

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЗДАНИЯ ДЕЛЕЦИИ CCR5DELTA32 МЕТОДОМ CRISPR-CAS9 В ЭМБРИОНАХ ЧЕЛОВЕКА

Т. А. Кодылева¹, А. О. Кириллова¹, Е. А. Тыщик¹, В. В. Макаров², А. В. Хромов², В. А. Гушчин², А. Н. Абубакиров¹, Д. В. Ребриков^{1,3}✉, Г. Т. Сухих¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

³Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Изменение гена CCR5 путем редактирования генома CD4⁺-Т-клеток является одним из способов предотвращения распространения ВИЧ-1-инфекции. Однако похожая стратегия защиты от ВИЧ может быть использована и для защиты плода ВИЧ-инфицированных женщин со слабым ответом на антиретровирусную терапию. Создание «естественного» аллеля CCR5delta32 на стадии зиготы может защитить плод от ВИЧ-инфекции во время внутриутробного развития и родов. Целью данного исследования была оптимизация системы CRISPR-Cas9 под создание гомозиготной 32-нуклеотидной делеции (аналогичной природному варианту CCR5delta32) в S-фазе зиготы человека. Для редактирования генома были использованы зиготы с аномальным числом пронуклеусов (более двух), непригодные для ЭКО. 16 аномальных зигот от доноров с WT CCR5 были инъецированы разработанной системой CRISPR-Cas9 в S-фазе. После инъекции зиготы помещали в культуральную среду Blastocyst (COOK) и культивировали в течение 5 дней в CO₂-инкубаторе до стадии бластоцисты (приблизительно 250 клеток). Для анализа эффективности редактирования генома 8 успешно развивавшихся эмбрионов были генотипированы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Из 16 зигот, инъецированных системой CRISPR-Cas9, лишь 8 достигли стадии бластоцисты. ПЦР-генотипирование показало отсутствие исходного варианта WT CCR5 в 5 из 8 бластоцист (100% гомозиготы по CCR5delta32). Два эмбриона продемонстрировали около 3% и один — около 20% мозаицизма по WT CCR5. Таким образом, эффективность разработанной CRISPR-Cas9 системы для создания аллеля CCR5delta32 в эмбрионах человека довольно высока: более половины эмбрионов оказываются полностью модифицированными.

Ключевые слова: CRISPR-Cas9, редактирование генома, эмбрион человека, CCR5, CCR5delta32, устойчивость к ВИЧ

✉ **Для корреспонденции:** Денис Владимирович Ребриков
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; drebrikov@gmail.com

Статья получена: 26.09.2018 **Статья принята к печати:** 09.10.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.052

THE EFFICACY OF CRISPR-CAS9-MEDIATED INDUCTION OF THE CCR5DELTA32 MUTATION IN THE HUMAN EMBRYO

Kodyleva TA¹, Kirillova AO¹, Tyschik EA¹, Makarov VV², Khromov AV², Gushchin VA², Abubakirov AN¹, Rebrikov DV^{1,3}✉, Sukhikh GT¹

¹Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

²Lomonosov Moscow State University, Moscow

³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

The editing of the CCR5 gene in the CD4⁺ T cell genome is an effective way of preventing HIV-1 proliferation. Very similar strategies can be used to protect the fetus of an HIV-infected female showing a weak response to antiretroviral therapy. Inducing the “natural” CCR5delta32 mutation in a zygote may guard the fetus against HIV infection both in utero and at birth. In this study, we optimize the CRISPR-Cas9 system to induce a homozygous 32-nt deletion similar to the naturally occurring CCR5delta32 allele in the human zygote at the S-phase. Edits were done in the abnormal tripronuclear zygotes unsuitable for IVF. Sixteen tripronuclear zygotes in the S-phase obtained from WT CCR5 donors were injected with an original CRISPR-Cas9 system designed by the authors. Upon injection, the zygotes were transferred into the Blastocyst (COOK) embryo culture medium and cultured for 5 days in a CO₂ incubator until blastocysts were formed (approximately 250 cells). Eight zygotes that successfully developed into blastocysts were PCR-genotyped to analyze the efficacy of genome editing. Of 16 zygotes injected with CRISPR-Cas9, only 8 reached the blastocyst stage. PCR genotyping revealed the absence of the initial WT CCR5 variant in 5 of 8 blastocysts (100% CCR5delta32 homozygous). Two had about 3% and one about 20% of WT CCR5 mosaicism. This leads us to conclude that the efficacy of the proposed CRISPR-Cas9 system for the induction of the CCR5delta32 mutation in human embryos is very high producing more than 50% of completely modified embryos.

