

유전자 교정 기술의 생의학적 응용

Biomedical Application of Gene Editing

박주찬^a, 장현기^{b*}
Ju-Chan Park^a, Hyeon-Ki Jang^{b*}

^a College of Pharmacy, Seoul National University, Graduate Student, 1, Gwanak-ro, Gwank-gu, Seoul 08826, Republic of Korea

^b Division of Chemical Engineering and Bioengineering, College of Art Culture and Engineering, Assistant Professor, 1, Kangwondaehak-gil, Chuncheon-si 24341, Gangwon-do, Republic of Korea

Received 9 November 2022; Revised 14 December 2022; Accepted 14 December 2022

Abstract

The CRISPR system has revolutionized gene editing field. Cas9-mediated gene editing such as Indel induction or HDR enable targeted gene disruption or precise correction of mutation. Moreover, CRISPR-based new editing tools have been developed such as base editors. In this review, we focus on gene editing in human pluripotent stem cells, which is principal technique for gene correction therapy and disease modeling. Pluripotent stem cell-specific drug YM155 enabled selection of target gene-edited pluripotent stem cells. Also, we discussed base editing for treatment of congenital retina disease. Adenine base editor delivery as RNP form provide an approach for genetic disease treatment with safe and precise *in vivo* gene correction.

Keywords: CRISPR, Gene editing, Disease modeling, Gene therapy

1. 서론

미생물의 방어기제 중 하나인 크리스퍼(CRISPR, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템의 발견과 이를 이용한 유전자 가위 기술은 유전자 교정 기술을 획기적으로 변화시켰다^[1]. 대표적인 Cas9 (CRISPR associated protein 9) 유전자 가위는 기존의 ZFN이나 TALEN 방식에 비해 표적 유전자를 훨씬 쉽고 적은 비용으로 교정하는 것을 가능하게 해주었다. 이는, 기존의 유전자 가위 기술이 표적 유전자를 자를 때 표적의 염기서열에 따라 새로운 단백질이 필요한 것에 비해, Cas9 유전자 가위는 표적 유전자가 바뀌더라도 동일한 단백질을 사용하고, 새로운 표적을 인지하기 위해 단지 guide RNA의 20여 개 염기서열의 교체만이 필요하기 때문이다.

Cas9 유전자 가위는 표적 유전자 DNA의 이중가닥을 절단한다. 절단된 DNA가 복구되는 과정에서 몇 개의 염기서열이 삽입되거나 손실되는 Indel 돌연변이가 생기게 된다^[2]. Cas9을 이용한 Indel 돌연변이 유도는 표적 유전자의 기능을 녹아웃(Knock-out) 하는 데 이용된다. 표적 유전자를 정확하게 교정하거나 외래의 염기서열을 삽입해야 할 경우에는, 교정될 유전정보를 가지고 있는 Donor DNA를 함께 전달한다. 이를 통해 Donor DNA의 유전정보를 바탕으로 DNA 복구가 일어나도록 하여 원하는 염기서열로 교정을 유도할 수 있다. 이러한 교정방식을 동형수선방식 (Homology directed repair, HDR)이라 한다. 동형수선방식은 표적 유전자를 원하는 염기서열로 정확하게 교정할 수 있어 유전질환을 유발하는 돌연변이를 교정할 수 있는 방법이다. 그러나 동형수선방식은 Indel 유도 방식과 마찬가지로 Cas9을 이용하여 DNA 이중가닥 절단을 발생시

* Corresponding author. Tel.: +82-33-250-6273

fax: +82-33-259-5551

E-mail address: hyeonkijang@kangwon.ac.kr (Hyeon-Ki Jang).

키기때문에, p53 유전자를 활성화하거나^{3, 4)} 긴 DNA의 결손을 발생시킬 수 있는 위험성을 가지고 있다^{5, 6)}.

염기교정(Base editing)은 DNA 이중가닥 절단 없이 단일 염기를 효율적으로 교정할 수 있는 기술이다^{7, 8)}. 염기교정 도구는 DNA 한 가닥만을 절단할 수 있는 Cas9 nickase에 DNA 염기의 탈아민효소가 연결된 형태로 구성된다(Fig. 1). 탈아민효소의 종류에 따라 사이토신(Cytosine) 염기를 티민(Thymine) 염기로 바꿀 수 있는 사이토신 염기교정도구(Cytosine base editor)와 아데닌(Adenine) 염기를 구아닌(Guanine) 염기로 바꿀 수 있는 아데닌 염기교정도구(Adenine base editor)가 있다. 염기교정 기술은 단일 염기를 정밀하고 효율적으로 교정할 수 있기 때문에, 유전질환의 병리학적 특성이나 치료기술을 연구하는데 널리 쓰이고 있다. 본 총설에서는 염기교정을 포함한 유전자 교정 기술을 이용하여, 전분화능 세포에서 질병 모델 연구와 유전질환 치료법을 개발하는 연구를 소개하고자 한다.

