creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:21031-200000178190

이 학 석 사 학 위 논 문

CRISPR/Cas9을 이용한 어류 세포와 세균 유전자 타겟팅 및 그 발현 조절

2019년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

신 민 준

이 학 석 사 학 위 논 문

CRISPR/Cas9을 이용한 어류 세포와 세균 유전자 타겟팅 및 그 발현 조절

지도교수 김 기 홍

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2019년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

신 민 준

신민준의 이학석사 학위논문을 인준함

2019년 2월 22일

위 원 장 이학박사 정 현 도 (인)

위 원 이학박사 김 도 형 (인)

위 원 이학박사 김 기 홍 (인)

목 차

List of Tables ····· iii
List of Figures ····· iv
Abstract ····· v

제 1 장 CRISPR/Cas9 매개의 어류 면역 유전자 조절 및 그에 따른 영향 ··· 1

Ⅰ. 서 론 ····· 2

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 6
1. 세포 및 바이러스 ····· 6
2. Vector 제작 ····· 6
3. CRISPR system 발현세포 제작 ····· 9
4. 유전자 발현 분석 ····· 9
5. VHSV에 대한 Susceptibility 비교 ····· 10
6. 통계 분석 ····· 11

Ⅲ. 결 과 ····· 16
1. CRISPRi system의 표적 유전자 발현 억제 ····· 16
2. VHSV에 대한 CPE 양상 비교 ····· 18
3. CRISPRa system의 표적 유전자의 과발현 ····· 20

Ⅳ. 고 찰 ····· 23

제 2 장 CRISPR/Cas9 system을 이용한 Bacteria mutant 생산 ····· 25

Ⅰ. 서 론 ····· 26

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 27

1. 세균 균주 및 배양 조건 ····· 27

2. Vector 제작 ····· 27

3. Alr knock-out E. coli 제작 ····· 28

Ⅲ. 결 과 ····· 32

1. E. coli mutant strain 생산 ····· 32

Ⅳ. 고 찰 ····· 35

요 약 ····· 36

감사의 글 ····· 40

참고문헌 ····· 42

List of Tables

Table 1. Summary of primer used in this study ····· 13

1-1. For construction of CRISPR vectors ····· 13

1-2. For real-time PCR analysis ····· 15

Table 2. For construction of bacterial CRISPR editing vectors ····· 31

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

List of Figures

Fig 1-1. Position of sgRNA for CRISPR systems ····· 8

Fig 1-2. Construction of CRISPR application system expression vectors ····· 12

Fig 1-3. The HIF-1α gene expression of CRISPRi control cells, normal EPC cells, Delta HIF-1α cells and HIF-1α repression groups ····· 17

Fig 1-4. Observed CPE at 120 h post-infection of VHSV of MOI 0.00001 ···· 19

Fig 1-5. Expression of eGFP targeted CRISPRa system with control cells ··· 21

Fig 1-6. Expression of Mx gene targeted CRISPRa system with control cells ·· ····· 22

Fig 2-1. Construction of bacterial CRISPR editing system expression vectors ··· ····· 30

Fig 2-2. HindⅢ restriction of PCR products in E. coli ····· 33

Fig 2-3. Confirmation of *E. coli* genome editing ····· 34

CRISPR/Cas9 Mediated Targeting and Regulation of Gene Expression in Fish cells and Bacteria

MIN JUN SHIN

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

The bacterial adaptive immune system, CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), have spotlighted as a powerful and multi-purpose technology for genome editing. Recently, the CRISPR system expanded to the regulation of gene expression through the use of catalytically inactive dead Cas9 (dCas9); up-regulation through CRISPR activation (CRISPRa) and down-regulation through CRISPR interference (CRISPRi). The CRISPRi can interfere the expression of specific genes like customized DNA-binding proteins such as zinc-finger proteins or transcription activator-like effectors (TALEs) have been used as tools for sequence-specific DNA targeting and gene regulation. The nuclease-deficient Cas9, termed dCas9, guided by a single guide RNA (sgRNA) binds a target in genomic DNA without cleaving it, and the dCas9 - sgRNA complex interfere with transcription elongation by blocking RNA polymerase (Pol) or transcription initiation by disrupting transcription factor binding. The CRISPRa system are expressed by using the dCas9 fused proteins can recruit transcription activators such as transcriptional activation domains (ADs). In natural systems, transcriptional initiation occurs through the coordinated recruitment of the necessary machinery by a number of locally concentrated transcription-factor

ADs, so these ADs fusion protein can induce robust expression of target gene by the sgRNA targeting promoters region of the gene near transcription start sites (TSSs). In this study, By using the present CRISPR system and the application technologies, we want to check the regulation of target genes in fish cells, and differences of responses according to changed expression of targeted immune-related genes. The differences are also checked with cells knocked-out the genes by CRISPR-Cas9 system. We choose α subunit of Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), which is key role in cellular homeostasis to hypoxia, as a target of CRISPRi system, and induced the down-regulation of the target gene in *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells. Additionally, in previous study the HIF-1α knock-out EPC cells showed the resistance to apoptosis and cytopathic effect (CPE) induced by Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) more then normal EPC cells, so changes of susceptibility to VHSV in the EPC cell repressed expression of HIF-1α by CRISPRi system were analyzed with the EPC cells knocked-out HIF-1α gene. By the CRISPRa system, the activation of eGFP expression by targeting a CMV promoter in exogeneous plasmid vector was analyzed in EPC cells, and we induced the activation of Mx gene, known as antiviral protein, as endogenous target by targeting a promoter of the Mx gene in *Hirame natural embryo* (HINAE) cells. The repression of HIF-1α in EPC cells was analyzed through Quantitative real-time PCR (qPCR), and a robust and specific knockdown of HIF-1α was detected. The changes of susceptibility of VHSV in the EPC cells repressed expression of HIF-1α were analyzed through comparing the time of CPE observation with the HIF-1α knock-out EPC cells. The HIF-1α repression EPC cells showed the similar resistance to that of HIF-1α knock-out EPC cells. The activation of target genes was also analyzed through qPCR, and the expression of eGFP multiplied almost sixfold then control EPC, and the expression of Mx gene also multiplied more then 20-fold then control HINAE cells. By this study, the regulation of the target genes by the CRISPR

application systems was confirmed in fish cells, and in further study these systems can utilize in several different ways by changing appropriate target of the systems to induce dramatic effect. We checked that the cells repressed the target gene by CRISPRi system showed similar response to the cells knocked out the gene, this result show a possibility to use the system for loss-of-function analysis.

The CRISPR-Cas9 system have developed as a genome editing technology, and productions of mutant in organism become relatively easier than that by past methods because of this technology. Because of this development, methods for the production of mutant bacteria was changed from complex traditional method such as using allelic exchange by conjugation to simple method; Using only a vector expressing CRISPR-Cas9 system and a donor template contained homologous arms for induction of Homologous directed recombination (HDR). In this study, we choose a gene of alanine racemase (alr), an enzyme catalytic for change L-alanine to D-alanine that is essential for cell wall synthesis in bacteria, in *Escherichia coli* (*E. coli*) as a target of CRISPR/Cas9 system, and induced the mutation of alr gene in *E. coli* by this system. The production of mutant strain knocked out alr gene was performed by transformation of vectors expressing CRISPR/Cas9 system and containing donor template targeting alr gene, and the changes of alr gene sequence in *E. coli* was detected by PCR and sequencing of the gene. Conclusionally, the mutation of *E. coli* was checked by sequencing of alr gene to equal donor template design, and we checked the successful production of induced mutant strain of E. coli by the system. This system can be extended out pathogenic bacteria in aquaculture, and enable to induce mutation easily such as the auxotrophic mutant, and at a further study, the mutant would be used as a attenuated vaccine.

제 1 장

CRISPR/Cas9 매개의
어류 면역유전자 조절 및 그 영향

Ⅰ. 서 론

박테리아의 면역 시스템인 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)는 요즘 가장 각광 받고 있는 강력한 유전자 편집 도구로써, 다양한 목적을 위해 유전자를 조작하는데 사용되고 있다. 특히 가장 널리 쓰이고 있는 CRISPR/Cas 시스템인 type II의 CRISPR/Cas9 system은 nuclease 활성을 지니는 Cas9 protein과 CRISPR RNA (crRNA)와 trans-activating crRNA (tracrRNA)가 complex를 이루어 표적 유전자를 인식하는 guide RNA로 구성되며, protospacer-adjacent motif (PAM)을 포함하면서 crRNA의 spacer 부분과 일치하는 표적 유전자를 특이적으로 절단할 수 있다. crRNA와 tracrRNA는 single guide RNA (sgRNA)로 융합되어 실질적으로 Cas9과 sgRNA의 발현만으로 특정 유전자를 편집할 수 있으며, 이로 인해 유전자 편집 도구로써 가장 보편적으로 사용되고 있다 (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). 최근에는 이 CRISPR system을 응용하여 유전자 편집 도구가 아닌 유전자 발현을 조절하는 도구로써 활용되고 있는데, 이는 Cas9의 nuclease 활성을 띄는 domain들을 (RuvC I, HNH) mutation시킴으로 endonuclease 활성을 잃은 dead Cas9 (dCas9)을 통해 이루어진다. 이는 크게 두 가지로 구분되는데, 표적 유전자를 억제하는 CRISPR interference (CRISPRi)와 반대로 과발현을 유도하는 CRISPR activation (CRISPRa)로 나눌 수 있다 (Gilbert et al., 2013, 2014; Qi et al., 2013). CRISPRi의 경우, Zinc-finger proteins (ZFNs) 혹은 Transcription activator-like effectors (TALEs)등의 DNA binding protein을 통해 DNA의 특정 염기서열을 표적으로 하여 유전자를 조절하는 기존

