

**Subject: Gene editing**

<https://doi.org/10.1038/s41434-020-0166-4>

**Effect of connective tissue growth factor gene editing using adeno-associated virus-mediated CRISPR-Cas9 on rabbit glaucoma filtering surgery outcomes**

Eun Jung Lee, Jong Chul Han, Do Young Park, Junhun Cho & Changwon Kee

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

↳ Abstract 미리보기

녹내장 여과 수술 (Glaucoma Filtration Surgery, GFS)에서 과도한 상처 치유 반응을 억제하는 것은 수술의 성공 확률을 높이는 데 중요하다. 최근에 사용되고 있는 보조 물질은 세포의 상태에 따라 선택적으로 작용하는 것이 아니기 때문에 부작용이 발생할 수 있고, 반복적인 투여가 필요할 수 있다. 반면, CRISPR-Cas9 시스템은 선택적으로 적용할 수 있고, 효과가 영구적이어서 녹내장 수술에서 매력적인 치료법이 될 수 있다. 결합 조직 성장 인자 (Connective Tissue Growth Factor, CTGF)는 눈 조직 섬유증을 형성시키는 가장 강력한 stimulator 중 하나로, 본 논문에서는 CRISPR-Cas9 시스템을 이용해 GFS 섬유증에서의 CTGF 억제 효과를 테스트했다. 본 논문의 저자들은 AAV를 이용한 CRISPR-Cas9 시스템을 사용했으며, western blot과 deep sequencing을 통해 fibroblast의 CTGF가 *in vitro*에서 성공적으로 억제되었음을 확인하였다. 또한, 토끼 GFS 모델에서 CRISPR-CTGF 처리된 눈은 처리되지 않은 눈과 비교했을 때 더 높은 생존율과 subconjunctival fibroblast 감소, 한정적인 collagen 침착 및 세포질 감소를 보였다. 이 결과는 사람에서의 GFS 결과를 개선시키는 데 있어 CRISPR-Cas9을 이용한 CTGF 억제가 새로운 방법이 될 수 있음을 시사한다.

↳ Takara 제품을 이용한 method 미리보기

SaCas9이 인식할 수 있는 Rabbit CTGF-specific target sequence를 합성하고, genome editing에 필요한 SaCas9과 sgRNA를 모두 발현하는 pAAV-Guide-it-1 vector ([AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System \(AAV2\) \(Code 632619\)](#)) 구성품에 cloning 하였다. 293 packaging cell로 cloning한 vector와 phelper vector, packaging plasmid를 transfection하고 72시간 후 생산된 recombinant AAV를 회수하여 [AAVpro® Purification Kit Maxi \(All Serotypes\) \(Code 6666\)](#)로 정제한 후 실험에 사용하였다.

↳ 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

[AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System \(AAV2\) \(Code 632619\)](#)

- *Staphylococcus aureus* 유래의 SaCas9를 이용한 1 vector CRISPR/SaCas9 System
  - Single vector 내 SaCas9, sgRNA 모두 발현
- NNGRR(T) PAM 서열을 인식하여 DNA를 절단함

[AAVpro® Purification Kit Maxi \(All Serotypes\) \(Code 6666\)](#)

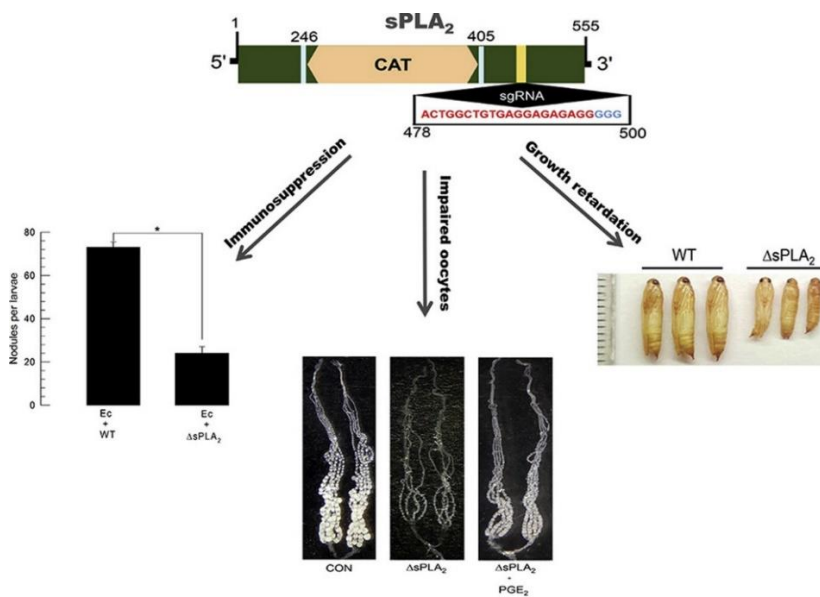
- 다양한 serotype의 AAV를 packaging cell로부터 추출 및 고순도 정제
- 독자적인 추출 및 정제 방식으로, freeze/thaw 및 ultracentrifuge 과정 없이도 바이러스 획득