2. 본론

2.1 전분화능 줄기세포에서 Cas9을 이용한 유전자 교정의 효율 향상

전분화능 줄기세포(PSC, pluripotent stem cell)는 인체의 모든 조직 및 장기로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 때문에 손상된 조직이나 장기를 대체할 수 있는 세포치료제로 개발되거나 질병의 특성을 연구하는데 이용되고 있다^{9, 10)}. 특히 유전 질환의 경우, 유전 변이의 표현형이 특정 조직이나 장기에서 발현되는 경우가 많기 때문에, 환자에서 유래한 유도만능줄기세포 (iPSC, induced pluripotent stem cell)를 이용한 질병 연구가 필수적인 경우가 많다¹¹⁾. 특히, 최근 크리스퍼 유전자 가위를 이용한 유전자 교정 기술이 보편화되면서, 유전 질환에서 유전 변이의 역할을 규명하기 위해 환자에서 유래한 유도만능줄기세포에서 유전변이를 정상으로 교정하거나, 변이가 없는 유도만능줄기세포의 유전 질환과 관련 있는 유전변이를 도입하여 유전변이의 기능을 분석하는 연구가 활발히 진행되고 있다¹²⁻¹⁵⁾.

유전자 교정을 이용한 유전 질환 연구에서 필수적인 과정은, 교정된 세포만을 정확히 분리하는 것이다. 이 과정은 유전자 교정 도구의 처리 후 형성된 단일 세포 군집들을 분리하여, 각각의 군집들의 유전형질을 시퀀싱을 통해 분석해야 하는 번거로운 작업을 수반한다. 때문에, 낮은 교정 효율은 분리 과정을 어렵게 만드는 주요한 원인이다. 그러나 불행히도, Cas9을 이용한 유전자 교정방식은, 전분화능 줄기세포에서 p53 유전자의 활성을 유도하여 세포의 교정 효율을 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다^{3, 4)}. 이를 극복하기 위해, Cas9이나 Donor 벡터에 약물 저항성 유전자를 넣어, 교정된 세포를 약물을 통해 선별하는 방식들이 자주 이용되며¹⁶⁾, 세포사멸을 막거나 세포의 DNA 복구 기작을 조절하는 방법들도 보고되었다¹⁷⁻²²⁾(Table 1). 2020년 Biomaterials지에 새로운 방식의 약물을 이용한 전분화능 줄기세포의 유전자 교정 효율 향상 기술이 소개되었다²³⁾. 해당 기술은 전분화능 줄기세포 특이적인 약물을 유전자 교정 효율을 높이는 선별 약물로 이용하였다. YM155 약물은 전분화능 줄기세포만을 선별적으로 제거하는 약물로서, 전분화능 줄기세포의 분화유도 후 남아 있는 미분화세포를 제거함으로써 분화된 세포를 선별하고, 세포 이식 시 기형종 형성과 같은 부작용을 최소화하는데 쓰이고 있다^{24, 25)}(Fig. 2). YM155 약물은 특이적인 SLC35F2 수용체에 의해 세포내로 수송되며, SLC35F2는 전분화능 줄기세포를 포함한 일부의 세포에서만 발현한다. 때문에 전분화능 줄기세포에서 YM155의 선택적인 반응성이 나타나게 된다. 따라서, 전분화능 줄기세포의 SLC35F2 유전자를 Cas9으로 녹아웃

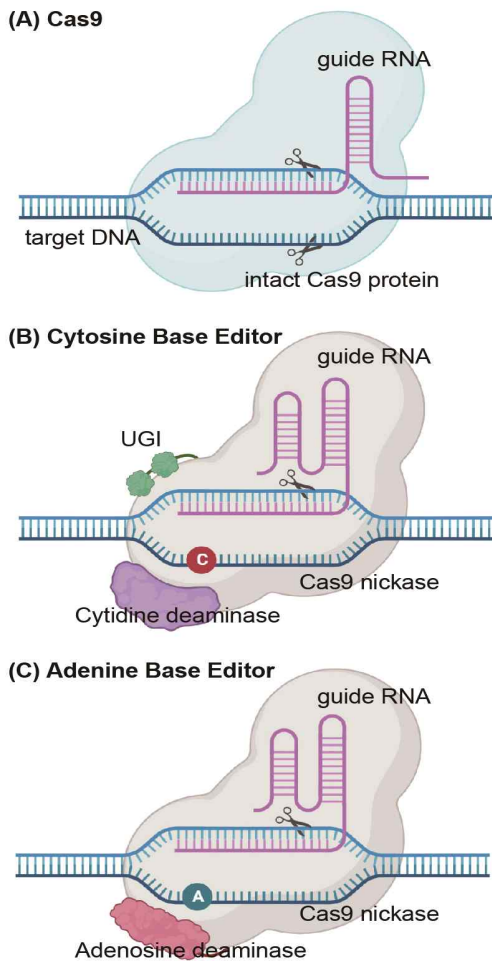


Fig. 1 Schematic of gene editing tools.