의 방식과 유사하게 작동한다. endonuclease 활성을 잃은 dCas9을 sgRNA를 통해 유전자의 promoter 혹은 operator region에 결합시킬 경우, transcription factor의 결합을 막아 transcription의 initiation을 방해하여 특정 유전자의 발현을 억제하거나, ORF 부분에 결합시킬 경우, RNA polymerase의 결합 혹은 elongation을 방해하여 그 발현을 억제할 수 있다. 기존의 유전자를 억제하는 가장 보편적인 방식은 RNA interference (RNAi)와 앞서 언급한 합성된 DNA-binding protein이 있으며, RNAi는 특정 개체에서는 작동하지 않을 수 있고, 때때로 off-target effect나 독성을 나타낼 수 있으며, DNA-binding protein 같은 경우는 그 제작이 어렵고 생산 비용과 시간이 많이 드는 한계점이 있다. 그러므로 CRISPRi system은 CRISPR/Cas9 system과 같이 두 가지의 구성 요소만을 발현하여 간단하게 특정 유전자를 타겟팅하여 억제할 수 있다는 장점을 지닌다. CRISPRa의 경우, dCas9에 transcription activator를 모집할 수 있는 transcriptional activation domains (ADs)을 융합하여 사용한다. 자연적으로 일어나는 전사는 특정 위치에 집중된 transcription-factor의 AD에 의해 전사에 필요한 기관들이 모임으로 시작되는데, 이 dCas9과 AD의 복합체는 transcription start sites (TSSs) 주변부의 promoter를 sgRNA를 통해 타겟팅하여 인위적으로 transcription factor를 모집함으로 특정한 유전자의 강력한 발현을 유도할 수 있다. 본 연구에서는 앞서 언급한 CRISPR-Cas9 system 및 응용 기술들을 어류 세포 안에서 적용하여 표적 유전자에 대한 조절과 함께 CRISPR-Cas9 system에 의해 구축된 특정 면역 유전자가 결핍된 어류 세포와 비교하여 달라진 양상의 차이를 관찰하고자 하였다. CRISPRi system을 이용하여 hypoxia에 대한 세포 항상성에서 중심적인 역할을 하는 Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)의 구성 요소 중 하나인 HIF-1α 유전자를 표적으로 하여 그 발현을 억제하고자 하였다. HIF-1

protein은 α와 β 두 개의 subunit으로 구성되며 normoxia 환경에서 prolyl hydroxylase에 HIF-1α의 proline 잔기가 hydroxylation 되어 von Hippel-Lindau (vHL)와 반응함으로 유비퀴틴이 표지되어 분해되는 형태로 조절되다가 hypoxia 환경에서 hydroxylase가 저해되어 안정적이게 발현되어 상시 발현되고 있는 HIF-1β와 heterodimer를 이루어 hypoxic response elements (HREs)에 결합하여 특정 유전자를 조절하는 transcription factor로 작용한다. HIF protein에 의해 조절되는 유전자는 hypoxia에 대한 세포의 항상성 유지에 관여하는 유전자로 알려져 있으나, 최근에는 HIF protein에 의해 조절되는 유전자들 중에 innate immune response와 연관된 유전자도 포함되어 있는 것으로 알려지고 있다 (Carbia-Nagashima, A. et al., 2007; Walmsley, S. R. et al., 2005). 본 연구에서는 어류 세포인 *Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) 세포에서 HIF-1α을 CRISPRi system의 표적으로 하여 해당 유전자 발현의 억제를 유도하였으며, 추가적으로 CRISPR/Cas9 system에 의해 구축된 HIF-1α knock-out EPC 세포와 함께 Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)에 대한 감염성의 차이를 관찰하고 하였다. 이는 이미 이전 연구에서 HIF-1α가 knock-out된 EPC 세포가 정상적으로 유전자를 발현하는 세포에 비해 VHSV에 의한 CPE와 apoptosis에 대해 높은 저항성을 확인하였기 때문에 HIF-1α가 억제된 세포에서 나타나는 양상과 비교해 보고자 하였다 (M.S. Kim and K.H. Kim., 2018). CRISPRa system을 구축하기 위해 다양한 AD candidate 중에 효과적이라고 알려진 VPR domin (VP64, p53, Rta)을 선정하여 dCas9에 융합하였다 (Alejandro, C et al., 2015). 이를 이용하여 먼저 외부 유전자에 대한 과발현을 유도하기 위해 CMV ptromoter를 통해 eGFP를 발현하는 플라스미드의 CMV promoter를 표적으로 eGFP의 과발현을 EPC 세포에서 유도 하였으며, 이후 내부 유전자의 과발현을 유도하

기 위해 IFN반응에 의해 유도되는 대표적인 antiviral 단백질로 알려져 있는 Myxovirus resistance (Mx)유전자의 promoter를 표적으로 하여 *Hirame natural embryo* (HINAE) 세포의 Mx 유전자의 과발현을 유도하고자 하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 세포 및 바이러스

실험에 사용된 세포는 American type culture collection (ATCC)에서 분양받은 EPC (ATCC CRL-2872)와, 넙치에서 분리한 HINAE cell line (Kasai, H. et al., 2001)이며, 이는 Leibovitz L-15 medium (L-15, sigma)에 Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 ㎍/ml) 항생제 (WELGENE)와 10% fetal bovine serum (FBS, WELGENE)이 첨가된 배지에서 배양되었다. EPC 세포는 28℃에서, HINAE 세포는 25℃에서 배양되었다.

바이러스는 넙치 병어에서 분리한 VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) KJ2008 strain (GeneBank: JF792424.1)을 사용하였으며, 바이러스 감염성 실험 시 2% FBS를 첨가한 배지를 사용하였다.

2. CRISPRi 및 CRISPRa system 발현 vector 제작

endonuclease 활성을 잃은 dCas9을 제작하기 위해, CMV promoter를 통해 하나의 plasmid 안에서 human optimized *Streptococcus pyogenes* Cas9 (hSp Cas9)과 sgRNA를 발현하는 All-in-one Cas9 SmartNuclease ™ Vector (System Biosciences)를 모체로 site-directed mutagenesis

(SDM)을 통해 Cas9의 nuclease domain을 비활성화 시켰다. 첫 번째 domain을 Cas9 protein의 10번째 아미노산인 aspartic acid (Asp)를 alanine (Ala)으로 치환하여 (D10A) 비활성화 하였고, 두 번째 domain을 840번째 아미노산인 histidine (His)을 Ala로 치환하여 (H840A) 비활성화 시켰다. 추가적으로 Cas9 발현 cassette와 sgRNA 발현 cassette를 restriction enzyme을 통해 재조합할 수 있도록 SDM을 통해 enzyme site를 추가하였으며, 중복되는 enzyme site를 SDM을 통해 제거하였다. 표적 세포에서 vector의 transfection이후 selection을 하기 위해 pFC vector (System Biosciences)의 kanamycin/Neomycin resistance cassette를 cloning하여 restriction enzyme을 통해 기존의 kanamycin cassette와 치환하였다. VPR activation domain은 Addgene에서 분양받은 SP-dCas9-VPR (#63798)을 restriction enzyme site와 함께 cloning 하여 pGEM-T Easy vector (Promega)를 통해 증폭한 이후 기존의 vector의 dCas9에 C terminal에서 발현될 수 있도록 restriction enzyme을 통해 추가하였다. sgRNA cassette는 pGEM-T Easy vector 상에서 SDM을 통해 각각의 표적에 특이적으로 붙을 수 있도록 디자인하여, restriction enzyme을 통해 기존의 것과 치환하는 형식으로 제작하였으며, sgRNA의 효율을 위해 5′말단과 3’말단에 추가적인 RNA가 없도록 self-cleavage를 일으키는 Ribozyme을 부착하였으며, 각각 Hammerhead ribozyme과 HDV ribozyme을 사용하는 RGR system을 통해 sgRNA를 발현하도록 하였다 (Gao Y, Zhao Y., 2014). sgRNA의 guide sequence는 sgRNA의 design tool (http://www.rgenome.net/be-designer/, http://chopchop.cbu.uib.no/)을 통해 prediction한 후보를 통해 제작하였다. HIF를 표적으로 한 경우, EPC cell의 genome project에 의해 밝혀진 대로 HIF-1α에 대한 2개의 paralogue (HIF-1α-aa, HIF-1α-ab)를 지니는데, 이전 연구에서 HIF-1α

-ab가 정상 조건에서도 강하게 발현하고 있다는 것을 분석 하였으므로 (M.S. Kim and K.H. Kim., 2018), HIF-1α-ab를 표적으로 하여 guide sequence를 구상하였다. 또한 ORF에 대한 sgRNA의 부착 위치에 따른 interference의 효율을 비교해보기 위해 HIF-1α ORF의 상, 중, 하를 표적으로 하도록 3개의 sgRNA를 디자인 하였다. Mx promoter와 CMV promoter에 대한 gRNA는 이전 연구를 참고하여 TSS로부터 500bp 내외로 결합하도록 디자인 하였다 (Gilbert L.A. et al., 2014).