## Deletion mutant of sPLA<sub>2</sub> using CRISPR/Cas9 exhibits immunosuppression, developmental retardation, and failure of oocyte development in legume pod borer, *Maruca vitrata*

Al Baki Md Abdullah, Dae-Weon Lee, Jinkyong Jung, Yonggyun Kim

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

### Abstract 미리보기



Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)는 *sn-2* 위치에서 인지질과 연결되어 있는 유리 지방산의 방출을 촉매한다. 이렇게 방출된 유리 지방산의 일부는 곤충에서 다양한 생리학적 과정을 매개하는 eicosanoid를 합성하는데 사용된다. 다수의 PLA<sub>2</sub>가 최소 16개 이상의 superfamily를 형성하는데도 불구하고, 곤충에서의 PLA<sub>2</sub>가 확인되거나 특성 분석된 연구는 거의 없었을 뿐더러 생리학적 기능 또한 불분명했다. 본 연구에서는 CRISPR/Cas9을 이용하여 *Maruca vitrata*에서

분비되는 PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>)의 식별 및 특성화를 통해 이의 생리 기능을 검증하였다. *M. vitrata* 유래의 sPLA<sub>2</sub> (Mv-sPLA<sub>2</sub>)의 open reading frame은 192개의 아미노산을 암호화하며, signal peptide, calcium-binding domain, catalytic site를 포함하고 있다. Phylogenetic 분석을 통해 Mv-sPLA<sub>2</sub>가 Group III sPLA<sub>2</sub>s와 연관되어 있음을 확인하였으며, 유충과 성충 단계에서 모두 발현을 보였다. Mv-sPLA<sub>2</sub>는 면역 반응에 의해 유도될 수 있는데, RNA interference (RNAi)를 통해 Mv-sPLA<sub>2</sub>이 세포 면역반응이 억제하도록 하여 애벌레의 발달을 손상할 뿐더러, 암컷 성체에서는 난모 세포가 발달하지 못하게 하는 것을 확인하였다. CRISPR/Cas9을 이용해 Mv-sPLA<sub>2</sub>를 결실한 *M. vitrata* 돌연변이 개체에서도 이러한 생리학적 변화가 관찰되었으며, 이 돌연변이 개체에서 western blot을 진행했을 때 Mv-sPLA<sub>2</sub>는 검출되지 않았다. 이후 eicosanoid와 PGE<sub>2</sub>를 처리했을 때에는 돌연변이가 있는 암컷 성체에서 유의한 난모세포 발달을 보였고, 이는 Mv-sPLA<sub>2</sub>가 *M. vitrata*의 면역, 발달 및 생식 과정에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

### 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

#### [Guide-it™ Complete sgRNA Screening System \(Code 632636\)](#)

- *Streptococcus pyogenes* 유래의 SpCas9과 함께 사용할 수 있는 sgRNA 합성 및 스크리닝 - sgRNA *in vitro* transcription, 합성 산물 정제, 스크리닝 과정의 모든 시약 포함
- 합성된 sgRNA의 *In vitro* screening을 통해, 실제 세포 실험 전에 sgRNA의 유효성 및 효율 확인