(Knock-out)하면 YMI55 약물에 대한 저항성을 갖게 된다. 이를 이용하여, 표적 유전자를 교정 할 때, SCL35F2를 함께 망가뜨림으로써 표적 유전자가 교정된 세포에서 YMI55 약물에 대한 저항성을 유도할 수 있다. 이런 원리로 유전자 교정 후에 YMI55 처리를 통해 표적 유전자가 교정된 세포만을 선별적으로 분리할 수 있었다. 저자들은 이 방식을 YES (YMI55-based Enriched Selection of CRISPR co-targeting)라고 명명하였으며, YES 방식은 Cas9을 이용한 Indel 유도과 ssODN을 이용한 짧은 염기서열의 삽입 및 교정뿐만 아니라, GFP와 같은 긴 염기서열을 녹인(Knock-in) 하는 데 있어서도 교정 효율을 향상시켰다. 또한 SCL35F2를 Cas9을 통해 녹아웃하지 않고, siRNA를 통해 일시적으로 녹다운(knock-down) 하는 것으로도 비슷한 효과를 볼 수 있었으며, 이는 표적 유전자만을 정확하고 효율적으로 교정할 수 있는 방법이다.

으로 교정할 수 있는 염기교정(Base Editing) 기술은 유전 질환을 유발하는 유전 변이를 도입하거나 교정하는데 유용하다. 대표적인 염기교정 도구인 아데닌 염기교정도구와 사이토신 염기교정도구의 효율은, 다소의 차이는 있지만 HEK293T 세포에서는 비슷한 수준이다^[27]. 그러나 전분화능세포에서는 사이토신 염기교정도구의 효율이 아데닌 염기교정도구의 효율에 비해 매우 낮은 것이 확인되었다^[28]. 이 현상의 원인은 사이토신 염기교정 도구가 작동하는 방식에서 찾을 수 있다. 사이토신 염기교정 도구는, 표적 부위의 사이토신에 작동하여 사이토신(Cytosine) 염기를 유라실(Uracil) 염기로 바꿀 수 있다^[7]. 이때 유라실의 반대쪽 염기인 구아닌(Guanine)이 DNA 복제나 복구과정에서 아데닌(Adenine) 염기로 바뀌게 되고 유라실 염기도 티민(Thymine) 염기로 바뀌게 되어 염기 교정이 완료된다. 그러나 이 과정에서 유라실 염기가 Uracil DNA Glycosylase (UNG)에 의해 제거되고 다시 사이토신 염기가 생성되어 염기 교정이 되지 않고 원래 상태로 돌아올 수 있다. 이러한 과정은 손상된 DNA를 복구하기 위한 방식 중 하나인 Base excision repair (BER) 방식에 의해 유라실 DNA가 복구되는 과정과 같다. 때문에 사이토신 염기교정 도구의 효율적인 작동을 위해서는 UNG에 의해 일어나는 BER에서 회피해야 한다. 현재 사용되고 있는 사이토신 염기교정 도구는, 표적 사이토신의 반대쪽 DNA가닥에 Nick을 만들어 Mismatch repair (MMR) 방식으로 유도하고, 동시에 UNG의 억제제인 Uracil Glycosylase Inhibitor (UGI)를 도입하여 효율적인 염기교정이 일어날 수 있도록 설계되었다^[7, 29]. 그러나, 전분화능세포는 분화된 체세포나 암세포에 비해 BER의 활성이 강하게 유지되어 사이토신 염기교정도구의 작동이 억제되었다^[28]. 이는 유전적 항상성을 유지하기 위해 DNA 손상에 민감하게 대응하는 전분화능세포의 특성 때문이라고 할 수 있다. 반면 아데닌 염기교정도구의 작동은, BER의 활성에 영향을 적게 받기 때문에 전분화능세포에서도 잘 작동하였다. 따라서 전분화능세포에서 사이토신 염기 교정도구의 효율을 높이기 위해 siRNA 등을 이용하여 UNG의 활성을 일시적으로 약화시키거나, 추가적인 UGI를 전달하는 것이 방법이 될 수 있다^[28].

Table 1 Methods for improving editing efficiency in PSCs

Types of method	References
Using selection marker	Puromycin selection using Cas9-PAC vector ^[16]
Increasing cell survival	BCL-XL overexpression for preventing cell death during gene editing ^[17]
Regulating DNA Repair mechanism	Knock-down <i>DNAPK</i> and <i>XRCC4</i> for increasing HDR ^[18]
	Timely expression of Cas9 in S/G2/M phase using Geminin for increasing HDR ^[19]
	Synchronizing cell cycle to G2/M phase using small molecule ABT for increasing HDR ^[20]
	<i>Rad51</i> overexpression using small molecule RS-1 for increasing HDR ^[21]
Optimizing protocol	Using Cas9 RNP and AAV6 donor ^[22]

2.2 전분화능 줄기세포에서 염기 교정의 특징

유전 질환을 유발하는 유전변이 중 다수는 하나의 염기서열이 바뀌는 점돌연변이(point mutation)이다^[26]. 따라서 단일 염기를 효율적