Keywords: CRISPR-Cas9, genome editing, human embryo, CCR5, CCR5delta32, HIV resistance

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis V. Rebrikov
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; drebrikov@gmail.com

Received: 26.09.2018 **Accepted:** 09.10.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.052

Быстрое развитие CRISPR-технологий в последние годы значительно расширило сферу их применения и способствовало продвижению в клиническую практику. Редактирование генома CD4⁺-Т-клеток путем нокаута или

модификации гена хемокинового рецептора 5 (CCR5) дало обнадеживающие результаты в лечении ВИЧ-1-инфекции [1–5].

Однако кроме изменения гена CCR5 в Т-клетках (с целью блокирования развития СПИДа у ВИЧ-инфицированных

пациентов), создание CCR5delta32-аллеля может быть использовано как элемент технологии оплодотворения *in vitro* (IVF) для защиты плода ВИЧ-инфицированных женщин со слабым ответом на антиретровирусную терапию [6, 7].

Введение системы CRISPR-Cas9 на стадии зиготы позволяет модифицировать геном практически во всех клетках организма и это уже продемонстрировано для нескольких наследственных заболеваний [8–12]. Важно отметить, что измененный геном будет передаваться и последующим поколениям.

Модификация, идентичная природному аллелю CCR5delta32, потенциально защитит плод от ВИЧ-инфекции во время внутриутробного развития, а также во время родов. Дополнительным положительным эффектом может стать пожизненная устойчивость человека к ВИЧ-инфекции.

В этом исследовании мы оптимизировали систему CRISPR-Cas9 с целью создания гомозиготной 32-нуклеотидной делеции (аналогичной природному аллелю CCR5delta32) в S-фазе зиготы человека. Для редактирования генома были использованы зиготы с аномальным числом пронуклеусов, непригодные для программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Одобрение этическим комитетом и согласие пациентов

Проведение исследования было одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (Москва) (протокол №2017/45). Все этапы исследования (методы)

проводились в полном соответствии с существующими международными принципами и правилами работы с эмбрионами. Письменное информированное согласие было получено от каждой семейной пары до момента передачи аномальных зигот для исследования. В исследование были включены семейные пары, в которых для обоих партнеров было показано отсутствие варианта CCR5delta32.

Сбор зигот

Зиготы с аномальным числом пронуклеусов были получены от пациентов, проходящих процедуру ЭКО с сентября 2017 по апрель 2018 годов в НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова. От 11 пар была получена 21 аномальная зигота (16 были инъецированы CRISPR-Cas9 и 5 послужили контролем).

Дизайн, синтез и проверка активности гидовых РНК *in vitro*

Для дизайна гидовых РНК (гРНК) использовали последовательности гена CCR5 дикого типа (WT) и CCR5delta32 из базы данных Национального центра биотехнологической информации (США). Для последующего целевого редактирования и введения желаемой делеции брали участок размером 200 пн, на котором выбирали сайты отжига гРНК с PAM-сайтом (рис. 1). Было подобрано девять гРНК с посадкой в местах, удобных для последующего гомологичного восстановления двухцепочечных разрывов (табл. 1).

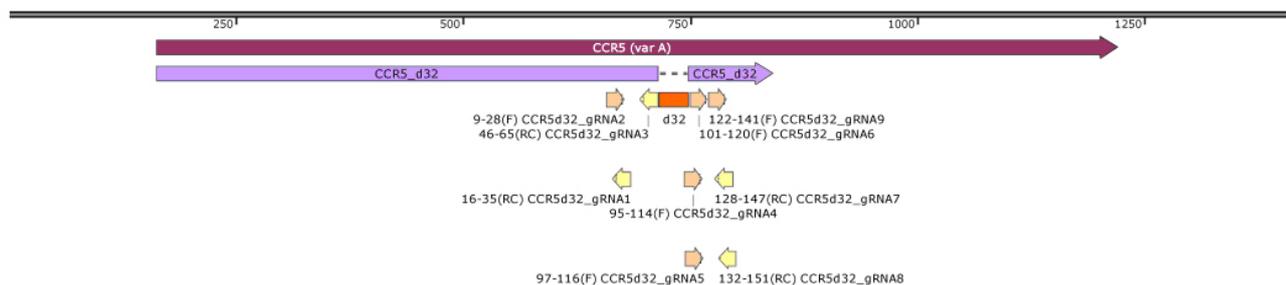


Рис. 1. Расположение гРНК внутри гена CCR5 человека

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов для создания гРНК и ДНК-заплаток

