-Q вода. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл.

Программа для термоциклера была следующей: предварительная денатурация при 95°C – 5 мин. Далее 35 циклов: денатурация при 95°C – 30 с, отжиг праймеров при 56°C – 30 с, элонгация при 72°C – 1 мин. Окончательная элонгация: при 72°C – 5 мин, при 10°C – 10 мин. Приготовление инкубационной смеси проводили в стерильных условиях под ламинатором.

Оценка результатов ПЦР. Детекцию продукта амплификации проводили методом гель-электрофореза в 2 %-ном агарозном геле.

Электрофоретический анализ полученных ампликонов осуществляли в агарозном геле по стандартному протоколу [7].

После завершения ПЦР-реакции проводили электрофоретическое разделение пробы в 2 %-ном агарозном геле в буфере TBE 1X (89 мМ Трис, 89 мМ борной кислоты, 2,5 мМ ЭДТА, pH 8,3).

Анализируемый образец смешивали с красителем для нанесения ДНК на гель 6X Loading Dye (в состав которого входили: 2,5 % Ficoll®-400, 10 мМ ЭДТА, 3,3 мМ Трис-HCl, 0,08 % SDS, 0,02 % Краситель 1, 0,001 % Краситель 2, pH 8 при 25°C) для визуализации контроля за матрицей фрагментов ДНК в геле так, чтобы его итоговая концентрация в пробе для нанесения была 1X, и вносили в лунки агарозного геля. Разделение ДНК-фрагментов проводили при напряжении 65 В в течение 40–60 мин. Визуализация геля осуществлялась методом детекции флуоресценции в ультрафиолетовом свете на приборе для документирования гелей «ГельДок 2000» (Bio-Rad, США).

Выделение ПЦР-фрагментов из агарозного геля. После электрофоретического разделения амплифицированный материал был представлен на гель-электрофореграмме в виде отдельной полосы. Затем, согласно протоколу Monarch DNA Extraction Gel Kit (New England Biolabs, США), полосу, содержащую нужный фрагмент, вырезали, взвешивали и к материалу добавляли Dessolving Buffer в соотношении 4:1 (объем раствора к массе полоски геля). Полученную смесь инкубировали в пробирке объемом 1,5 мл в течение 10 мин при 55°C в термошейкере до растворения геля и переносили на колонку для очистки ПЦР-продукта и центрифугировали 1 мин

при 12 500 об/мин. Затем оставшийся в колонке материал дважды промывали Wash Buffer (по 200 мкл) и центрифугировали 1 мин при 12 500 об/мин. Колонку переносили в новую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, добавляли в центр ее мембраны 10 мкл Elution Buffer (буфер для элюции), инкубировали в течение 1–2 мин при комнатной температуре, центрифугировали. Очищенную ДНК использовали для последующего секвенирования.

Пробоподготовка очищенных ПЦР-продуктов к секвенированию (секвенирующая реакция).

Анализ полученных последовательностей ПЦР-продуктов (образцов), выделенных из агарозного геля, производили методом секвенирования по Сэнгеру с использованием ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США) – генетического анализатора флуоресцентно-меченых фрагментов ДНК, разделяемых с помощью капиллярного гель-электрофореза, используя, согласно рекомендациям производителя, набор BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Для секвенирующей реакции использовали 1 нг очищенного продукта ПЦР.

Реакционная смесь для проведения секвенирующей ПЦР-реакции включала 4 мкл Reaction Mix, 2 мкл Seg Buffer, по 2 мкл раствора праймера в концентрации 1,6 пмоль/мкл, 1 мкл геномной ДНК, 11 мкл воды. Условия проведения реакции были следующие: при 96 °С – 1 мин, далее 25 циклов: при 96 °С – 10 с, при 50 °С – 5 с, при 60 °С – 4 мин на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR (BioRad, США).