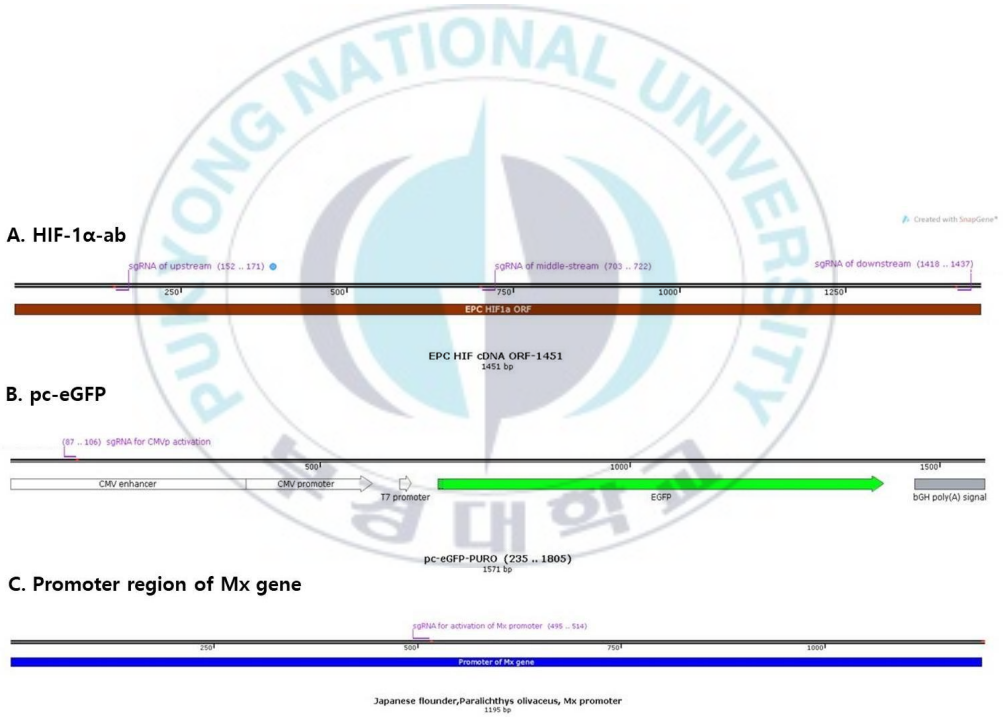

Figure 1-1. Positions of sgRNA for CRISPR systems. (A) sgRNA positions for HIF-1α-ab gene repression. (B) sgRNA position for CMV promoter to activate eGFP gene expression. (C) sgRNA position for promoter region of HINAE Mx gene to activate Mx gene expression.

3. CRISPR system 발현 세포 제작

유전자 발현 조절을 위한 CRISPR activation과 CRISPR interference system을 발현하는 세포를 제작하기 위해 Neon® Transfection system (Invitrogen)을 이용하여 각각의 vector들을 transfection 하였다. CRISPRi system 발현 vector는 EPC 세포에 transfection 되었으며, 이후 G-418 (800 μg/ml, Sigma)을 포함한 L-15배지에서 selection을 통해 배양되었다. CRISPRa system 발현 vector는 EPC 세포에 transfection 하여 G-418을 통해 selection하였으며. selection 이후 target인 CMV promoter를 통해 eGFP를 발현하는 pc-eGFP-PURO vector를 추가적으로 transfection 하여 puromycin (400 mg/ml, Sigma)을 통해 selection 하였다. HINAE 세포에서는 CRISPRa system 발현 vector를 transfection하여 G-418 (400 μg/ml)을 통해 selection하여 배양하였다.

4. 유전자 발현 분석

각 system의 작동 여부를 확인하기 위해 각각의 system vector의 sgRNA cassette를 제거함으로 dCas9 혹은 dCas9-VPR 만을 발현하는 control cell을 제작하였다. 이들과 함께 각각의 실험군 세포들을 6-well plate에 $3x10^6$ cells/well이 되도록 배양하여, Hybrid-R Kit (GeneAll, Korea)를 통해 각 세포의 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA는

DNase I을 처리하여 Riboclear plus Kit (GeneAll)을 통해 정제함으로 잔여 DNA를 제거해주었다. 추출한 RNA 1μg으로 Oligo(dT) primer를 포함한 Transcription Master Premix (Elpis, Korea)를 통해 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA는 RT-PCR을 통해 표적의 발현을 house keeping gene인 β-actin의 발현과 비교하여 상대정량을 통해 발현양을 확인하였으며, control cell의 발현량을 기준으로 과발현 혹은 억제 양상을 뛰는지 관찰하였다. quantitative real time PCR (qPCR)은 5 μl의 5배 희석된 cDNA와 5 pM의 한 쌍의 primer 1 μl를 포함한 20 μl의 용량으로 2× SYBR Green Premix (Enzynomics, Korea)를 사용하여 qPCR을 수행하였다. qPCR은 Light Cycler 480 (Roche)를 통해 이루어졌으며, 조건은 먼저 95 ℃에서 15분 동안 pre-incubation을 수행하였고, 이후 95 ℃ 10초, 60 ℃ 10초, 72 ℃ 20초를 한 cycle로 총 30회 수행하였다.

5. VHSV에 대한 Susceptibility 비교

각각의 CRISPR system이 적용된 EPC 세포는 $3x10^6$/35mm dish가 되도록 배양한 후, 배양 적온에서 하루 간격으로 20℃, 15℃로 낮추어 VHSV를 2% FBS L-15배지로 교체하여 MOI 0.001, MOI 0.0001, MOI 0.00001의 농도로 VHSV를 접종하였다. 바이러스 접종 24, 48, 72, 96, 120시간 이후 각각의 세포의 CPE를 현미경을 통해 관찰하였다. 각 세포에서 CPE가 나타나는 시점을 비교하여 VHSV에 대한 감수성의 변화를 측정하였다.

6. 통계 분석

Real-time PCR을 통한 상대정량 실험에서 반복구의 유의차는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 통해 점정하였다. P value의 표기는 GP Prism style로 표기 하였다. ($p<0.1234$(ns), $p<0.0332$(*), $p<0.0021$(**), $p<0.0002$(***), $p<0.0001$(****))

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

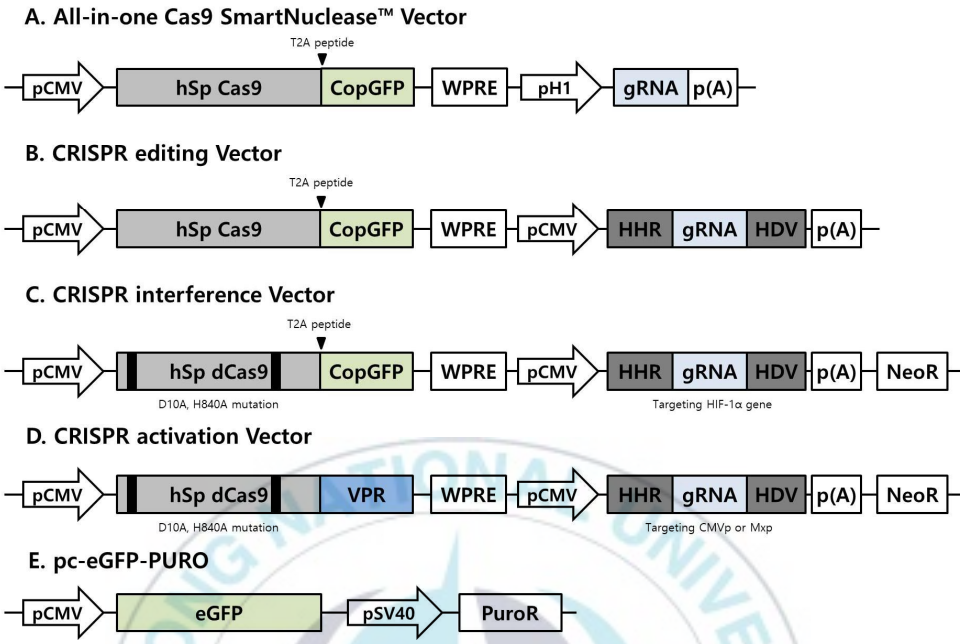

Figure 1-2. Construction of CRISPR application system expression vectors. (A) Origin of CRISPR vectors, All-in-one Cas9 SmartNuclease vector. (B) CRISPR vector for genome editing. (C) CRISPR vector for repression of target gene. (D) CRISPR vector for activation of target gene. (E) Target plasmid of CRISPRa system for activation of eGFP expression.

Table 1-1. For construction of CRISPR vectors

Name	Sequence (5'-3')
D10A SDM F	AAAAAGTATAGTATCGGACTGGCTA
	TTGGCACTAACAGCGTGGGA
D10A SDM R	TCCCACGCTGTTAGTGCCAATAGCCA
	GTCCGATACTATACTTTTT
H840A SDM F	CTGTCAGATTATGACGTGGATGCTA
	TCGTCCCACAGTCATTCCTG
H840A SDM R	CAGGAATGACTGTGGGACGATAGCA
	TCCACGTCATAATCTGACAG
Cas9 input AvrII SDM F	CTGTCCCAGCTGGGGGGAGACCCTAG
	GAAACGCCCAGCCGCCACCAAGA
Cas9 input AvrII SDM R	TCTTGGTGGCGGCTGGGCGTTTCCTA
	GGGTCTCCCCCCAGCTGGGACAG
Cas9 input BamHI F	GTGGGCATCCACGGCGTGCCCGGATC
	CGACAAAAAGTATAGTATCGGAC
Cas9 input BamHI R	GTCCGATACTATACTTTTTGTCGGA
	TCCGGGCACGCCGTGGATGCCCAC
Cas9 input AflII SDM F	CTGTCCCAGCTGGGGGGAGACCTTAA
	GAAACGCCCAGCCGCCACCAAGA
Cas9 input AflII SDM R	TCTTGGTGGCGGCTGGGCGTTTGCTT
	AAGTCTCCCCCCAGCTGGGACAG
RGR input NheI SDM F	CTTCGGCATGGCGAATGGGACGCTA
	GCGGGCCCGTTTAAACCCGCTGAT
RGR input NheI SDM R	ATCAGCGGGTTTAAACGGGCCCGCT
	AGCGTCCCATTCGCCATGCCGAAG
RGR input BssHII SDM F	ACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCGC
	GCGCCTCCCTGATGAGTCCGTGAG
RGR input BssHII SDM R	CTCACGGACTCATCAGGGAGGCGCGC
	GCCAGCTTGGGTCTCCCTATAGT
VPR AvrII F	CCTAGGCCCAAGAAGAAGAGGAAGG
VPR SalI R	GTCGACTCAAAACAGAGATGTGTCG
Mx sgRNA SDM F	ACGAGTAAGCTCGTCGCCATCGGGCA
	ACTATTACAGTTTTAGAGCTAGA
Mx sgRNA SDM R	TCTAGCTCTAAAACTGTAATAGTTG

