

목표유전자 염기편집의 효율 향상과 돌연변이체의 디자인을 통한 생명공학적 이용

김정섭, Eric B. Kmiec

한국 제주대학교 농업생명과학대학 응용생물산업학과,
미국 델라웨어대학교 델라웨어생명공학연구소

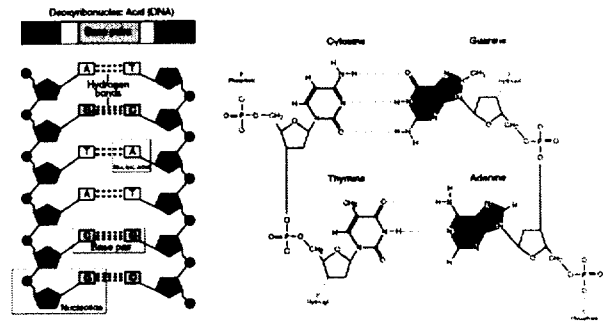
Efficiency increase of targeted base editing and biotechnological application through design of mutant

Jung-Sup Kim, Eric B. Kmiec

Department of Applied Biotechnology, College of Agriculture & Life Sciences, Cheju National University, Korea
Delaware Biotechnology Institute, University of Delaware, DE, USA

ABSTRACT : 목표유전자염기편집법은 합성된 짧은 oligonucleotides를 이용하여 생체내의 DNA repair 기작에 의해 유도되어 염기의 변환이 일어나 의도적인 돌연변이를 일으킨다. 이 기술은 동물, 식물, 미생물에서 정밀한 염기 수술법임이 입증되었고 그 단일 염기치환의 효율을 극대화하여 대량의 디자인된 돌연변이체를 생산하기 위해 그 효율에 영향을 미치는 DNA repair 유전자들의 기작에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 글에서는 현재까지의 목표유전자 염기편집법의 성과들을 돌아보고 목표유전자 염기편집의 효율 향상과 돌연변이체의 디자인을 통한 생명공학적 응용분야에 대해 정리하였다. 목표유전자염기편집법을 최근의 유전체 분석에 의해 드러나고 있는 유전정보를 이용하여 생물체의 *in vivo*에서 목표유전자의 기능을 대량으로 분석하고자 하는 기능유전체학에 응용하고 지금까지 연구된 식물 돌연변이체 연구들로부터 목표유전자염기편집법을 이용하여 개량하고자하는 형질을 나타내는 목표유전자들을 분석하고 정리하였다.

INTRODUCTION



21세기는 생명공학의 시대가 될 것이라고 예상되어 왔으며 건강한 삶, 풍요로운 사회, 깨끗한 환경을 만들기 위해 생명공학 기술은 꼭 필요한 핵심 전략이 될 것이다. 이를 획득하기 위해 나날이 발전하는 유전체학, 생물정보학 등 첨단학문들과 신기술을 접목하고 이용하여 부가가치를 창출하고 상업화시키는 것이 최근의 추세이다.

생물체의 유전물질인 DNA 분자는 당(sugar)과 인산(phosphate)으로 구성된 두 개의 가닥이 4개의 염

Corresponding author : Jung-Sup Kim, 제주도 제주시 아라 1동 1번지 제주대학교
Tel : 064-754-3394, E-mail : biotech2020@cheju.ac.kr

기에 의해 연결되어 꼬여진 사다리 모양을 하고 있다. 두 개의 DNA가닥은 각각의 가닥에 있는 염기들(염기쌍)간의 수소 결합에 의해 연결되어 있다. 유전체(genome)의 크기는 이러한 염기쌍들의 수에 의하여 결정되는데 인간유전체는 대략 30억 염기쌍으로 이루어져 있다. 각각의 가닥은 당, 인산 및 질소염기로 구성된 뉴클레오타이드(nucleotide)라는 동일한 단위들이 반복되어 선상배열을 하고 있는데, DNA에는 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C) 및 티민(T)이라는 4개의 서로 다른 염기들이 존재한다. 염기가 디옥시리보스(deoxyribose)에 공유결합하여 뉴클레오사이드(nucleoside)를 만들고, 핵산에서 인산염(phosphate)군은 뉴클레오사이드의 당과 결합하여 뉴클레오타이드를 만든다. 당과 인산의 골격을 따라 배열된 염기들의 연속적인 특별한 순서를 DNA 염기 서열(DNA sequence)이라고 하는데, 이러한 DNA의 서열이 특정 생명체의 고유한 형질이 나타나도록 만드는 정확한 유전명령을 내리게 된다. 만약 DNA를 이루고 있는 이 둘 염기에 변화가 생기면 DNA 서열이 바뀌게 되고 이에 따라 유전자 발현의 결과물인 단백질에 변화를 주어 유전형질이 변할 수 있다. 이를 돌연변이라 하며 수만, 수억 년간 이루어진 이와 같은 돌연변이의 결과로 진화가 일어났다고 설명하고 있다. 그렇다면 이 돌연변이를 의도적으로 단기간에 일으킬 수 있다면 우리는 생물체의 유전자를 마음대로 변화시켜 원하는 형질을 획득할 수 있을 것이다.