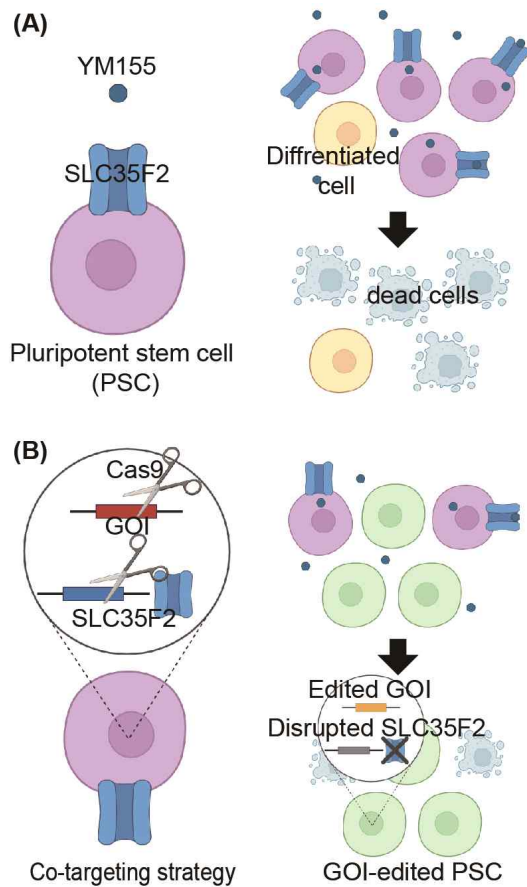


Fig. 2 Schematic of YM155 drug treatment. (A) YM155 treatment for depletion of undifferentiated cells (B) YM155-based Enriched Selection of CRISPR co-targeting (YES)

2.3 염기교정 기술을 이용한 망막 유전질환의 치료

염기교정 기술은 DNA의 이중가닥절단없이 원하는 염기하나를 정확하고 효율적으로 교정 할 수 있는 기술이다. 때문에 염기교정 기술은 유전 질환의 원인이 되는 유전변이를 안전하고 효율적으로 고칠 수 있는 방법이며, 다양한 유전질환의 치료방법으로써 그 활용 범위가 연구되고 있다^[26]. 염기교정 도구를 전달하는 방법으로 대표적인 것은 바이러스 벡터로 아데노연관 바이러스 (Adeno-associated virus, AAV) 벡터가 많이 쓰이고 있다. 그러나 AAV 바이러스는 전달할 수 있는 유전자의 크기가 약 4.5kb로 한계가 있어서 염기교정도구의 유전자와 gRNA를 온전히 전달할 수 없다. 이를 해결하기 위해, Intein 도메인을 이용하여 유전자 교정도구를 두 부분으로 나누어 두 개의 벡터로 나누어 전달하는 방법이 개발되었다^[31, 32].

망막유전질환은 눈의 망막 조직에서 구조나 기능을 담당하는 유

전자에 변이가 생겨 발생하는 질환으로, 나이가 들어감에 따른 급격한 시력저하나 선천적 실명을 야기한다. 유전성 망막질환 중 하나인 레버흑암시(Leber's congenital amaurosis, LCA)의 경우 AAV를 이용한 정상 유전자 전달 방식의 유전자치료제 LUXTURNA가 개발되어 망막유전질환에 대한 유전자치료의 시작을 알렸다^[33]. 2020년에는 Biorxiv지에는 동일한 유전질환에 대해서 AAV를 이용한 염기교정 방식을 이용한 치료 방법이 연구되었고, 마우스 모델에서 치료가능성이 입증되었다^[34].

AAV는 효과적인 유전자 교정도구의 전달방법이지만, 세포내에 오랜 시간 잔존하여 전달한 유전자를 발현하기 때문에 유전자 교정도구의 표적이탈효과(off-target effect)과 같은 부작용을 유발할 우려가 있다^[35](Fig. 3). 때문에 mRNA나 RNP(Ribonucleoprotein complex)처럼 일시적으로 발현하고 사라질 수 있는 형태로 유전자 교정도구를 전달하는 것이 치료에 있어서 안전한 방식으로 여겨진다. 2021년 Science Advances지에 아데닌 염기교정도구를 RNP형태로 전달하여 망막 유전질환을 치료하는 방법이 연구되었다^[36]. 연구진은 염기교정도구 단백질을 인간 세포주에서 발현시키고 정제하는 방식으로 고순도, 고용량의 염기교정도구 단백질을 정제하였으며, 정제된 염기교정도구 RNP의 교정 효율이 플라스미드 방식을 이용한 염기교정도구 전달과 비교하였을 때 비슷한 수준임을 확인하였다. 반면에 표적이탈효과에서는 뚜렷한 차이를 보였는데, RNP 전달 방식은 플라스미드나 mRNA 전달에 비해 DNA 및 RNA에서 낮은 표적이탈효과를 보여주었다. 나이가 RNP를 이용한 염기교정 방식은 구경꾼 교정(bystander editing)없이 원하는 염기 하나만 정밀하게 고칠 수 있는 가능성이 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 RNP를 이용한 염기교정 방식을 이용하여 유전질환 치료에 응용하였다. 구체적으로는 LCA질환의 모델 생쥐인 Rd12 생쥐에 아데닌 염기교정도구 RNP를 Lipid nanoparticle (LNP) 형태로 전달하여, 6주 후에 망막 조직의 유전 변이가 약 2% 효율로 정밀하게 교정된 것을 확인하였다.