CCR5_BamHI_F	GGATCCTAGGTACCTGGCTGTCGTCCATG
CCR5_XbaI_R	TCTAGAATGCAGCAGTGCATCC
CCR5d32_gRNA1	TAATACGACTCACTATAGGAAGACCTCTTTTGGAGATCGTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA2	TAATACGACTCACTATAGGTTTACCAGATCTCAAAAAGAGTTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA3	TAATACGACTCACTATAGGGTATGGAAAATGAGAGCTGCGTTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA4	TAATACGACTCACTATAGGGACATTAAGATAGTCATCTGTTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA5	TAATACGACTCACTATAGGACATTAAGATAGTCATCTGTTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA6	TAATACGACTCACTATAGGAAAGATAGTCATCTTGGGCGTTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA7	TAATACGACTCACTATAGGTGACCATGACAAGCAGCGGTTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA8	TAATACGACTCACTATAGGCAGATGACCATGACAAGCAGGTTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA9	TAATACGACTCACTATAGGGTCTGCCGCTGCTTGTGAGTTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5_big_leftpart_F	CAACTCTTGACAGGGCTCTATTTTATAGGC
CCR5_big_leftpart_R	GGACCAGCCCAAGATGACTATCTTTAATGTATGGAAAATGAGAGCTGCAGGTGTA
CCR5_big_rightpart_R	GCATAGCTTGGTCCAACCTGTTAG
CCR5_gib_rightpart_F	TAAAGATAGTCATCTTGGGCTGGTCC
CCR5_small_F	GTGATCACTTGGGTGGTGGC
CCR5_small_R	TTAGGATCCCGAGTAGCAGATGAC
CCR5_small_hairpin_R	GCTAAGCGGGTGGGACTTCTAGTCCCACCCGCTTAGGATCCCGAGTAGCAGATGAC

Матрицу для транскрипционного синтеза гРНК создавали путем попарного отжига праймеров (Евроген; Россия) с последующей достройкой Taq-полимеразой (Евроген; Россия) в ходе ПЦР. Затем проводили синтез гРНК с использованием T7 РНК-полимеразы (Сибэнзим; Россия).

Активность полученных гРНК проверяли с помощью тестовой плазмиды, кодирующей последовательность CCR5 дикого типа. Расщепление ДНК *in vitro* комплексом гРНК и EnGen® Cas9 NLS (New England Biolabs; США) проводили в соответствии со стандартной процедурой, рекомендованной производителем фермента. В качестве наиболее эффективных были выбраны гРНК №1 и №5. Для последующих экспериментов *in vivo* смесь этих гРНК использовали в соотношении 1:1.

Наработка ДНК-заплатки

Для производства ДНК-заплатки использовали метод стандартной ПЦР с перекрытием. После сборки конструкции одноцепочечный фрагмент ДНК (хорошо промотирующий переход от негомологичного соединения концов двухцепочечного разрыва (NHEJ) к рекомбинационной репарации) был получен с помощью асимметричной ПЦР с избытком одного из праймеров (с индексом F). Фрагмент имел последовательность: GTGATCACTTGGGTGGTGGCT GTGTTTGCCTCTCTCCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCA AAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTTCCAT ACATTAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGTCTCGCCGCTGC TTGTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAA

Формирование РНП-комплекса

Для получения готовых РНП-комплексов и инъекции их в зиготу использовали следующие исходные компоненты: Cas9 (20 мкМ), 1:1 гРНК №1 и №5 (30 нг/мкл), одноцепочечную ДНК (оцДНК) (100 нг/мкл), буфер для разведения (0,25 мМ ЭДТА /10 мМ TrisHCl; pH 7,4).

Для приготовления инъекционного раствора 0,5 мкл Cas9 (20 мкМ) смешивали с 4,5 мкл буфера для разведения. Затем к 5,34 мкл буфера для разведения добавляли 1,56 мкл полученного раствора Cas9 (2 мкМ), 0,6 мкл смеси гРНК (30 нг/мкл) и 2,5 мкл оцДНК (100 нг/мкл). Смесь инкубировали при 37 °С в течение 10 мин, затем сразу использовали для инъекций.