그 기초를 최근 세계적으로 활발하게 진행된 게놈 프로젝트가 제공해주고 있는데 대장균, 효모, 초파리, 애기장대 (AGI 등, 2000), 인간, 벼 등의 유전체 분석이 완료된 2001년 이후의 post-genome 시대에는 이 유전정보를 이용하여 각각의 유전자의 기능을 연구하는 기능유전체학이 전 생명과학 분야의 최근 주된 주제가 되고 있다.

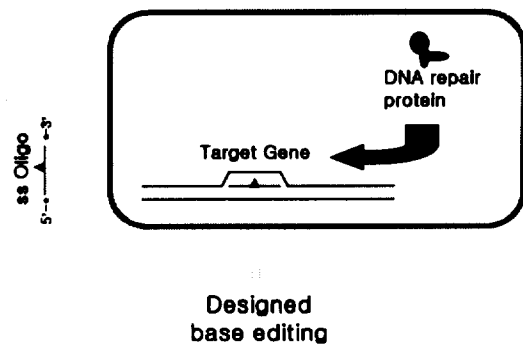
이 게놈 프로젝트와 최근에 개발된 신기술인 목표유전자 단일염기치환기법이 결합하여 원하는 돌연변이를 대량으로 유발시킬 수 있다 (Rice 등, 2001b; Rice 등, 2004). 최근의 유전체 분석에 의해 드러나고 있는 유전정보를 이용하여 생물체의 *in vivo*에서 목표유전자의 기능을 대량으로 분석할 수 있는 신기술로 여겨지는 목표유전자편집법은 합성된 짧은 oligonucleotides

에 의해 유도되는 목표유전자 염기편집으로 의도적인 돌연변이를 일으킨다. 이 기술은 동물(인간, 개), 식물(옥수수), 미생물(효모)에서 정밀한 염기 수술법임이 입증되었고 그 단일염기치환의 효율을 극대화하여 식물에서 대량의 디자인된 돌연변이체를 생산하기 위해 그 효율에 영향을 미치는 DNA repair 유전자들의 기작에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 글에서는 이미 발표된 review 논문들에 (Kmiec, 2003; Liu 등, 2003a) 잘 정리되어 있는 목표유전자 염기편집법의 성과들을 나열하는 것은 최소화하고 목표유전자 염기편집의 효율 향상과 돌연변이체의 디자인을 통한 생명공학 적용분야에 대해 중점적으로 요약, 정리하였다.

RESULTS and DISCUSSION

1. 목표유전자 염기편집법

Gene Information



이를 위한 핵심기술로서 유전자를 구성하는 DNA의 한개 염기를 치환하는 획기적인 단일염기 치환 방법으로 개별 목표유전자를 조작하는 방법이 고안되었다. 이 기술은 원래 인간의 질병유전자의 치료를 위해 고안되었으며 목표유전자 특이적으로 치료하는 정교한 유전자 수술법으로 25 base 되는 DNA/RNA로 구성된 합성된 oligonucleotide를 이용하여 DNA 상에서 mismatch 된 부위를 세포의 DNA repair 능력으로 질병유전자를 정상유전자로 치료하였다 (Cole-Strauss 등, 1996). 최근의 연구 성과들은 이 기술이 미생물(효모) (Brachman 등, 2003), 식물(옥수수) (Beetham