Mx sgRNA HHR SDM F	CCCGATGGCGACGAGCTTACTCGT GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGATG
Mx sgRNA HHR SDM R	GCCTGATGAGTCCGTGAGGACGAA TTCGTCCTCACGGACTCATCAGGCCA
CMV sgRNA SDM F	TCGCTAGCCAGCTTGGGTCTCCC ACGAGTAAGCTCGTCCTTACGGTAA
CMV sgRNA SDM R	ATGGCCCGCCGTTTTAGAGCTAGA TCTAGCTCTAAAACGGCGGGCCATT
CMV HHR SDM F	TACCGTAAGGACGAGCTTACTCGT CGCGGGAATTCGATTGCGCGCCGTAA
CMV HHR SDM R	GCTGATGAGTCCGTGAGGACGAA TTCGTCCTCACGGACTCATCAGCTTA
HIF middle sgRNA SDM F	CGGCGCGCAATCGAATTCCCGCG CGAGTAAGCTCGTCAGGAAGGTCTT
HIF middle sgRNA SDM R	GCTGTCCAGGTTTTAGAGCTAGAA TTCTAGCTCTAAAACCTGGACAGCA
HIF mid sgRNA HHR SDM F	AGACCTTCCTGACGAGCTTACTCG AGGGAGACCCAAGCTGGCGCGCCTTC
HIF mid sgRNA HHR SDM R	CTCTGATGAGTCCGTGAGGACGA TCGTCCTCACGGACTCATCAGAGGA
HIF down sgRNA SDM F	AGGCGCGCCAGCTTGGGTCTCCCT CGAGTAAGCTCGTCGAAAGGGAAGT
HIF down sgRNA SDM R	CCTCTGCTCGTTTTAGAGCTAGAA TTCTAGCTCTAAAACGAGCAGAGGA
HIF down sgRNA HHR SDM F	CTTCCCTTTCGACGAGCTTACTCG AGGGAGACCCAAGCTGGCGCGCCCTT
HIF down sgRNA HHR SDM R	TCCTGATGAGTCCGTGAGGACGA TCGTCCTCACGGACTCATCAGGAAA GGGCGCGCCAGCTTGGGTCTCCCT

Table 1-2. For Real-tim PCR analysis

Name	Sequence (5'-3')
EPC β-actin realtime F	AAGGAGAAGCTCTGCTATGTGGCT
EPC β-actin realtime R	AAGGTGGTCTCATGGATACCGCAA
EPC HIF-1α ab realtime F	CTCTGGTGACACAGAGAAAGA
EPC HIF-1α ab realtime R	CTCAGATAGGACCATGAGGAAAC
HINAE β-actin realtime F	GATCTGGCATCACACCTTCTAC
HINAE β-actin realtime R	CATCTTCTCCCTGTTGGCTTTA
EGFP realtime F	GAACCGCATCGAGCTGAA
EGFP realtime R	TGCTTGTCGGCCATGATATAG

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Ⅲ. 결　　과

1. CRISPRi system에 의한 HIF-1α gene의 억제

Control 세포로써 sgRNA 없이 dCas9만을 발현하는 EPC 세포인 CRISPRi control 세포와 비교하였을 때, CRISPR interference system을 이용하여 HIF-1α의 발현을 억제 시킨 세포들의 HIF-1α 발현량이 효과적으로 억제된 것을 확인할 수 있었다. 또한 sgRNA의 binding site에 따른 interference의 효율을 비교해 보았을 때, 모두 유의미한 유전자 억제를 일으키지만 CRISPRi Middlestream 세포가 가장 높은 효율로 HIF-1α의 발현을 억제하는 것을 확인하였다.

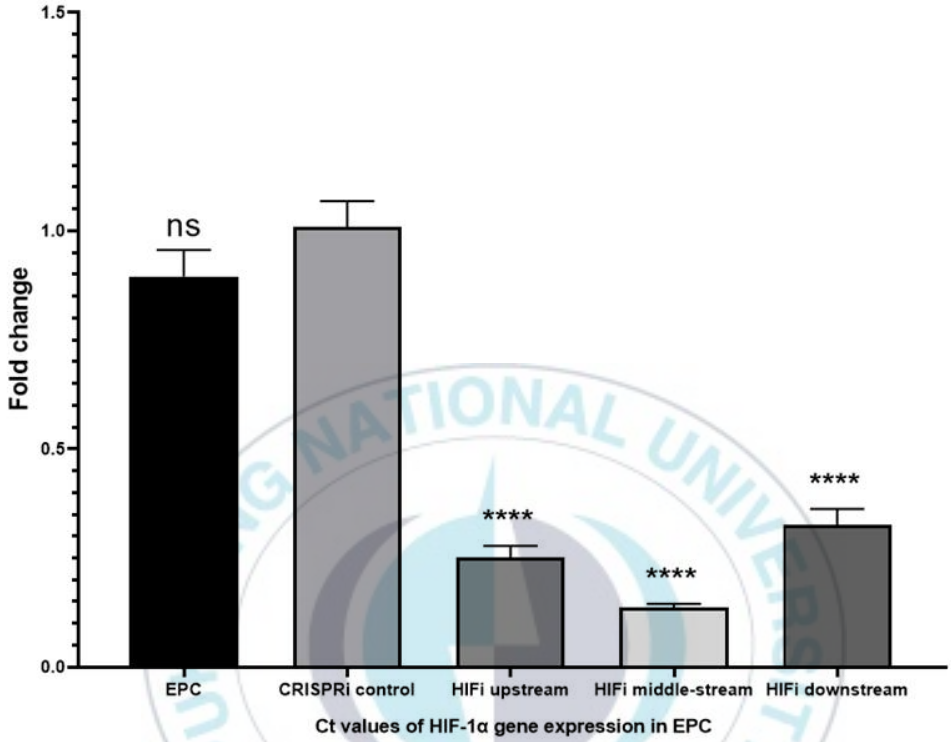

Figure 1-3. The HIF-1α gene expression of CRISPRi control cells, normal EPC cells, Delta HIF-1α cells and HIF-1α repression groups (Targeting Upstream, Middle-stream and Downstream of HIF-1α). The expression of genes was analyzed through qPCR. Statistical significant differences between groups are indicated with asterisks, $p<0.1234$(ns), $p<0.0332$(*), $p<0.0021$(**), $p<0.0002$(***), $p<0.0001$(****).

2. VHSV에 의한 CPE 양상 비교

Normal EPC 세포와 함께 sgRNA 없이 dCas9 만을 발현하는 CRISPRi control EPC 세포와 비교하였을 때, HIF-1α 유전자를 억제시킨 그룹 모두 비교적 VHSV에 대한 저항성이 높은 것으로 확인되었고, 특히 qPCR 결과에서 가장 높은 효율의 억제를 나타내었던 HIF-1α 유전자의 middle-stream을 표적으로 두었던 그룹에서 HIF-1α 유전자가 knock out된 delta HIF EPC 세포와 유사하게 VHSV에 의한 CPE에 대해 높은 저항성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

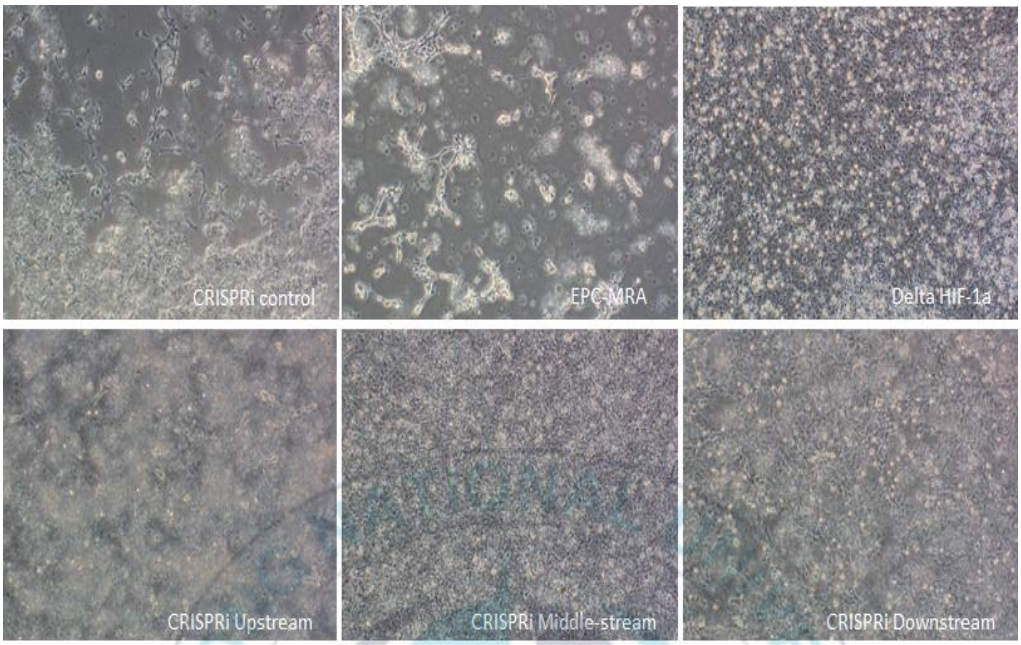

Figure 1-4. Observed CPE at 120 h post-infection of VHSV of MOI 0.00001. CRISPRi control EPC expressing only dCas9, Normal EPC, HIF-1α knock out EPC, and HIF-1α repression groups (Targeting Upstream, Middle-stream and Downstream of HIF-1α).