Инъекция комплекса CRISPR-Cas9 в зиготу

Инъекцию CRISPR-Cas9 в аномальные зиготы проводили в S-фазе клеточного цикла в соответствии со стандартным протоколом Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) [13]. Объем инъекции составлял 1 нл. После инъекции CRISPR-Cas9 зиготы дважды промывали средой Sydney IVF Cleavage Medium (COOK Medical LLC; США), затем перемещали в среду Sydney IVF Blastocyst Medium (COOK Medical LLC; США) и инкубировали в CO₂-инкубаторе Эмбриоплан (Вэсттрейд; Россия) со стандартными параметрами в течение 5 дней до образования бластоцисты (около 250 клеток). После инкубации каждую бластоцисту перемещали в 12 мкл буфера для разведения и сразу анализировали с помощью ПЦР.

ПЦР-генотипирование и анализ данных

ПЦР-генотипирование проводили так же, как описано в [14], на приборе DTprime Real-Time (ДНК-Технология;

Россия), однако для выхода из зоны взаимодействия гРНК использовали другой универсальный праймер CCR5_check2_R: TCATTTTCGACACCGAAGCAGA. Результаты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения DTprime v.7.7 (ДНК-Технология; Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из 16 зигот, инъецированных системой CRISPR-Cas9, лишь 8 достигли стадии бластоцисты. Из 5 контрольных зигот (инъецированных буфером для разбавления) 3 достигли бластоцисты. Это стандартная эффективность

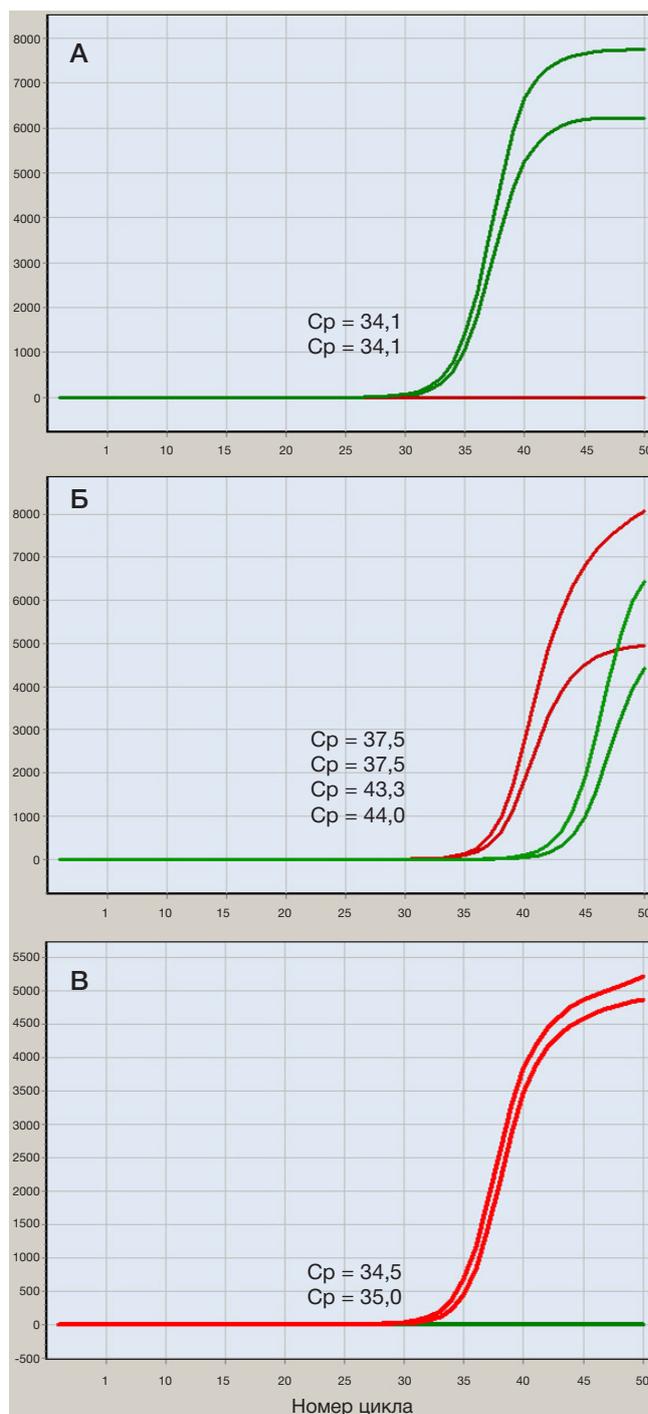


Рис. 2. Кривые ПЦР «в реальном времени», полученные для разных генотипов: двух контрольных эмбрионов (А), двух мозаичных эмбрионов с примерно 3% WT CCR5 (Б), двух эмбрионов, гомозиготных по CCR5delta32 (В)