등, 1999), 동물(인간, 쥐) (Kmiec 등, 2000, Liu 등, 2002a)을 대상으로 한 실험에서 생체 내 유전자를 변형할 수 있음을 보여주고 있다. Kmiec 팀은 인간의 빈혈을 일으키는 유전질환인 Sick Cell Anemia를 단일염기 변환방법으로 유전자치료에 성공하였다 (Cole-Strauss 등, 1996). 식물에서는 Beetham 등 (1999)이 옥수수에서 단일염기치환으로 제초제 저항성을 나타내며 돌연변이된 GFP (녹색형광단백질)를 형광단백질로 바꾸는데 성공하였고 식물 엽록체의 추출물에서도 변형된 RNA/DNA oligonucleotides를 사용하여 목표유전자 염기편집이 가능함을 밝혔다. (Kmiec 등, 2001b; Rice 등, 2000). 그리고 Rando 팀은 근육 유전자의 돌연변이로 인해 불구가 된 쥐를 단일염기치환을 통해 정상으로 유전자 치료하는데 성공하여 이 기술이 인간 유전자 치료에 응용 가능성을 높여 주고 있다 (Parekh-Olmedo 등, 2003; Parekh-Olmedo 등, 2002b).

2. 목표유전자 염기편집법의 장·단점

현재 기능유전체학을 위해 식물에서는 Ti plasmid에서 유래된 transformation vector를 많이 사용하고 있고 동물 또는 인간의 형질전환을 위해서는 virus에서 유래된 vector 들을 사용하고 있는데 기존의 vector들을 사용한 형질전환 방법으로는 목표유전자 특이적이지 않거나 무작위적인 유전체내 삽입에 의한 문제점으로 인해 형질전환 후 많은 노력과 긴 시간, 비용을 들여 도입한 유전자의 삽입 개수와 삽입부위, 그리고 발현양상을 연구해야만 하는 문제점이 있다. 그리고 만약의 경우 기존의 유전자를 knockout 하여 일어날 수 있는 부작용에 대한 우려로 인해 현재 유전형질전환 식품의 경우 소비자들의 격렬한 저항에 직면해 있다. 또한 현재의 기능유전체학 기술로는 genome size가 큰 작물, 가축 등에 널리 적용 가능하지 않아 목표유전자 특이적으로 돌연변이를 생성하는 대량형질전환 신기술의 필요성이 대두되고 있다.

목표유전자 염기편집법은 기존 T-DNA tagging 이나 activation tagging과 비교하여 무작위적인 유전체내 삽입없이 목표유전자만을 targeting 하므로 형질전환체에서 유전자의 기능을 바로 알 수 있으므로

knockout 이나 activation 된 유전자를 찾기 위한 비용과 시간, 노력을 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다. 현재도 이 단일염기 치환기술의 효율은 동·식물의 homologous recombination 확률보다 높은 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 정도 되며 아직 이에 관여하는 DNA repair 유전자들의 작용 기작이 밝혀지지 않고 있으나 DNA repair 유전자들을 이용하여 효율을 높일 수 있는 단서가 나타나고 있다. 그리고 이를 아직 기능이 파악되지 않은 계층 상의 각각 유전자 기능을 대단위로 알아내는 기능유전체학에 응용하기 위해서는 단일염기 치환 효율을 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ 까지 높이는 것이 필요하다.

3. 목표유전자 염기편집법의 효율 증진 방법들

이에 유전자 염기치환기법의 "효율"을 높여 쉽게 특정 목표유전자를 변형하는 방법을 개발하고 있다. Kmiec 을 포함한 연구진들은 효모의 DNA repair 돌연변이체를 가지고 단일염기 치환기법의 효율을 분석한 결과 세균의 DNA repair나 recombination에 관여하는 RecA의 진핵생물에서의 상동 단백질인 Rad51 이나 Rad52가 이 효율을 높여줄 수 있음을 발표하였다 (Liu 등, 2002b). 이 결과는 생체 내 및 시험관에서 의 결과이며 그 효율이 10^{-3} 정도에 달하여 효모에서 YAC vector에 도입된 인간 유전자의 염기편집이 가능한 단계에 와 있어 (van Brabant 등, 2004) 이미 충분한 상업적인 가치를 가지는 것으로 보이지만 아직 이 system이 동물과 식물체에서도 의도적으로 대량의 염기 편집이 가능한지는 아직 발표되지 않고 있다.