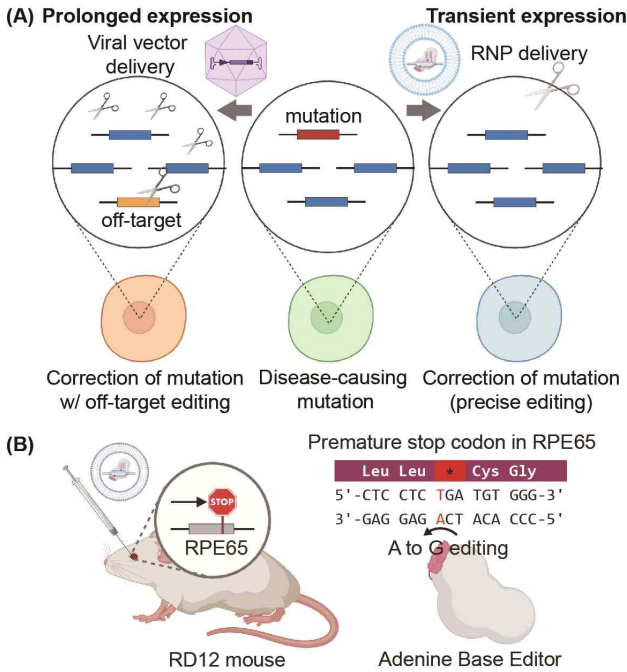


Fig. 3 Delivery of gene editing tools via viral vector or RNP with lipid nanoparticles. (A) Characteristics of delivery methods (B) ABE RNP delivery and gene correction in RD12 mouse

3. 결론

염기교정기술은 표적 염기를 정확하고 효율적으로 교정 할 수 있는 기술로, 특히 유전질환의 치료방법으로써 기존의 Cas9을 이용한 교정방식을 상당부분 대체 할 수 있는 기술로 주목받고 있다. 특히 DNA 이중가닥을 절단하는 교정 방식이 DNA large deletion이나 염색체의 이상을 유발할 수 있다는 위험성이 보고되고 있어서^{5, 6, 37}, 향후 Cas9을 이용한 유전질환 치료 방식은 점차 지양될 것으로 예상된다. 그러나 염기교정기술을 이용한 유전질환 치료방식도 해결해야 할 문제점들을 가지고 있다. 예를 들면, 염기교정도구의 탈아민 효소(deaminase)에 의한 DNA나 RNA의 표적이탈효과에 의한 위험성을 안전한 수준으로 통제하는 것이 필요하다³⁸. 이를 위해 탈아민 효소에 변형을 주거나 염기교정도구에서 탈아민효소의 상대적인 위치를 변경하는 방법들이 연구되고 있다^{39, 40}.

염기교정도구를 mRNA나 RNP형태로 전달하여 염기교정도구의 작동시간을 최소화함으로써 표적이탈효과를 최소화할 수 있다. Lipid nanoparticle (LNP)는 mRNA나 RNP를 전달할 때 쓰이는 대표적인 전달체이다. 혈관 주사를 통해 체내로 전달된 LNP는 주로 간에 축적되기 때문에 간세포의 유전자를 교정하는데 효과적이다⁴¹. 특

히 ABE의 mRNA를 LNP를 이용하여 cynomolgus monkeys에 전달한 경우, 표적유전자인 PCSK9 단백질의 혈청 내 농도를 90% 가까이 감소시킬 정도로 교정 효과가 우수하였다^{42, 43}. 간 외에도, 내이나 망막에 염기교정도구 RNP를 국소적으로 전달하여 유전자 교정을 시도한 사례도 있다^{36, 44}. 최근에는 염기교정도구 RNP를 바이러스 유사입자 (Virus-like particles: VLPs)를 이용해 전달하여 RNP를 이용한 염기교정 효율을 크게 향상시키는 방법이 개발되었으며, 향후 그 활용 방법이 주목받고 있다⁴⁵. 이러한 연구 성과들을 바탕으로, 염기교정도구의 효율은 높으면서 정확하고 안전한 작동방식이 담보되는 치료방식이 개발된다면 염기교정 방식을 이용한 유전질환 치료 방법이 실제 환자의 치료에 쓰이게 될 것이다.

후 기

이 논문은 2022년도 한국연구재단의 기초연구사업의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2022R1C1C2011617). 본문에 삽입된 그림은 BioRender.Com을 이용하여 작성되었음.