3. CRISPRa system을 통한 표적 유전자 과발현 유도

CRISPRa system을 통한 exogenous reporter gene의 activation을 확인하기 위해 negative control로써 CMV promoter를 통해 eGFP를 발현하는 pc-eGFP plasmid 만을 지닌 EPC 세포와 비교하였으며, control 세포와 동일한 pc-eGFP와 함께 CMV를 표적으로 하는 CRISPRa vector를 지니는 실험군의 eGFP 발현을 비교하였을 때, 약 6배 정도의 차이로 과발현 되는 것을 확인할 수 있었다. endogenous한 유전자인 Mx 유전자를 표적으로 한 경우, control 세포인 gRNA 없이 dCas9-VPR만을 발현하는 HINAE 세포에 비해 Mx promoter region을 표적으로 한 CRISPRa vector를 지니는 HINAE 세포의 클론 모두 약 20배 이상 과발현이 되는 것을 확인할 수 있었다.

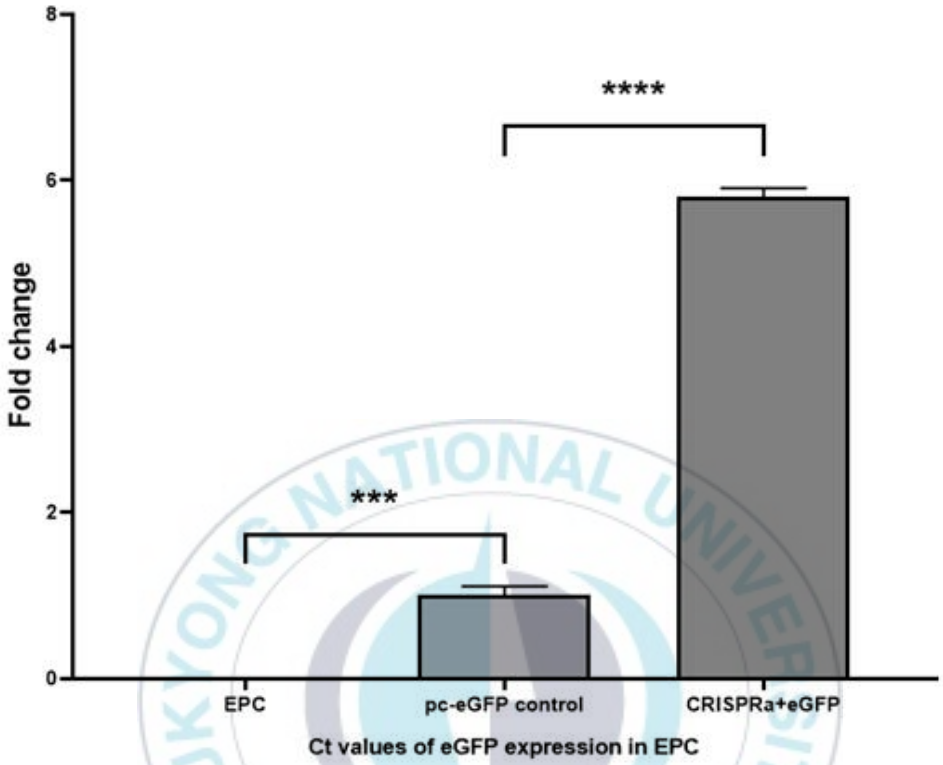

Figure 1-5. Expression of eGFP targeted CRISPRa system with control cells. Normal EPC cells, EPC cells transfected pc-eGFP as control cells and EPC cells transfected pc-eGFP and CRISPRa vectors. The expression of genes was analyzed through qPCR. Statistical significant differences between groups are indicated with asterisks, $p<0.1234$(ns), $p<0.0332$(*), $p<0.0021$(**), $p<0.0002$(***), $p<0.0001$(****).

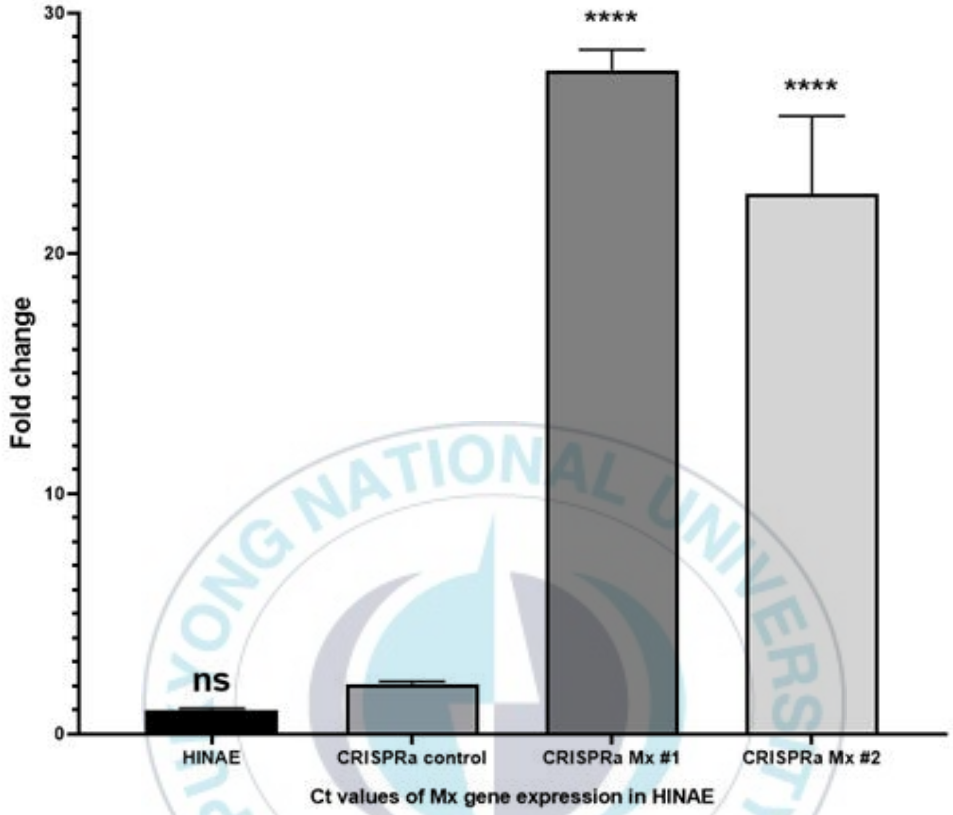

Figure 1-6. Expression of Mx gene targeted CRISPRa system with control cells. HINAE cells, CRISPRa control cells and Mx activation groups (Mx #1 and Mx #2). Statistical significant differences between groups are indicated with asterisks, $p<0.1234$(ns), $p<0.0332$(*), $p<0.0021$(**), $p<0.0002$(***), $p<0.0001$(****).

Ⅳ. 고 찰

이전 세대의 유전자 편집 도구에 비해 CRISPR/Cas9 시스템은 획기적인 장점을 지님으로 다양한 방면에서 활용되고 있다. 본 연구 또한 이를 활용하여 특이적이고 강력한 유전자 발현 조절 도구로써 사용하려 하였다. HIF-1α에 대한 CRISPR intereference를 관찰하였을 때 유의적인 발현 억제를 관찰하였으며, 그 특성 또한 HIF-1α가 deletion된 세포와 비슷한 양상을 나나내는 것을 VHSV 감염에 의한 CPE 관찰을 통해 확인하였다. 이를 통해 다양한 장비들과 과정을 요하는 직접적인 유전자 편집 없이 이에 준하는 효과를 본 시스템을 통해 상대적으로 간단하게 나타낼 수 있는 것을 확인 하였다. 이러한 면에서, 특정 유전자의 기능을 밝혀내기 위해 그 발현을 억제하여 그 특성을 관찰하는, Loss-of-function analysis를 수행하기 위한 도구로써 보다 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히 상대적으로 경제적이 라는 것과 간단 하다는 장점이 유전자의 기능에 대한 분석이 뒤쳐진 어류에 대한 연구에 적합한 수단이 될 것으로 보인다.

gRNA의 결합 위치가 ORF의 5'말단 쪽에 가까울수록 높은 효율을 보인다는 이전 연구자들의 결과와 달리 본 실험에서는 HIF-1α의 억제에서는 그러한 경향을 볼 수 없었다. 이는 회복 가능하도록 가역적으로 유전자를 조절하는 시스템 특성상, hypoxia에 의한 자극으로 발현이 activation 될 수 있는 HIF-1α와 같은 유전자를 표적으로 할 경우 다양한 변수에 의해 유전자의 억제가 회복될 수 있기 때문인 것으로 보인다. CRISPR activation system 또한 표적으로 하는 promoter의 특성에 따라 그 발현 효율이 차이나는데 이는 promoter가 다양한 transcription factor에 의해 조절되기 때문

에 이러한 조절 기작들이 섞여 있는 유전자는 CRISPRi system과 같이 다양한 변수에 의해 그 효과가 반감될 수 있기 때문인 것으로 보인다. 다양한 장점을 확인하였음에도 불구하고 가역적인 변화이기 때문에 다양한 인자에 민감하게 반응하는 유전자를 표적으로 하였을 경우 효과적으로 유전자의 조절을 일으키지 못 하는 경우가 발생한다. 이전 연구에서 reference로 제시하였던 효과에 비해 상대적으로 낮은 효과를 나타내는 것 또한 (Mandegar M.A. et al., 2016; Alejandro, C et al., 2015), sgRNA의 적용 개수, 결합하는 위치 등의 다른 요소에 의해서도 크게 영향을 받지만 표적 유전자가 지니는 특성 또한 크게 작용한 것으로 보인다. 따라서 추후의 실험에서 다른 변수에 의해 민감하게 반응 하지 않으면서도 적게 발현되거나 혹은 상대적으로 풍부하게 발현되는 유전자를 표적으로 하여, 다수의 sgRNA의 결합 및 적절한 결합 위치 선정으로 더욱 드라마틱한 유전자 발현 조절을 유도할 수 있을 것으로 보인다.