### 함께 사용할 수 있는 제품

#### [Guide-it™ Recombinant Cas9 \(10 μg/μl\) \(Code 632678\)](#)

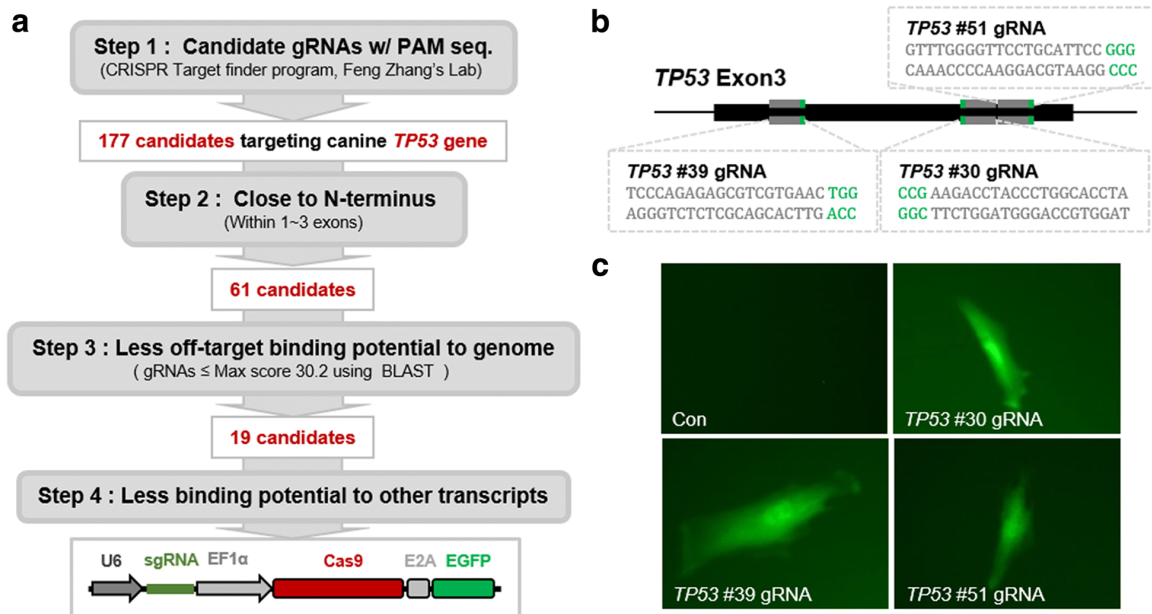
- sgRNA와 함께 도입하여 유전자편집이 가능한 고효율 SpCas9 endonuclease protein

## Establishment of TP53-knockout canine cells using optimized CRISPR/Cas9 vector system for canine cancer research

Kiyoung Eun, Min Gi Park, Yeon Woo Jeong, Yeon Ik Jeong, Sang-Hwan Hyun, Woo Suk Hwang, Sung-Hak Kim & Hyunggee Kim

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

### Abstract 미리보기



CRISPR/Cas9 시스템과 같은 유전 공학 기술은 질병 모델을 개발하고 유전자 기능을 결정하는 데 있어 효과적으로 사용될 수 있다. 최근 개의 암 모델에 대한 관심이 높아지면서, 개를 위한 유전 공학의 연구법이 개발될 필요성 또한 강조되고 있다. 본 논문의 저자들은 개의 가장 중요한 tumor suppressor gene 중 하나인 tumor protein 53 (*TP53*)을 타겟으로 하는 최적의 CRISPR/Cas9 시스템을 개발하고, 암 연구에 활용가능한 *TP53*이 knockout된 canine cell을 제작하였다. 이를 위해 *TP53*을 타겟으로 하면서도 off-target effect를 최소한으로 유발하는 3종의 sgRNA를 이용해 CRISPR/Cas9 vector를 구성하였다. 이후 해당 vector를 transfection한 뒤 무한한 세포 수명, 유전 독성에 대한 내성, 불안정한 genomic status에 관여하는 목적 locus에 indel mutation을 포함하는 몇몇 clone을 얻었다. 제작한 *TP53* knockout 세포 중, *TP53* gDNA #30번으로 knockout된 세포 (*TP53*KO#30)는 *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 oncogenic activation 없이 non-cancerous phenotype을 나타냈을 뿐 아니라, off-target mutation을 보이지 않았다. 또한 *TP53*KO#53 세포에서 체세포 핵 이식 기술을 적용한 후 발달 능력을 확인하였다. 본 논문은 CRISPR/Cas9 시스템을 이용해 canine cell에서의 *TP53*이 효과적이고 특이적으로 표적화 되었음을 확인하였고, CRISPR/Cas9을 이용한 *TP53* knockout cell이 항암 치료제 개발을 위해 새로운 oncogenic function과 효과를 밝히는 유용한 플랫폼이 될 수 있음을 보여준다.