References

- [1] Hsu, Patrick D., Lander, Eric S.,Zhang, F., 2014, Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering, Cell 157:6 1262-1278.
- [2] Jang, H. K., Song, B., Hwang, G. H.,Bae, S., 2020, Current trends in gene recovery mediated by the CRISPR-Cas system, Exp Mol Med 52:7 1016-1027.
- [3] Ihry, R. J., Worringer, K. A., Salick, M. R., Frias, E., Ho, D., Theriault, K., Kommineni, S., Chen, J., Sondey, M., Ye, C., Randhawa, R., Kulkarni, T., Yang, Z., McAllister, G., Russ, C., Reece-Hoyes, J., Forrester, W., Hoffman, G. R., Dolmetsch, R.,Kaykas, A., 2018, p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells, Nat Med 24:7 939-946.
- [4] Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B.,Taipale, J., 2018, CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response, Nat Med 24:7 927-930.
- [5] Shin, H. Y., Wang, C., Lee, H. K., Yoo, K. H., Zeng, X., Kuhns, T., Yang, C. M., Mohr, T., Liu, C.,Hennighausen, L., 2017, CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions at 17 sites in the mouse genome, Nat Commun 8 15464.
- [6] Kosicki, M., Tomberg, K.,Bradley, A., 2018, Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large

- deletions and complex rearrangements, *Nat Biotechnol* 36:8 765-771.
- [7] Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., Liu, D. R., 2016, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, *Nature* 533:7603 420-424.
- [8] Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., Liu, D. R., 2017, Programmable base editing of AT to GC in genomic DNA without DNA cleavage, *Nature* 551:7681 464-471.
- [9] Dutta, D., Heo, I., Clevers, H., 2017, Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems, *Trends Mol Med* 23:5 393-410.
- [10] Yamanaka, S., 2020, Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges, *Cell Stem Cell* 27:4 523-531.
- [11] Rowe, R. G., Daley, G. Q., 2019, Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery, *Nat Rev Genet* 20:7 377-388.
- [12] Wang, H. X., Li, M., Lee, C. M., Chakraborty, S., Kim, H. W., Bao, G., Leong, K. W., 2017, CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Disease Modeling and Therapy: Challenges and Opportunities for Nonviral Delivery, *Chem Rev* 117:15 9874-9906.
- [13] Sebastiano, V., Zhen, H. H., Haddad, B., Bashkirova, E., Melo, S. P., Wang, P., Leung, T. L., Siprashvili, Z., Tichy, A., Li, J., Ameen, M., Hawkins, J., Lee, S., Li, L., Schwertschko, A., Bauer, G., Lisowski, L., Kay, M. A., Kim, S. K., Lane, A. T., Wernig, M., Oro, A. E., 2014, Human COL7A1-corrected induced pluripotent stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa, *Sci Transl Med* 6:264 264ra163.
- [14] Niu, X., He, W., Song, B., Ou, Z., Fan, D., Chen, Y., Fan, Y., Sun, X., 2016, Combining Single Strand Oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to Correct Gene Mutations in β -Thalassemia-induced Pluripotent Stem Cells, *J Biol Chem* 291:32 16576-16585.
- [15] Ortiz-Virumbrales, M., Moreno, C. L., Kruglikov, I., Marazuela, P., Sproul, A., Jacob, S., Zimmer, M., Paull, D., Zhang, B., Schadt, E. E., Ehrlich, M. E., Tanzi, R. E., Arancio, O., Noggle, S., Gandy, S., 2017, CRISPR/Cas9-Correctable mutation-related molecular and physiological phenotypes in iPSC-derived Alzheimer's PSEN2 (N141I) neurons, *Acta Neuropathol Commun* 5:1 77.
- [16] Steyer, B., Bu, Q., Cory, E., Jiang, K., Duong, S., Sinha, D., Steltzer, S., Gamm, D., Chang, Q., Saha, K., 2018, Scarless Genome Editing of Human Pluripotent Stem Cells via Transient Puromycin Selection, *Stem Cell Reports* 10:2 642-654.
- [17] Li, X. L., Li, G. H., Fu, J., Fu, Y. W., Zhang, L., Chen, W., Arakaki, C., Zhang, J. P., Wen, W., Zhao, M., Chen, W. V., Botimer, G. D., Baylink, D., Aranda, L., Choi, H., Bechar, R., Talbot, P., Sun, C. K., Cheng, T., Zhang, X. B., 2018, Highly efficient genome editing via CRISPR-Cas9 in human pluripotent stem cells is achieved by transient BCL-XL overexpression, *Nucleic Acids Res* 46:19 10195-10215.
- [18] Shahryari, A., Moya, N., Siehler, J., Wang, X., Burtscher, I., Lickert, H., 2021, Increasing Gene Editing Efficiency for CRISPR-Cas9 by Small RNAs in Pluripotent Stem Cells, *Crispr j* 4:4 491-501.
- [19] Howden, S. E., McColl, B., Glaser, A., Vadolas, J., Petrou, S., Little, M. H., Elefanty, A. G., Stanley, E. G., 2016, A Cas9 Variant for Efficient Generation of Indel-Free Knockin or Gene-Corrected Human Pluripotent Stem Cells, *Stem Cell Reports* 7:3 508-517.
- [20] Yang, D., Scavuzzo, M. A., Chmielowiec, J., Sharp, R., Bajic, A., Borowiak, M., 2016, Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases, *Sci Rep* 6 21264.
- [21] Riesenberger, S., Maricic, T., 2018, Targeting repair pathways with small molecules increases precise genome editing in pluripotent stem cells, *Nat Commun* 9:1 2164.
- [22] Martin, R. M., Ikeda, K., Cromer, M. K., Uchida, N., Nishimura, T., Romano, R., Tong, A. J., Lemgart, V. T., Camarena, J., Pavel-Dinu, M., Sindhu, C., Wiebking, V., Vaidyanathan, S., Dever, D. P., Bak, R. O., Laustsen, A., Lesch, B. J., Jakobsen, M. R., Sebastiano, V., Nakauchi, H., Porteus, M. H., 2019, Highly Efficient and Marker-free Genome Editing of Human Pluripotent Stem Cells by CRISPR-Cas9 RNP and AAV6 Donor-Mediated Homologous Recombination, *Cell Stem Cell* 24:5 821-828.e825.
- [23] Kim, K. T., Park, J. C., Jang, H. K., Lee, H., Park, S., Kim, J., Kwon, O. S., Go, Y. H., Jin, Y., Kim, W., Lee, J., Bae, S., Cha, H. J., 2020, Safe scarless cassette-free selection of genome-edited human pluripotent stem cells using temporary drug resistance, *Biomaterials* 262 120295.
- [24] Lee, M. O., Moon, S. H., Jeong, H. C., Yi, J. Y., Lee, T. H., Shim, S. H., Rhee, Y. H., Lee, S. H., Oh, S. J., Lee, M. Y., Han, M. J., Cho, Y. S., Chung, H. M., Kim, K. S., Cha, H. J., 2013, Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:35 E3281-3290.
- [25] Kim, K. T., Jeong, H. C., Kim, C. Y., Kim, E. Y., Heo, S. H.,