제 2 장

CRISPR/Cas9 system을 이용한 mutant bacteria 생산

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Ⅰ. 서 론

유전자 편집 도구로써 CRISPR-Cas9 system의 발달로 다양한 개체에서 비교적 손쉽게 돌연변이를 제작할 수 있게 되었다. 이에 따라 suicide vector를 이용한 allelic exchange 혹은, DNA binding proteins (ZFNs, TALEs)를 이용하는 등의 복잡하고, 고비용과 시간을 요구하는 기존의 세균 돌연변이 유도 방식을 탈피하고 (Fyodor D.U., 2018), CRISPR-Cas9 system을 발현하는 plasmid vector를 통해 유전체의 double strand-break (DSB)를 발생시키고, Homologous directed recombination (HDR)을 유도할 Donor template를 공급함으로 손쉽게 의도한 대로 돌연변이를 유도할 수 있게 되었다. 본 연구에서는 *Escherichia coli*를 표적으로 하여 세포벽 합성에 필수적인 D-alanine을 L-alanine으로부터 변환하는 효소인 Alanine racemase의 유전자를 knock out 시키고자 하였다. 이를 위해 세균에서 CRISPR/Cas9 system을 발현할 수 있는 vector와 *E. coli*의 alr 유전자에 대한 donor template를 제작하여 이를 통해 *E. coli* mutant strain을 생산하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 세균 균주 및 배양 조건

*Escherichia coli*는 HDR을 위해 RecA gene이 제거되지 않은 MC1061 strain (Casadaban et al., 1980)을 competent cell로 사용하였으며, Luria-Bertani (LB, Difco) 배지에서 37℃로 배양되었다. 필요할 경우, 적절한 항생제 (ampicillin, kanamycin)를 배지에 추가해 주었으며, 최종 농도가 50 μg/ml이 되도록 처리하였다.

2. Bacterial CRISPR editing 벡터 제작

Bacterial CRISPR editing vector는 All-in-one Cas9 SmartNuclease™ Vector (System Biosciences)의 hSp Cas9을 이용하였으며, 발현을 위해 이전의 연구에서 (Choi et al., 2010) 구축된 E. tarda의 constitutive promoter (G02)를 통해 Cas9을 발현하도록 하였다. G02 promoter (HindⅢ, SpeI)와 Cas9 (SpeI, PstI)을 괄호의 restriction enzyme을 포함한 primer로 각각 PCR을 통해 pGEM-T vector를 통해 cloning하여 pUC18 plasmid (GenScript)에 ligation하여 Cas9 protein만을 발현하는 vector를 제작하였다. sgRNA의 발현과 donor template을 포함하는 vector는 All-in-one

Cas9 SmartNuclease™ Vector의 sgRNA cassette를 PCR할 때, primer를 통해 promoter를 이전 연구에서 구축된 prokaryotic constitutive promoter (pR)로 교체하였으며, 위와 동일하게 cloning한 sgRNA cassette를 primer에 포함되어 있던 restriction enzyme site (SalI, BamHI)를 통해 pFC vector (System Biosciences)에 ligation하였으며, SDM을 통해 *E. coli*의 alr 유전자를 표적으로 하도록 guide sequence를 sgRNA design tool (http://www.rgenome.net/be-designer/)을 통해 prediction한 염기서열로 치환하였다. Homology arm은 High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)을 통해 *E. coli*의 genomic DNA를 분리하여 각 세균의 alr gene의 3′ 말단 쪽으로 500bp, 5′ 말단 쪽으로 500bp를 PCR을 통해 증폭하였으며, primer에 포함된 공통된 sequence를 이용하여 assembly PCR을 통해 하나의 fragment로 조립하였다. 완성된 homology arm은 pGEM-T vector를 통해 cloning하여 restriction enzyme (SacⅡ, NdeI)을 통해 sgRNA를 포함한 pFC vector에 삽입하였다.

3. alr knock-out E. coli 제작

*E. coli*의 경우, heat-shock에 의한 효율적인 transformation이 가능하기 때문에 RecA+ strain인 MC1061 E. coli strain을 competent cell로 제조하여 사용하였으며, Cas9 발현 vector와 homology arm을 포함한 sgRNA 발현 vector를 동시에 transformation하여 ampicillin과 kanamycin 모두를 포함한 LB plate에 도말하였다. selection 된 개체의 alr gene을 세균의 유전자에만 부착하는 primer를 통해 PCR하여 증폭한 후, PCR산물을 HindⅢ 통해 restriction함으로 donor template를

통해 인위적으로 삽입한 HindⅢ restriction site의 존재 유무를 확인하였다. PCR 산물은 HindⅢ restriction 이후, 0.9 % agarose gel에서 전기영동 되어 restriction 유무를 밴드의 크기를 관찰함으로 확인하였다. 추가적으로 세균의 유전자를 증폭한 PCR fragment를 sequencing service (Macrogen, Korea)를 통해 sequencing하여 donor template와 동일한 형태로 in-del (insertion or deletion of bases in a genome)이 일어났는지를 확인하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

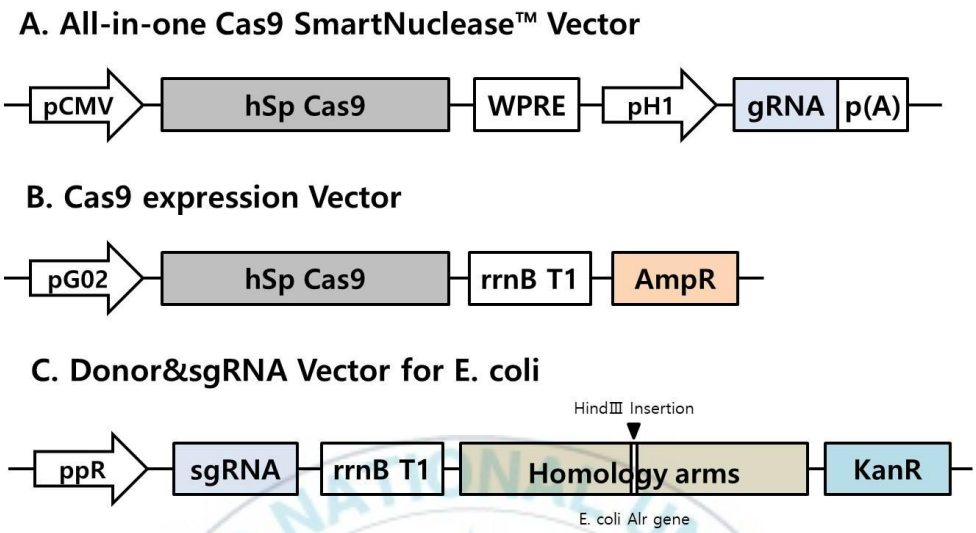

Figure 2-1. Construction of bacterial CRISPR editing system expression vectors. (A) Origin vector for Bacterial CRISPR editing vector construction. (B) Cas9 expression vector for prokaryote. (C) sgRNA expression vector contained donor template.

Table 2. For Construction of bacterial CRISPR editing vectors

Name	Sequence (5'-3')
G02 F HindⅢ	AAGCTTCGTCCGCGCCGTCGGTAAGCG
G02 R SpeI	ACTAGTAGAGAAGAATGCCGGCGGGAAG ATCCCGGG
Cas9 F SpeI	GCATGCACTAGTATGGACAAAAAGTATA GTATCGGACTGGATATTGGCACT
Cas9 R PstI	CTGCAGTTAGTCTCCCCCCAGCTGGGACA GGTCGATCC
pR F SalI	GTCGACACGTTAAATCTATCACCGCAAG GGATAAATA
sgRNA R BamHI	GGATCCAAAAAAAGCACCGACTCGGTGC CACTTTTTC
E. coli alr Left arm cloning F	ATGCAAGCGGCAACTGTTGT
E. coli alr Left arm cloning R	GCTAGCAAGCTTTTTGGTTCATCCGCG
E. coli alr Right arm cloning F	AAGCTTGCTAGCGGCGCAACCGAGAAA
E. coli alr Right arm cloning R	GCGATACGTTCTACGGGCAA
E. coli alr sgRNA SDM F	TACTAAGGAGGTTGTCGCGCGGATGAAC CAAAATGGTTTTAGAGCTAGA
E. coli alr sgRNA SDM R	TACTAAGGAGGTTGTCGCGCGGATGAAC CAAAATGGTTTTAGAGCTAGA
E. coli alr mutation detection F	CCGCAGTACGACGACGAATA
E. coli alr mutation detection R	TCGCGACCCTTGAAGTCTGG

Ⅲ. 결　　과

1. CRISPR editing system에 의한 *E. coli* mutant strain 제작

E. coli의 유전자에만 결합하는 primer를 통해 alr 유전자를 PCR을 통해 증폭하였을 때 1136bp의 크기를 지니지만, indel이 일어나 HindⅢ restriction enzyme site가 추가되었을 경우, HindⅢ 처리에 의해 restriction이 일어나 570 bp 크기를 나타내게 된다. 전기영동을 통해 그 크기를 관찰하였을 때, 본래의 크기인 1136 bp가 아닌 약 570 bp의 밴드를 형성하는 것을 확인하였으며, sequencing 결과를 통해 donor template의 디자인과 동일한 형태로 in-del이 일어나 의도한 대로 돌연변이가 유도된 것을 확정할 수 있었다. 하지만 *E. coli*의 경우, dadX 유전자에 의해 발현하는 D-alanine isomerase에 의해 D-alanine을 생성할 수 있는 대체 경로가 있으므로 D-alanine을 공급해 주지 않아도 생존할 수 있었다.