미국의 Kmiec 팀에서는 염기치환 뿐만 아니라 염기 첨가와 삭제를 통해 point mutation과 frameshift mutation을 일으키는 것이 가능하다는 결과가 발표되었고 (Liu 등, 2001) 고가의 합성경비가 드는 DNA/RNA oligonucleotide 뿐만 아니라 저가의 single-stranded oligonucleotide도 동일한 염기치환을 일으킬 수 있으며 (Parekh-Olmedo 등, 2001; Rice 등, 2001a; Parekh-Olmedo 등, 2002a) 동시에 인접한 두 곳의 염기편집이 가능함과 sense strand 보다 antisense strand를 targeting 하는 것이 효율이 높음과 이런 현상이 유전자 발현의 전사 활성에 영향을 받는다는 사실을 발표하였다 (Agarwal, 2003;

Brachman, 2002; Liu 등, 2002c). 또한 DNA repair 과정에서 DNA pairing이 목표유전자 편집에 중요한 과정이며 (Drury 등, 2003) RecA 단백질이 DNA hybridization과 DNA 한쪽 가닥의 교환에 참여한다는 결론들과 (Gamper 등, 2003) 많은 DNA repair pathway 들 중 Mismatch repair 와 Recombination repair 에 관여하는 단백질들이 염기치환에 관여한다는 사실이 밝혀지고 있고, 특히 효모에서는 Rad51p와 Rad54p가 염기편집 효율을 증가시킴과 (Liu 등, 2002) 함께 Mre11 도 염기편집에 관여하고 있으며 (Liu 등, 2003) 최근에는 효모에서 DNA binding affinity를 증가시킨 변형된 RAD51 유전자를 사용하거나 nonspecific carrier DNA를 사용하여 생체 내에서 염기편집 효율을 증가시킬 수 있음을 보여주었다 (Liu 등, 2004; Maguire and Kmiec, 2004). 이들 DNA repair 유전자들을 이용하여 형질전환체를 만든 후 single-stranded oligonucleotide로 목표유전자를 염기치환하면 고효율로 염기치환된 다량의 의도된 돌연변이 생물체를 얻을 수 있을 것이다.

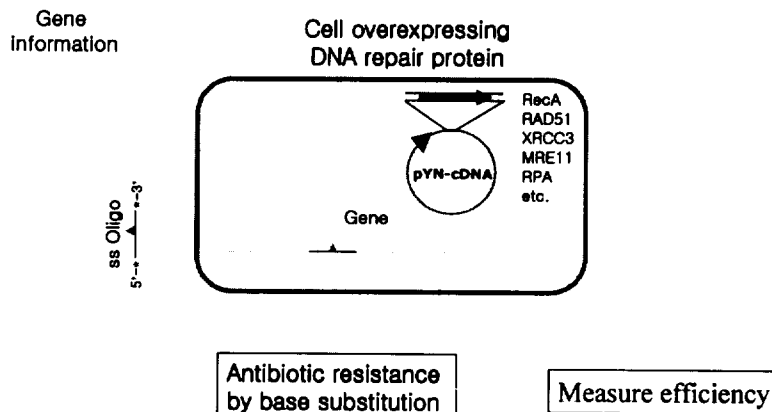
식물에서 DNA repair에 관여하는 유전자들이 다수 보고되고 있으며 (Britt, 1999) 효모에서는 DNA repair 유전자가 파괴된 돌연변이체를 가지고 목표유전자 염기편집법의 효율을 측정하였다 (Hu 등, 2003). 이와 관련된 후보유전자들 중 RAD51, RAD51B, RAD51C, XRCC3 유전자가 애기장대로부터 분리되었다. XRCC3 유전자는 ORF가 915 bp, 304-a.a. 을 가지는 단백질의 유전자로 분석되었다. XRCC3 아미노산서열은 아미노 말단에 nuclear localization signal과 중간에 ATP/GTP binding site motif A

로 알려진 정형적인 P-loop를 가지고 있고 다른 생물체의 RecA/RAD51 서열과 유사하였으며 46%의 유사도로 human XRCC3와 가장 유사하였다. XRCC3를 대량 발현하는 효모는 MMS에 저항성을 보여주었고 XRCC3는 효모에서 rad51과 rad52 mutant를 complement 할 수 있었다 (김정섭, unpublished results).