- Cho, S. J., Hong, K. S., Cha, H. J., 2017, Intact wound repair activity of human mesenchymal stem cells after YM155 mediated selective ablation of undifferentiated human embryonic stem cells, *J Dermatol Sci* 86:2 123-131.
- [26] Rees, H. A., Liu, D. R., 2018, Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells, *Nature Reviews Genetics* 19:12 770-788.
- [27] Song, M., Kim, H. K., Lee, S., Kim, Y., Seo, S.-Y., Park, J., Choi, J. W., Jang, H., Shin, J. H., Min, S., Quan, Z., Kim, J. H., Kang, H. C., Yoon, S., Kim, H. H., 2020, Sequence-specific prediction of the efficiencies of adenine and cytosine base editors, *Nature Biotechnology* 38:9 1037-1043.
- [28] Park, J. C., Jang, H. K., Kim, J., Han, J. H., Jung, Y., Kim, K., Bae, S., Cha, H. J., 2022, High expression of uracil DNA glycosylase determines C to T substitution in human pluripotent stem cells, *Mol Ther Nucleic Acids* 27 175-183.
- [29] Komor, A. C., Zhao, K. T., Packer, M. S., Gaudelli, N. M., Waterbury, A. L., Koblan, L. W., Kim, Y. B., Badran, A. H., Liu, D. R., 2017, Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity, *Sci Adv* 3:8 eaao4774.
- [30] Park, J. C., Kim, J., Jang, H. K., Lee, S. Y., Kim, K. T., Kwon, E. J., Park, S., Lee, H. S., Choi, H., Park, S. Y., Choi, H. J., Park, S. J., Moon, S. H., Bae, S., Cha, H. J., 2022, Multiple isogenic GNE-myopathy modeling with mutation specific phenotypes from human pluripotent stem cells by base editors, *Biomaterials* 282 121419.
- [31] Truong, D. J., Kuhner, K., Kuhn, R., Werfel, S., Engelhardt, S., Wurst, W., Ortiz, O., 2015, Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy, *Nucleic Acids Res* 43:13 6450-6458.
- [32] Chen, Y., Zhi, S., Liu, W., Wen, J., Hu, S., Cao, T., Sun, H., Li, Y., Huang, L., Liu, Y., Liang, P., Huang, J., 2020, Development of Highly Efficient Dual-AAV Split Adenosine Base Editor for In Vivo Gene Therapy, *Small Methods* 4:9 2000309.
- [33] Keeler, A. M., Flotte, T. R., 2019, Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here?, *Annu Rev Virol* 6:1 601-621.
- [34] Jo, D. H., Jang, H.-K., Cho, C. S., Han, J. H., Ryu, G., Jung, Y., Bae, S., Kim, J. H., 2021, Therapeutic adenine base editing corrects nonsense mutation and improves visual function in a mouse model of Leber congenital amaurosis, *bioRxiv* 2021.2001.2007.425822.
- [35] Raguram, A., Banskota, S., Liu, D. R., 2022, Therapeutic in vivo delivery of gene editing agents, *Cell* 185:15 2806-2827.
- [36] Jang, H. K., Jo, D. H., Lee, S. N., Cho, C. S., Jeong, Y. K., Jung, Y., Yu, J., Kim, J. H., Woo, J. S., Bae, S., 2021, High-purity production and precise editing of DNA base editing ribonucleoproteins, *Sci Adv* 7:35.
- [37] Nahmad, A. D., Reuveni, E., Goldschmidt, E., Tenne, T., Liberman, M., Horovitz-Fried, M., Khosravi, R., Kobo, H., Reinstein, E., Madi, A., Ben-David, U., Barzel, A., 2022, Frequent aneuploidy in primary human T cells after CRISPR-Cas9 cleavage, *Nature Biotechnology*.
- [38] Slesarenko, Y. S., Lavrov, A. V., Smirikhina, S. A., 2022, Off-target effects of base editors: what we know and how we can reduce it, *Curr Genet* 68:1 39-48.
- [39] Richter, M. F., Zhao, K. T., Eton, E., Lapinaite, A., Newby, G. A., Thuronyi, B. W., Wilson, C., Koblan, L. W., Zeng, J., Bauer, D. E., Doudna, J. A., Liu, D. R., 2020, Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity, *Nature Biotechnology* 38:7 883-891.
- [40] Li, S., Yuan, B., Cao, J., Chen, J., Chen, J., Qiu, J., Zhao, X.-M., Wang, X., Qiu, Z., Cheng, T.-L., 2020, Docking sites inside Cas9 for adenine base editing diversification and RNA off-target elimination, *Nature Communications* 11:1 5827.
- [41] Paunovska, K., Loughrey, D., Dahlman, J. E., 2022, Drug delivery systems for RNA therapeutics, *Nature Reviews Genetics* 23:5 265-280.
- [42] Musunuru, K., Chadwick, A. C., Mizoguchi, T., Garcia, S. P., DeNizio, J. E., Reiss, C. W., Wang, K., Iyer, S., Dutta, C., Clendaniel, V., Amaonye, M., Beach, A., Berth, K., Biswas, S., Braun, M. C., Chen, H.-M., Colace, T. V., Ganey, J. D., Gangopadhyay, S. A., Garrity, R., Kasiewicz, L. N., Lavoie, J., Madsen, J. A., Matsumoto, Y., Mazzola, A. M., Nasrullah, Y. S., Nneji, J., Ren, H., Sanjeev, A., Shay, M., Stahley, M. R., Fan, S. H. Y., Tam, Y. K., Gaudelli, N. M., Ciaramella, G., Stolz, L. E., Malyala, P., Cheng, C. J., Rajeev, K. G., Rohde, E., Bellinger, A. M., Kathiresan, S., 2021, In vivo CRISPR base editing of