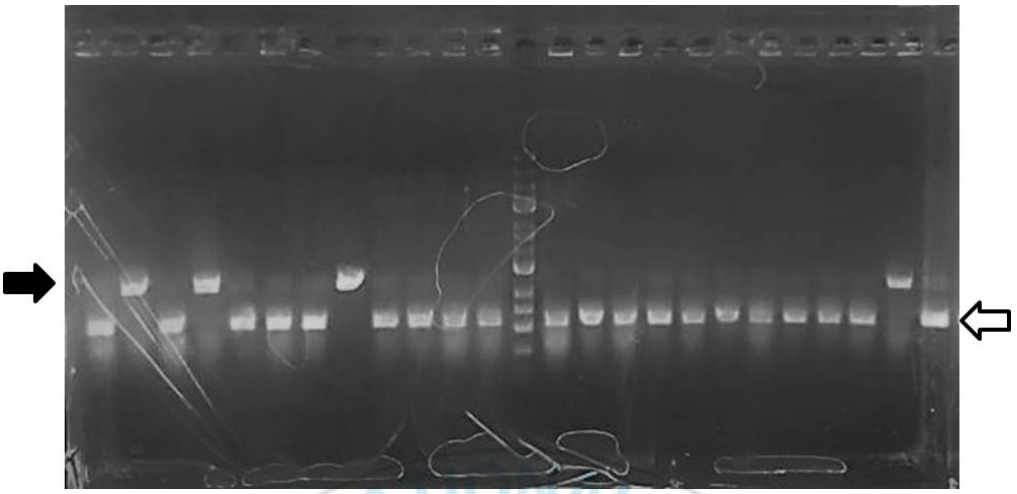

Figure 2-2. HindⅢ restriction of PCR products in *E. coli*. (white arrow) about 570 bp as restricted size. (black arrow) 1136 bp as normal E. coli PCR production.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

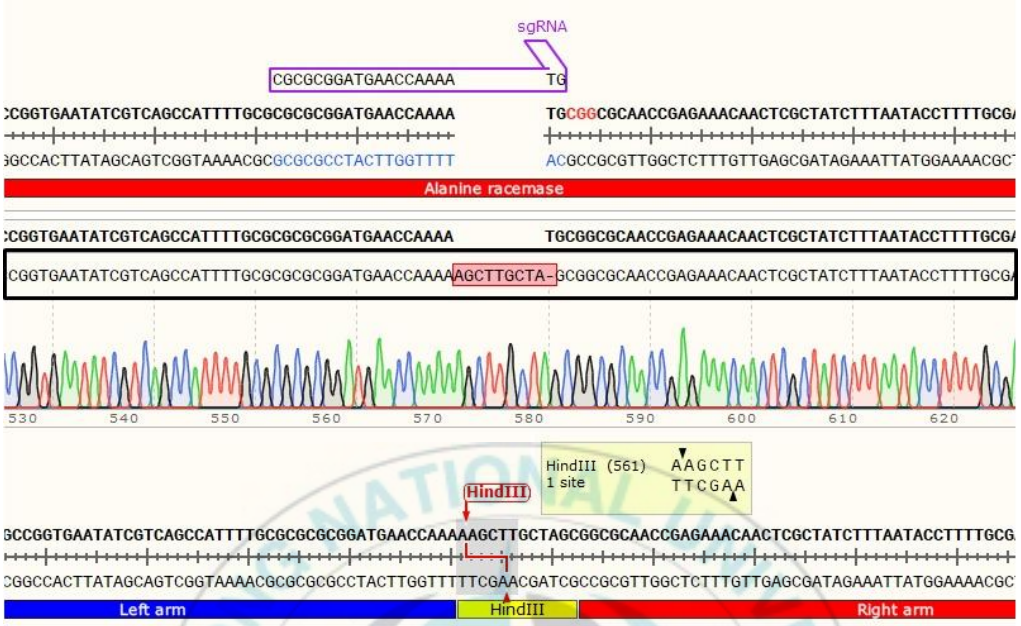

Figure 2-3 Confirmation of *E. coli* genome editing. (Black box) Sequencing result of PCR product from the colony detected HindⅢ restriction.

Ⅳ. 고 찰

본 실험을 통해 CRISPR/Cas9 system을 이용해 *E. coli*의 alanine racemase 유전자에 대한 성공적인 돌연변이를 제작하였다. 기존의 세균에 대한 돌연변이를 유도하는 방법들과 비교 하였을 때, CRISPR/Cas9 system을 통해 아주 간단하고 경제적으로 돌연변이를 정확하게 유도할 수 있었다. 이미 *E. coli*에서 시스템이 작동하는 것을 확인하였으며, NHEJ pathway가 결핍되어 있는 많은 종의 세균을 고려하여 donor template에 의해 DSB의 회복이 일어나는 HDR pathway를 통해 돌연변이를 유도하도록 시스템을 디자인 하였다. 따라서 추후 이를 확장하여 다양한 세균에서 적용 가능할 것으로 보이며, 특히 어류에 병원성을 나타내는 세균을 표적으로 하여 생장에 필수적인 유전자인 auxotrophic gene에 대한 돌연변이를 생산하는 등, 자력으로 생존할 수 없는 약독화 된 병원체를 생산하였을 경우 이를 백신으로 활용할 수 있을 것으로 보인다. 하지만 세균의 종에 따라 plasmid를 전달할 수 있는 방법에 제한이 있으며, transformation의 효율 또한 천차만별이다. 따라서 이를 뛰어넘을 수 있는 전략이 함께 구비되었을 때, *E. coli*와 동일하게 손쉽게 돌연변이를 유도할 수 있으며 다양한 목적을 위해 활용될 수 있을 것이다.

요 약

박테리아의 면역 시스템인 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)는 요즘 가장 각광 받고 있는 강력한 유전자 편집 도구로, 다양한 목적을 위해 유전자를 조작하는데 사용되어 지고 있다. 최근에는 이 CRISPR system을 응용하여 유전자 발현을 조절하는 도구로써 활용되어지고 있는데, 이는 endonuclease domain이 비활성화 된 dead Cas9 (dCas9)을 통해 이루어진다. 이는 크게 두 가지로 구분되는데, 표적 유전자를 억제하는 CRISPR interference (CRISPRi)와 반대로 과발현을 유도하는 CRISPR activation (CRISPRa)로 나눌 수 있다. CRISPRi의 경우, Zinc-finger protein 혹은 Transcription activator-like effectors (TALEs)을 통해 DNA의 특정 염기서열을 표적으로 하여 유전자를 조절하는 기존의 방식과 유사하게, endonuclease 활성을 잃은 dCas9과 single guide RNA (sgRNA)를 통해 표적 유전자에 물리적으로 붙어 유전자를 자르지 않고 RNA polymerase를 막아 transcription elongation을 방해하거나, transcription factor의 결합을 막음으로 transcription initiation을 방해하여 특정 유전자의 발현을 억제한다. CRISPRa의 경우, dCas9에 transcription activator를 모집할 수 있는 transcriptional activation domains (ADs)과 같은 단백질을 융합하여 사용한다. 자연적으로 일어나는 전사는 특정 위치에 집중된 transcription-factor의 AD에 의해 전사에 필요한 기관들이 모임으로 시작되는데, 이 dCas9과 AD의 복합체는 transcription start sites (TSSs) 주변부의 promoter region을 sgRNA를 통해 표적으로 하여, 인위적으로 transcription activator를 모집함으로 특정한 유전자의 강력한 발현