RAD51B와 RAD51C 유전자는 애기장대의 2번 염색체 상에 각각 11개와 9개의 exon으로 구성되어 있으며 ORF가 각각 1017 bp, 338-a.a. 와 1092 bp, 363-a.a.로 구성된 사실이 EST의 염기분석과 유전체 분석에 의해 드러났다. RAD51B 아미노산서열은 ATPase domain과 helicase domain을 가지고 있고 효모의 RAD52를 포함하여 다른 생물체의 RecA/RAD51 서열과 유사하였으며 50%의 유사도로 human RAD51B와 가장 유사하였다. RAD51B 또는 RAD51C가 knockout 된 애기장대는 lethal 하였다 (김정섭, unpublished results).

RAD51 유전자가 PCR에 의해 genomic DNA로부터 cloning 되었고 안티센스 RNA에 의해 만들어진 형질전환 애기장대들은 기형적 모양과 함께 MMS에 sensitivity를 보여주었다 (김정섭, unpublished results).

이들과 함께 다른 DNA repair 유전자들이 짧은 oligonucleotides에 의해 의도적으로 유도되는 단일 염기치환의 효율을 극대화하기 위해 사용되어 그 결과 들로부터 식물 기능유전체학에 응용될 수 있는 고효율로 염기치환이 일어나는 형질전환체가 만들어 질 것으로 예상된다.



식물에서 이와 같은 유전자 편집법의 효율을 테스트 하기 위해서 이에 관여하는 DNA repair 유전자들을 식물로부터 cloning 하고 이 유전자가 대량발현된 세포에서 효율을 측정하여 염기편집 효율을 높이는 유전자를 찾아낸 후에 이 DNA repair 유전자를 발현시킨 형질전환 식물체를 만들고 치환효율이 높은 형질전환 식물체로부터 단일염기치환에 의해 다수의 목표유전자 변형체들을 대량으로 구축하고 기능유전체학에 적용하여 이들 변이체들을 분석함으로써 생체 내에서 대단위로 유전자들의 기능을 단기간에 손쉽게 연구하는 체계를 마련하고 생명공학적으로 유용한 목표유전자의 염기편집으로 작물을 분자유종하는데 응용 가능하다.

또 한편으로는 변형된 oligonucleotide를 세포(핵) 내로 도입하는 효율을 높여 염기편집효율을 높이는 방법을 생각할 수 있다. 직접 핵 내에 주입을 통해 효율의 증가를 (Tran 등, 2003) 실험하거나 간접적인 방법을 사용하여 효율적으로 oligonucleotide를 세포내로 도입하는 여러 방법들, 예를 들면 electroporation, lipofectamin, nuclear-localization signal peptide (NLS) 등을 동시에 사용하면 염기편집 효율의 증가가 예상된다.

4. 국제 특허 출원

Kmiec 등(2001a)은 2000년부터 목표 유전자의 염기치환효율을 극대화하는 연구를 수행하여 유전체분석이 끝난 동식물체에서 수많은 DNA repair 유전자들을 정리하였으며 이 기술을 작물체의 분자유종에 응용하여 밀, 옥수수, 벼, 감자, 보리, 양배추, 콩 등의 대부분의 작물에서 염기편집으로 아미노산, 지방, 탄수화물의 대량생산, 병저항성, 응성불입, 제초제 저항성 및 고온, 냉해, 염분, 가뭄, 중금속 저항성을 일으키는 방법에 대한 미국특허를 출원, 등록하고 Napro 생물치료사에 이 특허를 양도하여 기술료가 발생하고 있다.

5. 돌연변이체의 디자인을 통한 식물 생명공학적인 이용

식물생명공학의 기본적인 목표는 식품, 농업을 위한 작물의 개량에 있으며 식물에서 유래된 각종의 원료를 생산하는 것이다. 목표유전자 편집법을 이용하여 작물을 개량할 때 목표유전자로 사용 가능한 몇 예들을 분

석하여 염기편집부위와 예상되는 표현형을 나열하였다 (Kmiec 등, 2001a).

a. 제초제 저항성 식물체

목표 유전자	염기편집 부위	예상되는 표현형
애기장대 EPSPS	Gly97Ala, GGC->GCC	Glyphosate 저항성
애기장대 ALS	Ser653Asn, AGT->AAT	Imidazoline 저항성
벼 ALS	Pro171Ser, CCC->TCC	sulfonylurea 저항성
담배 PPO	Val376Met, GTT->ATG	Porphyric herbicide 저항성
옥수수 D1 protein	Ser264Asp, AGT->ACT	Triazine 저항성
애기장대 KCT	Glu6Term, GAG->TAG	2,4-DB 저항성