После секвенирования производили очистку продукта реакции смесью этанол/ЭДТА. Смесь объемом 20 мкл переносили в стерильные центрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляли по 5 мкл 0,125М ЭДТА, 60 мкл абсолютного (96 %) этанола, аккуратно перемешивали на вортексе, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, затем осаждали при –4 °С со скоростью 3000 g в течение 45 мин. После удаления супернатанта в пробирку вносили 60 мкл 70 %-ного спирта и центрифугировали 15 мин со скоростью 3000 g. Затем надосадочную жидкость удаляли, очищенный образец высушивали при комнатной температуре и хранили при –4 °С.

Исследуемый материал растворяли в 25 мкл формамида, денатурировали в течение 5 мин при 95 °С и немедленно охлаждали в морозильной камере. Затем пробы загружали в генетический анализатор для капиллярного электрофореза продуктов секвенирующей реакции.

Результаты и их обсуждение. С использованием программы Primer-BLAST были сконструированы олигонуклеотидные праймеры (см. таблицу), фланкирующие целевой участок гена *CFTR*, предположительно несущий мутацию del508F.

Характеристики специфических прямых и обратных пар праймеров, использованных в работе для проведения ПЦР

Characteristics of specific direct and reverse pairs of primers used in the work for PCR

Праймер	Последовательность 5'-3'	Длина праймера, п. н.	T_m	GC, %	ПЦР-матрица
10F	ACTGGAGCCTTCAGAGGGTAA	21	59,59	55,00	ДНК
10R	TGGCATGCTTTG ATGACGCT	20	61,49	47,62	ДНК

Примечание. Размер продукта – 153 п. н.

Отобранная пара праймеров (NCBI Primer-BLAST) располагается в пределах 10-го экзона гена *CFTR* и обеспечивает в ходе транскрипции образование исходного ПЦР-продукта (ампликона) размером 153 нуклеотидов. Праймеры не образуют термодинамически стабильные продукты на последовательностях других генов (рис. 1). Длина праймеров составляет 21 и 20 нуклеотидов, а температура их плавления отличается приблизительно на 1°.

В результате проведения прямого секвенирования и биоинформатического анализа данных у пациента П. обнаружена мутация в гене *CFTR*, патологический вариант 1521_1523delCTT (выпадение трех пар нуклеотидов в положении 1521–1523 гена *CFTR*). Мутация F508del является наиболее распространенной во всех популяциях мутаций и приводит к нарушению созревания белка *CFTR* и его полному отсутствию на поверхности клеток: нарушается фолдинг белка в плазматической мембране и работа цАМФ-зависимого канала, отвечающего за регуляцию

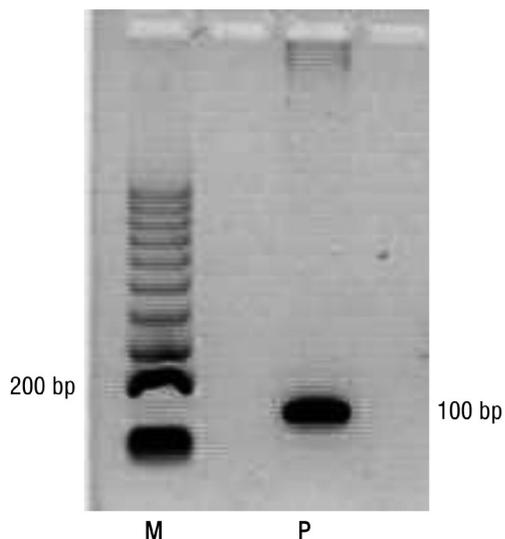


Рис. 1. Визуализация амплифицированного участка 10-го экзона гена *CFTR*. P – электрофореграмма ПЦР-продукта; M – электрофорез маркерных ДНК-фрагментов (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder)

Fig. 1. Visualization of amplified region 10 of the exon of the *CFTR* gene. P – electrophoregram of the PCR product; M – electrophoresis of marker DNA fragments (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder)

последовательности разной нуклеотидной структуры, что выражается в наложении (перекрытии) спектральных профилей (рис. 2).

Характер различий нуклеотидной структуры последовательностей связан не с отдельными нуклеотидными заменами, а с делецией/инсерцией нуклеотидных оснований, что приводит к смещению структуры последовательностей при их сопоставлении. Визуальным выражением такого явления на электрофореграммах является наличие начального участка с «чистыми» неперекрывающимися спектральными профилями и следующим за ним участком со «смешанными» перекрывающимися спектральными профилями (наложение пиков разной окраски).