을 유도할 수 있다. 본 연구에서는 앞서 언급한 CRISPR-Cas9 system 및 응용 기술들을 어류 세포 안에서 적용하여 표적 유전자에 대한 조절과 함께 이미 CRISPR-Cas9 system에 의해 구축된 특정 면역 유전자가 결핍된 어류 세포와 비교하여 달라진 양상의 차이를 관찰하였다. CRISPRi system을 이용하여 hypoxia에 대한 세포 항상성에서 중심적인 역할을 하는 Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)의 α subunit을 표적으로 하여 *Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) 세포에서 해당 유전자에 대한 발현 억제를 유도하려 하였다. 추가적으로 이전 실험에서 HIF-1α가 knock-out된 EPC세포가 VHSV에 대한 apoptosis 및 cytopathic effect (CPE)에 대해 정상적으로 HIF-1α를 발현하는 EPC 세포에 비해 높은 저항성을 나타내었는데, CRISPRi system에 의해 HIF-1α의 발현이 억제된 EPC 세포 또한 비슷한 양상을 나타내는지 확인하기 위해 HIF-1α가 knock-out된 EPC세포와 함께 Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)에 대한 감수성의 차이를 확인하고자 하였다. CRISPRa system을 이용하여 EPC 세포에서 외부 유전자에 대한 과발현을 확인하려 하였으며 CMV promoter를 통해 eGFP를 발현하는 플라스미드를 표적으로 하여 eGFP의 과발현을 유도하고자 하였으며, 대표적인 antiviral 단백질로 알려져 있는 Mx 유전자의 promoter를 표적으로 하여 *Hirame natural embryo* (HINAE) 세포의 내부 유전자의 과발현을 유도하고자 하였다. HIF-1α 발현의 억제는 quantitative real-time PCR (qPCR)을 통해 분석하였으며, 이를 통해 CRISPRi system에 의한 HIF-1α의 억제가 강력하고 특이적으로 작동함을 확인하였다. VHSV에 대한 감수성의 차이는 VHSV에 의한 CPE가 나타나는 시점을 각 세포 별로 비교하여 관찰하였으며, 이를 통해 HIF-1α가 knock out된 EPC 세포와 HIF-1α의 발현이 억제된 세포가 VHSV의 감염에 대해 비슷한 양상을 나타내는 것을 확인하였다. CRISPRa

system을 이용한 표적 유전자의 과발현 또한 qPCR을 통해 그 발현의 변화를 분석하였으며, EPC 세포에서 eGFP의 발현이 6배 가까이 증가한 것을 확인하였고, HINAE 세포의 Mx gene의 activation 또한 20배 이상 증가한 것을 확인하였다. 이를 통해 CRISPR를 응용한 유전자 조절 도구를 통해 어류 세포 안에서 성공적으로 특정 유전자의 조절이 가능하다는 것을 확인 하였으며, 추후 적절한 표적을 선정하여 더욱 강력한 효과를 유도하여 다양한 방면에서 활용할 수 있을 것으로 보인다. 또한 CRISPRi system에 의해 억제된 유전자로 인한 반응이 해당 유전자가 완전히 제거된 세포와 동일한 양상을 나타내는 것으로 보아 추후 이를 loss-of-function analysis를 수행하는데 충분히 활용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

유전자 편집 도구로써 CRISPR-Cas9 system의 발달로 다양한 개체에서 비교적 손쉽게 돌연변이를 제작할 수 있게 되었다. 이에 따라 conjugation을 통해 allelic exchange를 유도하여 돌연변이를 만드는 등과 같은 복잡한 방식을 요구하는 기존의 세균 돌연변이 유도 방식을 탈피하고, CRISPR-Cas9 system을 발현하는 plasmid vector와 Homologous directed recombination (HDR)을 유도할 Donor template만으로 손쉽게 특정 유전자를 편집하여 돌연변이를 제작할 수 있게 되었다. 본 연구에서는 *Escherichia coli*를 표적으로 하여 세포벽 합성에 필수적인 D-alanine을 L-alanine으로부터 변환하는 효소인 Alanine racemase (alr)를 knock-out 시킴으로 E. coli의 mutant strain을 제작하고자 하였다. E. coli의 alr 유전자를 표적으로 하는 CRISPR-Cas9 system 발현 벡터와 donor template를 *E. coli*에 transformation하여 돌연변이를 유도하였고, *E. coli*의 alr 유전자의 변화를 PCR 및 유전자 서열 분석을 통해 확인하고자 하였다. 최종적으로 유전자 서열 분석을 통해 해당 염기 서열의 돌연변이가 Donor

template의 디자인대로 indel이 일어난 것을 확인하였으며, 성공적으로 의도된 돌연변이 세균이 제작된 것을 확인하였다. 추후 이 시스템을 어류 병원체로 확장하여 auxotrophic mutant 등과 같은 돌연변이를 손쉽게 제작하여 약독화 백신으로써 활용 가능할 것으로 보인다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

감사의 글

2년 이라는 시간이 참 빠르게 흘러서 어느 순간 저도 마지막을 뜻하는 이 장을 작성하고 있습니다. 빠르게 흐른 시간이라고 했지만 때로는 고통스러워서 더디게 가는 듯한 시간이었습니다. 굼벵이 같은 제가 파리가 되기 위해서는 노력이 필요하다는 것을 알 수 있는 시간 이었고, 저에게도 비루하지만 날개가 있다는 것을 아는 시간이었습니다. 본성이 게으르고 기복이 심한지라 여러 사람들의 도움 없이는 지나갈 수 없어서 참 많이 의지하고 많은 도움을 받았습니다. 먼저 나의 힘이 되신 여호와 하나님께 감사합니다. 만삭되지 못하여 난 자 같이 어리석은 삶의 반복이었지만, 탕자의 아버지 같이 매번 버선발로 나를 맡아주신 주님 감사합니다. 그리고 세상 누구보다 나를 사랑해주시고 아껴주신 아버지, 어머니! 당신의 헌신으로 꽃 같은 젊음을 누릴 수 있었습니다. 앞으로 더 정진해서 더 믿음직스러운 아들이 되겠습니다. 사랑합니다.

근본 없는 저를 거두어 주시고 믿어주신 선생님 정말 감사합니다. 비록 좋은 결과를 내지 못 했지만, 저의 인생에서는 선생님께서 지도해주신 이 석사 생활을 통해서 큰 열매를 맺을 수 있었습니다. 또 선생님의 그 인격과 신념을 통해 단순히 실험이나 지식뿐만 아니라 지혜를 배울 수 있었습니다. 존경합니다. 이외에도 졸업을 앞두고 세심한 지도로 도움을 주신 정현도 교수님, 김도형 교수님, 학문적인 식견을 넓혀주신 정준기 교수님, 허민도 교수님, 강주찬 교수님께도 감사의 인사를 전합니다.

가족보다 더 오랜 시간을 함께 보내면서 미운 정, 고운 정 다든 우리 실험실 식구들에게도 큰 감사를 드립니다. 아무것도 모르는 저를 데리고 참

많이도 가르쳐주시고 챙겨주셨던 민선 선배, 승혁 선배, 항상 다정한 말로 격려해주고 어려움이 있을 때마다 상냥하게 가르쳐주고 또 뜨겁게 함께 고민했던 실험실의 지붕 준성이 형, 항상 밝은 웃음으로 맡아 주시고 편하게 대해주는 세종대 베스트 테크니션 선영이 누나, 똑 부러지게 실험실을 꾸려가면서 분위기 메이커 역할을 하는 차기 실세 정인이, 영혼의 듀오로 고급 개그의 향연을 함께 펼친, 도움 밖에 받은 게 없는 천사 명광이, 힘든 상황에도 꿋꿋이 노력하면서 밝게도 대해주는 불굴의 용기 패피 미정이, 나보다 나이가 적지만 거의 선배이면서 나를 먹여 살리는 엄마 같은 동기이자 비선 실세인 현주, 나를 샌드백으로 알고 있는 것 같은 장난기 가득한 수연이, 내 개그를 가장 좋아하면서 아닌 척하는 성실한 에이스 경민이, 뒤늦게 함께 했지만 개그의 소울이 통하는 서울깍쟁이 소연이, 장난스럽게 적었지만 하나하나 너무 고맙고 부족한 저를 이해하고 받아줘서 행복하게 보내다 갑니다. 고맙습니다!

항상 새로운 욕으로 나를 깨닫게 해주고 그 속에 감춰진 따뜻한 마음으로 돌봐준 내 소중한 친구들, 승수 형, 주영이, 은총이, 제민이, 겸곤이, 렬기 형, 성학이 형을 포함하여 나의 버팀목이 되어주었던 모든 사람에게 다시 한 번 감사합니다. 마지막으로 부족하지만 2년 동안 고생하여 여기까지 온 기특한 저에게 수고했다고 말해주고 싶습니다. 앞으로 어디로 흘러갈지 모르지만 내 끝이 어디인지 알지 못하기에 주어진 오늘이 귀한 줄 알고 지혜롭게 살아가는 내가 되길 소망해봅니다. 감사합니다.

참 고 문 헌

Alejandro, C et al. (2015) Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. Nat Methods, 12(4):326-8.

Carbia-Nagashima, A. et al. (2007) RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1α during hypoxia. Cell, 131, 309 - 323.

Cong, L. et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 339, 819-823.

Fyodor D.U. (2018) Genome Editing B.C. (Before CRISPR): Lasting Lessons from the "Old Testament', The CRISPR Journal.

Gao Y, Zhao Y. (2014) Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. J Integr Plant Biol, 56:343-349.

Gilbert, L.A. et al. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. Cell, 154, 442-451.

Gilbert, L.A. et al. (2014) Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. Cell, 159, 647-661.

Kasai, H. et al. (2001) Establishment of two Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) embryo cell lines. Bulletin of Fisheries Sciences.

Mandegar M.A. et al. (2016) CRISPR Interference Efficiently Induces Specific and Reversible Gene Silencing in Human iPSCs. Cell Stem Cell. 18(4):541-53.

Mali, P. et al. (2013) RNA-guided human genome Engineering via Cas9. Science, 339, 823-826.

M.S. Kim and K.H. Kim (2018) CRISPR/Cas9-mediated knockout of HIF-1α gene in epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells inhibited apoptosis and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) growth. Arch Virol, 163(12):3395-3402.

Qi, L.S. et al. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell, 152, 1173-1183.

Walmsley, S. R. et al. (2005) Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1α-dependent NF-κB activity. J. Exp. Med. 201, 105-115.