b. 응성불입식물체

목표 유전자	염기편집 부위	예상되는 표현형
유채 AP3	Arg24Term, AGA->TGA	응성불입
토마토 AG	Arg9Term, AGA->TGA	응성불입
벼 PI	Lys5Term, AAG->TAG	응성불입
감자 DEF4	Ser22Term, TCA->TGA	응성불입

c. 저온, 염분, 중금속 저항성 식물체

목표 유전자	염기편집 부위	예상되는 표현형
벼 P5CS	Phe128Ala, TTT->GCT	염분 저항성
밀 HKT1	Ala240Val, GCC->GTC	염분 저항성
애기장대 PO	Arg7Term, CGA->TGA	저온 저항성
담배 CBP4	Gln12Term, CAG->TAG	납 저항성

d. 흰색 식물체

목표 유전자	염기편집 부위	예상되는 표현형
벼 Im	Glu22Term, GAG->TAG	흰색 식물

e. 아미노산 대량생산 작물

목표 유전자	염기편집 부위	예상되는 표현형
애기장대 CGS	Arg77His, CGT->CAT	Met 대량생산
감자 TS	Leu198Arg, CTT->CGT	Met 대량생산
벼 DHPS	Ser124Asn, AGT->AAT	Lys 대량생산
벼 AS	Asp323Asn, GAC->AAC	Trp 대량생산

f. 변형된 전분 생산 작물

목표 유전자	염기편집 부위	예상되는 표현형
밀 ADPGPP	Pro108Leu, CCC->CTC	전분함량 증가
감자 GBSS	Arg13Term, AGA->TGA	waxy starch 생산

g. 변형된 지방산 생산 작물

목표 유전자	염기편집 부위	예상되는 표현형
유채 AATE	Ser5Term, TCG- \rightarrow TAG	Palmitate 감소
벼 SADS	Tyr12Term, TAC- \rightarrow TAG	Stearate 증가
깨 OFADS	Arg22Term, AGA- \rightarrow TGA	Linolenic acid 감소

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant (Dr. Kim) from BioGreen 21 Program, Rural Development Administration, Republic of Korea. I am grateful to members of Eric Kmiec's and Sang-Gu Kim's laboratory for supports, suggestions, and/or reagents.

REFERENCES

- Agarwal S, Gamper HB, Kmiec EB. (2003) Nucleotide replacement at two sites can be directed by modified single-stranded oligonucleotides in vitro and in vivo. *Biomol Eng.* 20(1):7-20.
- Beetham PR, Kipp PB, Sawycky XL, Arntzen CJ, May GD. (1999) A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 8774-8778.
- Brachman EE, Kmiec EB. (2002) The 'biased' evolution of targeted gene repair. *Curr Opin Mol Ther.* 4(2):171-176.
- Brachman EE, Kmiec EB. (2003) Targeted nucleotide repair of *cyd1* mutations in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded DNA oligonucleotides. *Genetics.* 163(2):527-538.
- Britt AB. (1999) Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends Plant Sci.* 4: 20-25.
- Cole-Strauss A, Yoon K, Xiang Y, Byrne BC, Rice MC, Gryn J, Holloman WK, Kmiec EB. (1996) Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* 273: 1386-1389.
- Drury MD, Kmiec EB. (2003) DNA pairing is an important step in the process of targeted nucleotide exchange. *Nucleic Acids Res.* 31(3):899-910.
- Gamper HB, Nulf CJ, Corey DR, Kmiec EB. (2003) The synaptic complex of RecA protein participates in hybridization and inverse strand exchange reactions. *Biochemistry.* 42(9):2643-2655.
- Hu Y, Liu L, Kmiec EB. (2003) Reduction of Htt inclusion formation in strains of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in certain DNA repair functions: a statistical analysis of phenotype. *Exp Cell Res.* 291(1):46-55.
- Kmiec EB. (2003) Targeted gene repair - in the arena. *J Clin Invest.* 112(5):632-636.
- Kmiec, E., Gamper, H., Rice, M., and Kim, J. (2001a) Targeted chromosomal genomic alterations in plants using modified single stranded oligonucleotides. PCT/US01/17672. US patent.
- Kmiec EB, Johnson C, May GD. (2001b) Chloroplast lysates support directed mutagenesis via modified DNA and chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Plant J.* 27(3):267-274.
- Kmiec EB, Ye S, Peng L. (2000) Targeted gene repair in mammalian cells using chimeric oligonucleotides. *Genet Eng (N Y).* 22:23-31.
- Liu H, Agarwal S, Kmiec E, Davis BR. (2002a) Targeted beta-globin gene conversion in