Биоинформационный анализ электрофореграмм показал, что спектральное перекрытие обусловлено делецией/инсерцией размером в три нуклеотидных основания. Таким образом, спектральные пики более длинной цепи (последовательности) на электрофореграмме были постоянно смещены (по мере возрастания порядкового номера последовательности) на три нуклеотидные позиции относительно аналогичных позиций, представленных в короткой цепи.

Сравнительный анализ с депонентами базы данных NCBI Blast позволил установить, что в одной из последовательностей отмечалась делеция трех нуклеотидов «СТТ», соответствующая

транспорта ионов хлора и натрия через мембраны эпителиальных клеток легких, поджелудочной железы и ЖКТ, репродуктивной системы и печени. Мутации в гене *CFTR* приводят к нарушению процесса секреции, вследствие чего секреты желез становятся вязкими и их выделение затрудняется, что приводит к патологическим изменениям в жизненно важных органах.

Результаты секвенирования анализировали в программном обеспечении Sequencing Analysis 5.1.1 (Applied Biosystems, США).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей. Полученные последовательности анализировали путем их сравнения с последовательностью из базы данных GenBank, используя пакет программ BLAST.

Согласно проведенному анализу, исследуемая нуклеотидная последовательность может быть идентифицирована как нуклеотидная последовательность гена *CFTR* на основании 90 %-ного сходства (максимальная идентичность – 90 %).

Результаты секвенирования гена *CFTR*. Предварительный анализ данных секвенирования в программном обеспечении Sequencing Analysis 5.1.1 (Applied Biosystems) показал, что образец электрофореграммы является смешанным, т. е. содержит одновременно последовательности разной нуклеотидной структуры, что выражается в наложении (перекрытии)

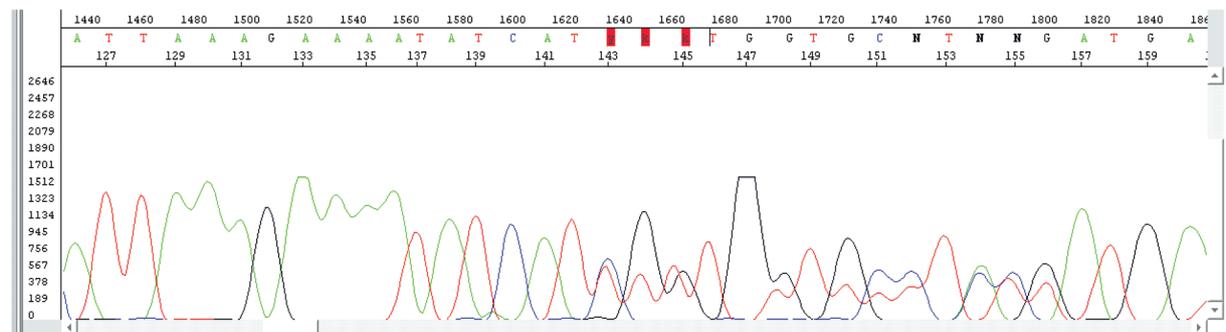


Рис. 2. Данные, полученные в результате автоматического секвенирования по Сенгеру

Fig. 2. Data obtained as a result of automatic sequencing of the *CFTR* gene by SangerExon