Таблица 2. Значения пороговых циклов ПЦР для каждого эмбриона

№ эмбриона	Cp WT	Cp del
Контроль 1	34,1	–
Контроль 2	34,1	–
Контроль 3	36,0	–
Эксп. 1	–	38,1
Эксп. 2	40,8	38,1
Эксп. 3	–	37,8
Эксп. 4	44,0	37,5
Эксп. 5	–	37,3
Эксп. 6	43,3	37,5
Эксп. 7	–	34,5
Эксп. 8	–	35,0

Примечание: – отсутствие амплификации.

выхода бластоцист для аномальных зигот, и можно сделать вывод, что процедура инъекции не повысила вероятность остановки развития. ПЦР-генотипирование показало отсутствие исходного варианта WT CCR5 в 5 из 8 бластоцист (с образованием эмбрионов, полностью гомозиготных по CCR5delta32). Два эмбриона продемонстрировали около 3% и один – около 20% остаточного мозаицизма по исходному варианту WT CCR5 (рис. 2). Значения пороговых циклов Cp для каждого эмбриона указаны в табл. 2. Каждый ПЦР-протокол включал в себя отрицательный контрольный образец (буфер для разбавления) в двух повторностях. Все отрицательные контрольные образцы дали отрицательный результат.

ОБСУЖДЕНИЕ

CRISPR-Cas9-опосредованное редактирование генома зигот человека представляет собой эффективный метод модификации внутриклеточной ДНК, достигающий почти

100%-й элиминации исходной последовательности более чем у половины взятых в исследование эмбрионов [9, 10, 12, 15]. Наши результаты хорошо коррелируют с другими случаями применения систем редактирования генома демонстрируя сопоставимо высокую эффективность.

В течение последних двух лет мы видим чрезвычайно быстрое развитие и обновление GE-систем. Однако главным вопросом на сегодняшний день является степень нецелевой активности систем редактирования генома. Только после однозначного подтверждения безопасности такие методы могут быть применены в реальной клинической практике.

ВЫВОДЫ

В работе продемонстрирована эффективность CRISPR-Cas9-опосредованного создания делеции CCR5delta32 в эмбрионах человека. Разработанная система позволила получить более половины полностью модифицированных эмбрионов.

Литература

- Yu S, Yao Y, Xiao H, Li J, Liu Q, Yang Y, et al. Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR-Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Hum Gene Ther.* 2018 Jan; 29 (1): 51–67. DOI: 10.1089/hum.2017.032.
- Xu L, Yang H, Gao Y, Chen Z, Xie L, et al. CRISPR-Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Mol Ther.* 2017 Aug 2; 25 (8): 1782–9. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.04.027.
- Haworth KG, Peterson CW, Kiem HP. CCR5-edited gene therapies for HIV cure: Closing the door to viral entry. *Cytotherapy.* 2017 Nov; 19 (11): 1325–38. DOI: 10.1016/j.jcyt.2017.05.013.
- Liu Z, Chen S, Jin X, Wang Q, Yang K, Li C, et al. Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci.* 2017 Sep 9; (7): 47. DOI: 10.1186/s13578-017-0174-2.
- Nerys-Junior A, Braga-Dias LP, Pezzuto P, Cotta-de-Almeida V, Tanuri A. Comparison of the editing patterns and editing efficiencies of TALEN and CRISPR-Cas9 when targeting the human CCR5 gene. *Genet Mol Biol.* 2018 Jan-Mar; 41 (1): 167–79. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2017-0065.
- Makokha EP, Songok EM, Orago AA, Koech DK, Chemtai AK, Kobayashi N, et al. Maternal immune responses and risk of infant infection with HIV-1 after a short course Zidovudine in a cohort of HIV-1 infected pregnant women in rural Kenya. *East Afr Med J.* 2002 Nov; 79 (11): 567–73.
- French CE, Tookey PA, Cortina-Borja M, de Ruiter A, Townsend CL, Thorne C. Influence of short-course antenatal antiretroviral therapy on viral load and mother-to-child transmission in subsequent pregnancies among HIV-infected women. *Antivir Ther.* 2013; 18 (2): 183–92. DOI: 10.3851/IMP2327.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5. Epub 2015 Apr 18.
- Tang L, Zeng Y, Du H, Gong M, Peng J, Zhang B, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics.* 2017 Jun; 292 (3): 525–33. DOI: 10.1007/s00438-017-1299-z.
- Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature.* 2017 Aug 24; 548 (7668): 413–19. DOI: 10.1038/nature23305.
- Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature.* 2017 Oct 5; 550 (7674): 67–73. DOI: 10.1038/nature24033.
- Liang P, Ding C, Sun H, Xie X, Xu Y, Zhang X, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell.* 2017 Nov; 8 (11): 811–22. DOI: 10.1007/s13238-017-0475-6.
- Joris H, Nagy Z, Van de Velde H, De Vos A, Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection

- procedure. *Hum Reprod.* 1998 Apr; 13 Suppl 1: 76–86.
14. Kofiadi IA, Rebrikov DV, Trofimov DY, Alexeev LP, Khaitov RM. Allelic distribution of the CCR5, CCR2, and SDF1 gene polymorphisms associated with HIV-1/AIDS resistance in Russian populations. *Dokl Biol Sci.* 2007 Jul-Aug; (415): 320–3.
15. Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, Sun X, Fan Y. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet.* 2016 May; 33 (5): 581–588. DOI: 10.1007/s10815-016-0710-8.

References

1. Yu S, Yao Y, Xiao H, Li J, Liu Q, Yang Y, et al. Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR-Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Hum Gene Ther.* 2018 Jan; 29 (1): 51–67. DOI: 10.1089/hum.2017.032.
2. Xu L, Yang H, Gao Y, Chen Z, Xie L, et al. CRISPR-Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Mol Ther.* 2017 Aug 2; 25 (8): 1782–9. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.04.027.
3. Haworth KG, Peterson CW, Kiem HP. CCR5-edited gene therapies for HIV cure: Closing the door to viral entry. *Cytherapy.* 2017 Nov; 19 (11): 1325–38. DOI: 10.1016/j.jcyt.2017.05.013.
4. Liu Z, Chen S, Jin X, Wang Q, Yang K, Li C, et al. Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci.* 2017 Sep 9; (7): 47. DOI: 10.1186/s13578-017-0174-2.
5. Nerys-Junior A, Braga-Dias LP, Pezzuto P, Cotta-de-Almeida V, Tanuri A. Comparison of the editing patterns and editing efficiencies of TALEN and CRISPR-Cas9 when targeting the human CCR5 gene. *Genet Mol Biol.* 2018 Jan-Mar; 41 (1): 167–79. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2017-0065.
6. Makokha EP, Songok EM, Orago AA, Koech DK, Chemtai AK, Kobayashi N, et al. Maternal immune responses and risk of infant infection with HIV-1 after a short course Zidovudine in a cohort of HIV-1 infected pregnant women in rural Kenya. *East Afr Med J.* 2002 Nov; 79 (11): 567–73.
7. French CE, Tookey PA, Cortina-Borja M, de Ruiter A, Townsend CL, Thorne C. Influence of short-course antenatal antiretroviral therapy on viral load and mother-to-child transmission in subsequent pregnancies among HIV-infected women. *Antivir Ther.* 2013; 18 (2): 183–92. DOI: 10.3851/IMP2327.
8. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5. Epub 2015 Apr 18.
9. Tang L, Zeng Y, Du H, Gong M, Peng J, Zhang B, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics.* 2017 Jun; 292 (3): 525–33. DOI: 10.1007/s00438-017-1299-z.
10. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature.* 2017 Aug 24; 548 (7668): 413–19. DOI: 10.1038/nature23305.
11. Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature.* 2017 Oct 5; 550 (7674): 67–73. DOI: 10.1038/nature24033.
12. Liang P, Ding C, Sun H, Xie X, Xu Y, Zhang X, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell.* 2017 Nov; 8 (11): 811–22. DOI: 10.1007/s13238-017-0475-6.
13. Joris H, Nagy Z, Van de Velde H, De Vos A, Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Hum Reprod.* 1998 Apr; 13 Suppl 1: 76–86.
14. Kofiadi IA, Rebrikov DV, Trofimov DY, Alexeev LP, Khaitov RM. Allelic distribution of the CCR5, CCR2, and SDF1 gene polymorphisms associated with HIV-1/AIDS resistance in Russian populations. *Dokl Biol Sci.* 2007 Jul-Aug; (415): 320–3.
15. Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, Sun X, Fan Y. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet.* 2016 May; 33 (5): 581–588. DOI: 10.1007/s10815-016-0710-8.