- human hematopoietic CD34(+) and Lin(-) CD38(-) cells. *Gene Ther.* 9(2):118-126.
- Liu L, Cheng S, van Brabant AJ, Kmiec EB. (2002b) Rad51p and Rad54p, but not Rad52p, elevate gene repair in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded oligonucleotide vectors. *Nucleic Acids Res.* 30(13):2742-2750.
- Liu L, Maguire KK, Kmiec EB. (2004) Genetic re-engineering of *Saccharomyces cerevisiae* RAD51 leads to a significant increase in the frequency of gene repair in vivo. *Nucleic Acids Res.* 32(7):2093-2101.
- Liu L, Parekh-Olmedo H, Kmiec EB. (2003a) The development and regulation of gene repair. *Nat Rev Genet.* 4(9):679-689.
- Liu L, Rice MC, Drury M, Cheng S, Gamper H, Kmiec EB. (2002c) Strand bias in targeted gene repair is influenced by transcriptional activity. *Mol Cell Biol.* 22(11):3852-3863.
- Liu L, Rice MC, Kmiec EB. (2001) In vivo gene repair of point and frameshift mutations directed by chimeric RNA/DNA oligonucleotides and modified single-stranded oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 29(20):4238-4250.
- Liu L, Usher M, Hu Y, Kmiec EB. (2003b) Nuclease activity of *Saccharomyces cerevisiae* Mre11 functions in targeted nucleotide alteration. *Appl Environ Microbiol.* 69(10):6216-6224.
- Maguire KK, Kmiec EB. (2004) Enhancement of in vivo targeted nucleotide exchange by nonspecific carrier DNA. *Methods Mol Biol* 262:209-219.
- Parekh-Olmedo H, Czymmek K, Kmiec EB. (2001) Targeted gene repair in mammalian cells using chimeric RNA/DNA oligonucleotides and modified single-stranded vectors. *Sci STKE.* 2001(73):PL1.
- Parekh-Olmedo H, Drury M, Kmiec EB. (2002a) Targeted nucleotide exchange in *Saccharomyces cerevisiae* directed by short oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Chem Biol.* 9(10):1073-1084.
- Parekh-Olmedo H, Engstrom JU, Kmiec EB. (2003a) The effect of hydroxyurea and trichostatin A on targeted nucleotide exchange in yeast and mammalian cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1002:43-55.
- Parekh-Olmedo H, Kmiec EB. (2003b) Targeted nucleotide exchange in the CAG repeat region of the human HD gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 310(2):660-666.
- Parekh-Olmedo H, Krainc D, Kmiec EB. (2002b) Targeted gene repair and its application to neurodegenerative disorders. *Neuron.* 33(4):495-498.
- Rice MC, Bruner M, Czymmek K, Kmiec EB. (2001a) In vitro and in vivo nucleotide exchange directed by chimeric RNA/DNA oligonucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 40(4):857-868.
- Rice MC, Czymmek K, Kmiec EB. (2001b) The potential of nucleic acid repair in functional genomics. *Nat Biotechnol* 19(4):321-326.
- Rice MC, Heckman BM, Liu Y, Kmiec EB. (2004) Fluorescent detection and isolation of DNA variants using stabilized RecA-coated oligonucleotides. *Genome Res.* 14(1):116-125.
- Rice MC, May GD, Kipp PB, Parekh H, Kmiec EB. (2000) Genetic repair of mutations in plant cell-free extracts directed by specific chimeric oligonucleotides. *Plant Physiol.* 123: 427-438.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the

- flowering plant *Arabidopsis thaliana*.
Nature 408: 796-815.
- Tran ND, Liu X, Yan Z, Abbote D, Jiang Q,
Kmiec EB, Sigmund CD, Engelhardt JF.
(2003) Efficiency of chimeroplast gene
targeting by direct nuclear injection
using a GFP recovery assay. Mol Ther.
7(2):248-253.
- van Brabant AJ, Williams JK, Parekh-
Olmedo H, Kmiec EB. (2004) Gene
editing of a human gene in yeast
artificial chromosomes using modified
single-stranded DNA and dual targeting.
Pharmacogenomics J 4(3):175-183.