PCSK9 durably lowers cholesterol in primates, Nature 593:7859-429-434.

[43] Rothgangl, T., Dennis, M. K., Lin, P. J. C., Oka, R., Witzigmann, D., Villiger, L., Qi, W., Hruzova, M., Kissling, L., Lenggenhager, D., Borrelli, C., Egli, S., Frey, N., Bakker, N., Walker, J. A., Kadina, A. P., Victorov, D. V., Pacesa, M., Kreutzer, S., Kontarakis, Z., Moor, A., Jinek, M., Weissman, D., Stoffel, M., van Bostel, R., Holden, K., Pardi, N., Thöny, B., Häberle, J., Tam, Y. K., Semple, S. C., Schwank, G., 2021, In vivo adenine base editing of PCSK9 in macaques reduces LDL cholesterol levels, Nature Biotechnology 39:8 949-957.

[44] Yeh, W.-H., Chiang, H., Rees, H. A., Edge, A. S. B., Liu, D. R., 2018, In vivo base editing of post-mitotic sensory cells, Nature Communications 9:1 2184.

[45] Banskota, S., Raguram, A., Suh, S., Du, S. W., Davis, J. R., Choi, E. H., Wang, X., Nielsen, S. C., Newby, G. A., Randolph, P. B., Osborn, M. J., Musunuru, K., Palczewski, K., Liu, D. R., 2022, Engineered virus-like particles for efficient invivo delivery of therapeutic proteins, Cell 185:2 250-265.e216.

대표저자소개

장현기(Hyeon-Ki Jang)



- 2010년 08월 : 서울대학교 화학생물공학부 (공학사)
- 2016년 08월 : 서울대학교 공과대학 바이오엔지니어링 협동과정 (공학박사)
- 2016년 10월 ~ 2021년 03월 : 한양대학교 화학과 (박사후연구원)
- 2021년 03월 ~ 2022년 08월 : 한국생명공학연구원 줄기세포융합연구센터 (박사후연구원)
- 2022년 09월 ~ 현재 : 강원대학교 생물공학전공 (조교수)

<주요 연구 분야>

- 조직공학적 기법을 이용한 혈관 신생 유도
- 유전자 교정을 이용한 유전 질환 치료
- 유전자 교정 기술 고도화