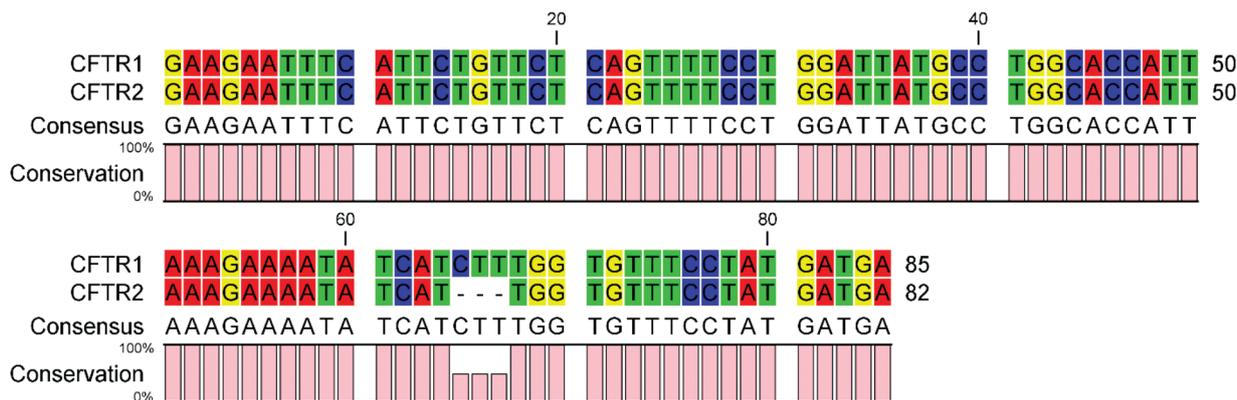


Рис. 3. Расшифровка полученной нуклеотидной последовательности двойной цепи ДНК больного муковисцидозом в области 10-го экзона гена *CFTR*

Fig. 3. Decryption of the obtained nucleotide sequence of the double DNA chain of a patient with cystic fibrosis from 10 exons of the *CFTR* gene

мутации F508del (муковисцидоз) – номер в базе данных NCBI rs113993960. Вторая последовательность характеризовалась отсутствием данной делеции и соответствовала аллелю дикого типа (норма). Таким образом, в случае происхождения последовательностей от одного биологического образца (одного и того же индивида) генотип данного образца по изученному локусу (10-й экзон гена *CFTR*) является гетерозиготным и описывается как CFTR-E10^N/CFTR-E10^{F508del} (рис. 3). Следует подчеркнуть, что кроме выпадения трех пар оснований del508CTT других мутаций как в аллеле CFTR-E10^N, так и в аллеле CFTR-E10^{F508del} не выявлено, что визуально выражалось в отсутствии в «чистых» регионах электрофореграммы единичных налагающихся друг на друга пиков разной окраски при секвенировании как с праймером 10F, так и с праймером 10R.

Заключение. Таким образом, можно сделать заключение, что данный пациент является компаундной гетерозиготой в отношении мутации в гене *CFTR*. Одна из двух мутаций в гене является известной мутацией F508del, локализованной в 10-м экзоне гена и приводящей к выпадению аминокислоты фенилаланина в 508-м положении транспортного белка, а локализация другой неизвестна. Последняя может находиться в пределах всего гена *CFTR* и совместно с F508del приводит к фенотипическому проявлению заболевания. Функциональные классы мутаций *CFTR* могут только частично объяснить связь между генотипом и фенотипом. Так, у пациентов с двумя мутациями классов I–III имеется тенденция к проявлению фенотипа, связанного с недостаточностью поджелудочной железы (PI), более высокой частотой мекониевого илеуса, более ухудшенной функцией легких, тяжелой болезнью печени и ранней смертностью. Мутации классов IV–VI обычно связаны с более легким проявлением болезни, более длительной продолжительностью жизни и достаточностью поджелудочной железы (PS) и являются фенотипически доминантными, когда встречаются в комбинациях с мутациями классов I–III. Тем не менее, гетерогенность клинических проявлений у людей с одинаковыми генотипами *CFTR* указывает на то, что тяжесть заболевания модулируется другими генами и факторами окружающей среды. Так, для мутации F508del характерны смешанная форма заболевания, а также быстрое прогрессирование бронхолегочного процесса, частое инфицирование грамотрицательной флорой и формирование цирроза печени, что наблюдается у больного П.

Полученные данные могут быть использованы в дальнейшем для коррекции мутации с помощью системы редактирования CRISPR/Cas9.

Благодарности. Авторы выражают благодарность докторам биологических наук Владимиру Евгеньевичу Падутову и Олегу Юрьевичу Баранову (Институт леса НАН Беларуси), а также кандидату биологических наук Станиславу Викторовичу Пантелееву (Институт леса НАН Беларуси) за помощь в анализе экспериментальных данных.