### 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

#### [Guide-it™ Mutation Detection Kit \(Code 631448\)](#)

- 다양한 유전자 편집 기술로 도입된 변이 (insertion and deletion, indel) 확인
- DNA간 mismatch를 통한 mutation detection에 필요한 모든 구성품 포함

## Microglia ferroptosis is prevalent in neurodegenerative disease and regulated by SEC24B

Sean K. Ryan, Matija Zelic, Yingnan Han, Erin Teeple, Luoman Chen, Mahdiar Sadeghi, Srinivas Shankara, Lili Guo, Cong Li, Fabrizio Pontarelli, Elizabeth H. Jensen, Dinesh Kumar, Mindy Zhang, Joseph Gans, Bailin Zhang, Jonathan Proto, Jacqueline Saleh, James C. Dodge, Deepak Rajpal, Dimitry Ofengeim, Timothy R. Hammond

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

### └ Abstract 미리보기

철 조절 장애는 파킨슨병 (Parkinson's Disease, PD), 근위축성 측색 경화증 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS), 다발성 경화증 (Multiple sclerosis)를 비롯한 여러 신경 퇴행성 질환과 관련이 있으며, 뇌 영역 중에서도 철을 풍부하게 가지고 있는 microglia가 가장 많은 영향을 받는다. 하지만, 철이 과하게 축적되었을 때의 microglia의 생리적인 반응과 질병에 미치는 영향에 대해서는 알려져 있지 않다. 본 논문의 저자들은 microglia가 iron-dependent한 세포 사멸 현상인 ferroptosis에 매우 취약하다는 것을 보여준다. Ferroptosis를 유발하는 조건 하에서 hiPSC 유래의 neuron, astrocyte, microglia를 함께 배양하였을 때, microglia는 ferritin 발현 수준 증가, glutathione homeostasis 방해 및 cytokine signaling 변형 등을 보이며 세포 상태가 급격하게 변화했다. PD에서 이것과 유사한 ferroptosis-associated signature (FAS) microglia가 발견되었고, 이 특징은 PD 환자 혈액 샘플을 이용한 대규모 코호트 연구에서도 확인되면서 ferroptosis가 임상적으로 식별될 수 있다는 가능성을 보여준다. 본 논문에서는 genome-wide CRISPR screen을 통해 ferroptosis의 새로운 조절인자인 vesicle trafficking gene SEC24B를 밝혀냈다. 또한, small molecule screen을 통해 ferroptosis를 차단하는 몇몇 후보 물질을 지명하였으며, 그 중 일부는 이미 임상에서 사용되고 있다. 이 데이터는 ferroptosis가 세포 사멸과 염증의 경계선에 위치하며, microglia와 다른 뇌 세포에서 이를 억제함으로써 신경 퇴행성 질환을 치료하는 새로운 방법으로 사용될 수 있음을 시사한다.

### └ Takara 제품을 이용한 method 미리보기

[Lenti-X™ 293T Cell Line \(Code 632180\)](#)이 80% confluency로 배양되었을 때, 제조사의 가이드에 따라 Guide-it™ Genome-Wide sgRNA Library Transfection Mix (Code 632646 구성품)로 transfection하였다. 72시간 동안 3번에 걸쳐 배양 상층액을 회수하여 4 °C에서 10분간 500 x g로 원심분리한 후, 일부는 [Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit \(Code 631235\)](#)로 바이러스 역가를 측정하였다. 나머지는 [RetroNectin® \(Code T100A\)](#) 코팅된 plate에서 microglia로 transduction되었으며, [Guide-it™ CRISPR Genome-Wide Library PCR Kit \(Code 632651\)](#)를 이용해 sgRNA 서열 증폭 후 NextSeq500에서 분석되었다.

### └ 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

#### [Guide-it™ CRISPR Genome-Wide sgRNA Library System \(Code 632646\)](#)

- Brunello library를 기반으로, human genome에서 발현하는 19,000개 유전자의 표현형 스크리닝
- 각 유전자는 4개의 sgRNA를 포함하며, 총 76,000개의 sgRNA를 이용해 목적 세포 knock-out
- 스크리닝 후 분석을 위한 [Guide-it™ CRISPR Genome-Wide sgRNA Library NGS Analysis Kit \(Code 632647\)](#) 제품 지원

#### [RetroNectin® \(Recombinant Human Fibronectin Fragment\) \(Code T100A\)](#)

- Lentivirus, Retrovirus의 유전자 도입 효율 극대화하는 transduction enhancer