Aknowledgements. The authors are grateful to the doctors of biological sciences Vladimir Evgenievich Padutov and Oleg Yuryevich Baranov (Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus), as well as candidate of biological sciences Stanislav Viktorovich Panteleev (Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus) for their help in the analysis of experimental data.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA / R. Riordan [et al.] // *Science*. – 1989. – Vol. 245, N 4922. – P. 1066–1073. <https://doi.org/10.1126/science.2475911>
2. Mutation analysis and haplotype correlation for 139 cystic fibrosis patients from the Nebraska Regional Cystic Fibrosis Center / M. D. Traystman [et al.] // *Human Mutation*. – 1993. – Vol. 2, N 1. – P. 7–15. <https://doi.org/10.1002/humu.1380020103>
3. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations / G. Veit [et al.] // *Mol. Biol. Cell*. – 2016. – Vol. 27, N 3. – P. 424–433. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0935>
4. Correction of the $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by zinc-finger nuclease homology-directed repair / C. M. Lee [et al.] // *BioRes. Open Access*. – 2012. – Vol. 1, N 3. – P. 99–108. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0218>
5. Tsui, L.-C. The cystic fibrosis gene: a molecular genetic perspective / L.-C. Tsui, R. Dorfman // *Cold Spring Harbor Perspectives Med*. – 2013. – Vol. 3, N 2. – P. a009472. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009472>
6. Экспериментальные подходы к таргетному редактированию гена *CFTR* с помощью CRISPR/Cas9 / С. А. Смирнихина [и др.] // *Вестн. Рос. гос. мед. ун-та*. – 2018. – № 2. – С. 15–21. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.022>
7. Лагодич, А. В. Методы анализа нуклеиновых кислот : учеб.-метод. пособие / А. В. Лагодич, О. В. Лагодич. – Минск : БГУ, 2013. – 47 с.

References

1. Riordan J. R., Rommens, J. M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z. [et al.]. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 1989, vol. 245, no. 4922, pp. 1066–1073. <https://doi.org/10.1126/science.2475911>
2. Traystman M. D., Schulte N., Colombo J. L., Sammut P. H., Reilly P., Patel Ch. [et al.]. Mutation analysis and haplotype correlation for 139 cystic fibrosis patients from the Nebraska Regional Cystic Fibrosis Center. *Human Mutation*, 1993, vol. 2, no. 1, pp. 7–15. <https://doi.org/10.1002/humu.1380020103>
3. Veit G., Avramescu R. G., Chiang N. Ch., Houck S. A., Cai Z., Peters K. W. [et al.]. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, vol. 27, no. 3, pp. 424–433. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0935>
4. Lee C. M., Flynn R., Hollywood J. A., Scallan M. F., Harrison P. T. Correction of the $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by zinc-finger nuclease homology-directed repair. *BioResearch Open Access*, 2012, vol. 1, no. 3, pp. 99–108. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0218>
5. Tsui L.-C., Dorfman R. The cystic fibrosis gene: a molecular genetic perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013, vol. 3, no. 2, p. a009472. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009472>
6. Smirnikhina S. A., Anuchina A. A., Kochergin-Nikitsky K. S., Adilgereeva E. P., Yakushina V. D., Lavrov A. V. Experimental approaches to the target editing of the CFTR gene using CRISPR-Cas9. *Bulletin of Russian State Medical University*, 2018, no. 2, pp. 14–20. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.022>
7. Lagodich A. V., Lagodich O. V. *Nucleic acid analysis methods: a training manual*. Minsk, Publishing House of the Belarusian State University, 2013. 47 p. (in Russian).

Информация об авторах

Ермоленко Дарья Андреевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ermolenko_darya94@gmail.ru

Мисюкевич Алла Юрьевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alla.misyukevich.91@mail.ru

Полешко Анна Григорьевна – ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: renovasio888@yandex.ru

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovski@yahoo.com

Information about the authors

Darya A. Ermolenko – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ermolenko_darya_94@gmail.ru

Alla Y. Misyukevich – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alla.misyukevich.91@mail.ru

Anna G. Poleshko – Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: renovasio888@yandex.ru

Igor D. Volotovskii – Academician, D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovskii@yahoo.com